

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

TEZA DE DOCTORAT

Rezumat

Conducător științific
Prof. Dr. Luminița Vlădescu

Doctorand
Untea Arabela Elena

2012

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

***STUDIU CHIMICO - ANALITIC AL
CORELAȚIILOR ÎNTRE CONȚINUTUL DE
MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL
ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA
DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU
PLANTE ȘI EXTRACTE DIN PLANTE***

Conducător științific
Prof. Dr. Luminița Vlădescu

Doctorand
Untea Arabela Elena

2012

CUPRINS

Capitolul 1. Microelemente esențiale.....	6
1.1. Valoarea biologică a elementelor minerale esențiale pentru organismul animal.....	6
1.2. Modalități de asigurare a microelementelor esențiale la purceii înțărcați	7
Capitolul 2. Folosirea metodelor spectrometrice pentru determinarea conținutului de microelemente din probe vegetale și probe biologice de origine animală.....	9
2.1. Determinarea conținutului de microelemente din probe vegetale	9
2.2. Determinarea conținutului de microelemente din probe biologice de origine animală.....	10
2.3. Sursele de microelemente utilizate pentru suplimentarea rațiilor de hrană a animalelor.....	10
Capitolul 3. Aspecte practice ale studiului privind corelația dintre conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu plante și extracte din plante.....	11
3.1. Luarea și pregătirea probelor pentru analiză	11
3.2. Stabilirea condițiilor optime de lucru pentru determinarea microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe biologice.....	12
3.3. Organizarea experimentelor de nutriție animală.....	12
Capitolul 4. Validarea metodelor de determinare a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe biologice.....	13
4.1. Alegerea metodei de aducere în soluție a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără	13
4.2. Verificarea în laborator a metodei de determinare a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără.....	13
4.3. Validarea metodei de dezagregare cu microunde.....	14
4.4. Calcularea incertitudinii de măsurare la determinarea microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe de material biologic prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără, după dezagregare cu microunde.....	16
4.5. Studiu interlaboratoare pentru validarea metodei de determinare a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe de natură vegetală și stabilirea conținutului de microelemente din plante.....	17
Capitolul 5. Studiu chimico- analitic al corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu extracte vegetale sau plante de cultură.....	18
5.1. Studiu chimico- analitic al corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu inulină.....	18

5.2. Studiul corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrația acestora din dietele de hrană îmbogățite cu un amestec pe baza de topinambur și frunze de cătină.....20

Capitolul 6. Studiu chimico- analitic al corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu plante din flora spontană.....23

6.1. Determinarea conținutului de Fe, Cu, Mn, Zn din oregano, afină și colțul babei, provenite din flora spontană.....23

6.2. Studiul corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu oregano.....24

6.3. Studiul corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu amestecuri de plante din flora spontană.....29

Concluzii.....34

Bibliografie (selecție din teză).....36

INTRODUCERE

Scopul tezei de doctorat a fost de a caracteriza din punct de vedere chimico-analitic mai multe tipuri de probe biologice de origine vegetală și animală în vederea evaluării unor corelațiilor existente între conținutul de microelemente din rațiile de hrană și regăsirea acestora în organismul animal. În mod concret, s-au evaluat aceste corelații în cazul suplimentării rațiilor porciilor înțărcați cu anumiți fitoaditivi – specii și amestecuri de plante din flora spontană și de cultură) în scopul îmbunătățirii statusului mineral în organismul animal, precum și al protejării mediului prin reducerea cantităților de premixuri minerale folosite. Fitoaditivii (aditivii fitogenici) folosiți ca suplimente în hrana animalelor sunt plante sau produși derivați din plante care sunt înglobați în rațiile furajere cu scopul de a îmbunătăți productivitatea animalelor sau/și pentru a crește calitatea alimentelor obținute pornind de la aceste animale. Premixurile minerale (amestecuri de substanțe anorganice) sunt folosite în mod curent ca suplimente în hrana animalelor.

Prezența microelementelor în hrana animalelor este indispensabilă asigurării performanțelor de creștere și sănătate. Elemente cum sunt Cu, Fe, Mn și Zn trebuie adăugate în hrana animalelor crescute în ferme de tip convențional. Problema este că sursele sub care se adaugă, în special oxizi, sulfați și alte combinații anorganice, sunt surse cu biodisponibilitate mică a microelementelor ceea ce face ca o mare cantitate de microelemente ingerate să ajungă direct în dejecții. De altfel, din cauza biodisponibilității mici se folosesc cantități mari de astfel de substanțe anorganice pentru a fi asigurată atingerea necesarului. Problema este acută în cazul cuprului și zincului care sunt metale grele, iar acumularea lor în sol afectează grav calitatea solului și a apelor freatice și de suprafață.

Există o foarte mare varietate de compuși vegetali utilizați în hrana animalelor pentru care au fost studiate proprietățile antioxidante, antibacteriene dar și potențialul vitaminic sau mineral. Motivul pentru care s-a dezvoltat domeniul fitoaditivilor furajeri este interzicerea utilizării antibioticelor în hrana animalelor, ca urmare a identificării riscului apariției rezistenței bacteriilor la acțiunea antibioticelor.

Pentru evaluarea efectelor unor suplimente de aditivi fitogenici în rația de hrană, asupra organismului animal, au fost studiate în cadrul părții experimentale a tezei de doctorat: un extract de plantă (inulina obținută din cicoare), două plante de cultură (topinambur și cătină, recoltate din serele unui producător de suplimente alimentare) și trei plante recoltate din flora spontană (oregano, afină și colțul babei). S-au desfășurat o serie de experimente de nutriție pe porci recent înțărcați (2 experimente a câte 2 loturi cu 4 porci / lot; 2 experimente a câte 3 loturi și 4 porci / lot; 1 experiment în fermă, cu 2 loturi și 8 porci / lot), în care aceste plante au fost incluse în rațiile animalelor. În cadrul acestor experimente, s-au recoltat probe de materii vegetale (plante, nutreț combinat) și probe de origine animală (ser, organe, fecale, urină,) care au fost analizate, au fost determinate concentrațiile unor elemente metalice și pe baza rezultatelor obținute au fost stabilite corelații între conținutul de microelemente din organismul animal și cel din plantele folosite ca adausuri în hrană.

Capitolul 1

MICROELEMENTE ESENȚIALE

1.1. VALOAREA BIOLOGICĂ A ELEMENTELOR MINERALE ESENȚIALE PENTRU ORGANISMUL ANIMAL

Substanțele minerale se găsesc atât în nutrețuri, cât și în corpul animalelor, în cantități diferite. Ele sunt prezente în țesuturile biologice și se regăsesc în cenușa obținută prin arderea acestora.

Atât macro cât și microelementele se absorb mai bine când sunt sub forma unor săruri relativ ușor solubile în mediul acid din stomac: carbonați, sulfuri, oxizi. Substanțele minerale din furajele vegetale au un coeficient de asimilare (absorbție) mai mic în comparație cu sărurile anorganice administrate animalelor sub formă de suplimente minerale (amestecuri, premixuri) înglobate în nutrețurile combinate.

În cazul existenței unor tulburări de nutriție minerală, pentru o diagnosticare precisă a cauzelor și efectelor, de multe ori, se recurge la studii de bilanț mineral, asociate cu observații de producție și analize privind valorile conținutului mineral în ser și diferite țesuturi (organe, piele).

Parametrii indicatori pentru metabolismul mineral sunt: coeficienții de absorbție, concentrația elementelor minerale în excretă și țesuturile de depozitare, interacțiunile cu alte substanțe nutritive etc. Valorile acestor parametri arată dacă nivelul de substanțe minerale prezente în hrană este unul adecvat (conform cerințelor și normelor), adică, dacă se asigură cantități corespunzătoare de elemente minerale în țesuturi pentru dezvoltarea animalului și pentru obținerea producțiilor specifice speciei și vârstei. Rezultă că analiza conținutului mineral poate constitui de multe ori un indiciu pertinent asupra satisfacerii cerințelor organismului în substanțe minerale.

Funcțiile biologice ale fierului, cuprului, manganului și zincului

Principalele funcții ale fierului sunt legate de participarea la transportul sanguin al oxigenului și în respirația tisulară. Fierul este component al hemoglobinei și al celulelor roșii din sânge. Se găsește în mușchi sub formă de mioglobină, în ser ca transferină, în placentă ca uteroferină, în lapte ca lactoferină și în ficat ca feritină și hemosiderină (Zimmerman, 1980). De asemenea, joacă un rol important în organism în calitate de component al mai multor enzime metabolice.

Rolul fiziologic al cuprului, component al ceruloplasminei, constă în participarea la hematopoeză, condiționând absorbția și utilizarea fierului în sinteza porfirinei III, a hemului și a enzimelor cu fier. În absența cuprului în organism s-a constatat apariția unei anemii care nu cedează la administrarea fierului, ci numai prin asocierea lui cu cuprul.

Rolul metabolic al manganului constă în participarea lui în diferite sinteze și sisteme enzimatice: peptidaze, fosfataze, arginaze etc. Manganul participă la funcția atoxică a fierului, la potențarea vitaminei C și la efectul hipoglicemiant al adrenalinei (Pârvu, 2003).

Zincul joacă un rol foarte important în structura unor enzime, ca: dehidraza carbonică (0,33-0,34 % zinc), uricază (0,1% zinc), carboxipeptidază pancreatică, alcooldehidrogenază (din drojdii), tiroxinază, fosfatază intestinală, a căror activitate o favorizează. Are rol funcțional în metaloenzime cum sunt hidrolaza, liaza, izomeraza, transferaza etc. (Han, 2009). Zincul inactivează unele enzime, ca: pepsina, tripsina etc. El are rol de potențare a unor hormoni, de exemplu insulina și a vitaminei B₁ (Wash, 1994).

Cerințele de microelemente ale purcelor înțărcați

În nutriția minerală, pentru a defini aportul unui element esențial într-o rație alimentară, trebuie răspuns, în primul rând, la întrebările *cât?* și *în ce formă?* Marea dificultate în găsirea răspunsurilor la aceste întrebări se datorează faptului că recomandările trebuie să se integreze strâns, în complexul de factori care influențează procesul de nutriție: complexitatea rației și a sursei de minerale, nivelul energetic al hranei, temperatura ambiantă și factorii de stres (Criste, 2000).

Nutriționiștii consideră că este nevoie de o marjă de siguranță între necesar și recomandările practice, recomandând o risipă “economică” de elemente minerale (Diaz, 1986).

Lipsa datelor experimentale care să fundamenteze diferite sisteme de recomandări, a dus la apariția unor diferențieri între noțiunile de: *cerință*, *recomandare* și *suplimentare* (Paullauf, 1989). De obicei, aporturile recomandate și indicate în tabele, pentru fiecare specie și categorie de animale, reprezintă un multiplu de 2-5 ori al valorii cerințelor nete determinate.

Pentru elementele minerale esențiale, există cerințe de întreținere și producție clar stabilite pentru aproape toate speciile și prin urmare există și preocuparea nutriționiștilor de a asigura atingerea cerințelor prin includerea amestecurilor de săruri ale acestor minerale în nutrețurile combinate.

Cerințele de microelemente publicate în NRC 1998, pentru diferite categorii de porci sunt prezentate în tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. Cerințele de microelemente pentru porci, conform NRC 1998

Microelement	Greutate corporală					
	3-5 kg	5-10 kg	10-20 kg	20-50 kg	50-80 kg	80-120 kg
Fe (mg / kg)	100	100	80	60	50	40
Cu (mg / kg)	6	6	5	4	3.5	3
Mn (mg / kg)	4	4	3	2	2	2
Zn (mg / kg)	100	100	80	60	50	50

1.2. MODALITĂȚI DE ASIGURARE A MICROELEMENTELOR ESENȚIALE LA PURCEII ÎNȚĂRCAȚI

Chiar dacă suntem în secolul XXI, încă nu sunt stabilite nivelele optime de microelemente care trebuie suplimentate/adăugate rației de bază. Se cunosc cerințele fiziologice, dar nu se știe exact cât mai trebuie suplimentat/adăugat, față de conținutul existent în furajele componente ale rației de

bază, pentru obținerea de producții performante din punct de vedere cantitativ, calitativ, economic și ecologic.

Beneficii ale suplimentării rației de bază a purcelor înțărcați cu microelemente esențiale

La purceii înțărcați (15-30 Kg) principalul obiectiv în stabilirea cerințelor este acela al optimizării performanțelor de creștere pe perioada primelor săptămâni după înțarcare. Este o perioadă în care pot să apară probleme serioase legate de: scăderea sporului în creștere, consumuri mai mici de furaje, creșterea morbidității și a mortalității.

Pe lângă alți factori de stres care se instalează în perioada postînțarcare, trecerea de la laptele matern la o hrănire solidă constituie o schimbare majoră în viața unui purcel. În practică, suplimentarea hranei animalelor cu microelemente se face conform recomandărilor producătorilor de premixuri (concentrate, amestecuri) minerale. Aceste recomandări de cele mai multe ori nu se bazează pe date științifice care să țină cont de complexul de factori prezentat mai sus. Practic sunt de 2 - 3 ori mai mari decât cerințele stabilite științific.

Biodisponibilitatea elementelor minerale din sursele de suplimentare a hranei

După evaluarea cantității de microelement prezent în hrană, biodisponibilitatea acestuia este cel mai important aspect în asigurarea organismului cu minerale la nivelul cerințelor. Cheia micșorării cantităților de minerale ingerate de animale este aceea a măririi biodisponibilității lor din hrană. Orice sursă de microelemente poate fi evaluată prin intermediul biodisponibilității. Pentru aceasta este necesar să se realizeze cel puțin studiul absorbabilității acestuia, concentrațiile în sânge și organele de depozit, dar și performanțele zootehnice.

In vivo, sunt folosite câteva metode pentru determinarea biodisponibilității microelementelor. Uneori, se folosesc studii de bilanț, dar pentru că elementele sunt slab absorbite, mici erori de estimare a ingestiei sau excretei pot conduce la mari erori în bilanțul final. Altă metodă de estimare a biodisponibilității este determinarea concentrației microelementelor în unele organe de depozit.

Capitolul 2

FOLOSIREA METODELOR SPECTROMETRICE PENTRU DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE MICROELEMENTE DIN PROBE VEGETALE ȘI PROBE BIOLOGICE DE ORIGINE ANIMALĂ

Unele elemente minerale sunt esențiale pentru sănătatea și productivitatea animalului și au un rol nutrițional și biochimic bine definit. Există și o altă categorie de elemente minerale care apar în hrană și țesut animal în cantități foarte mici și care, la nivelul actual de cunoaștere, nu au rol nutrițional. Aceste elemente sunt denumite, convențional, contaminanți.

2.1. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE MICROELEMENTE DIN PROBE VEGETALE

Determinarea elementelor minerale în probele de nutreț este îngreunată de faptul că ele au o matrice organică complexă care conține specii chimice a căror concentrație poate varia de la nivelul urmelor până la acela de componenți majori. Acest fapt a impus dezvoltarea unei game largi de metode analitice (Emons, 2006): spectrometrie de absorbție atomică (cu flacără - FAAS sau cuptor de grafit - GFAAS), spectrometria de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES), spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS) și voltametria. Totuși, spectrometria de absorbție atomică este considerată a fi metoda de referință (regulament 152/2009) pentru analiza microelementelor din nutrețuri. De aceea este folosită ca bază de comparație pentru alte metode de analiză.

Dezagregările pe cale uscată, umedă și cu microunde sunt cele mai folosite metode de aducere în soluție a analitelor din matrice organică în vederea determinării de microelemente din probe biologice (Tuzen, 2007).

În tabelul 2.3. sunt înscrise câteva referințe bibliografice privind compararea metodelor de aducere în soluție a microelementelor din diferite tipuri de probe.

Tabel 2.3. Studii care au implicat compararea metodelor de dezagregare în vederea determinării microelementelor prin metode spectrometrice

Materialul analizat	Microelementele determinate	Metoda de determinare	Bibliografie
Concentrat de supă	Cu, Zn, Mn, Fe, Al	FAAS	Soylac, 2006
Condimente	Cu, Cd, Pb, Zn, Mn, Fe, Cr, Ni	FAAS	Soylac, 2010
Ceai	Zn, Cu, Ni	FAAS	Soylac, 2007
Alimente	Cd, Fe, Pb, Zn	AAS	Da Col, 2009
Biscuiți	Fe, Zn	FAAS	Doner, 2004

2.2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE MICROELEMENTE DIN PROBE BIOLOGICE DE ORIGINE ANIMALĂ

Metode de aducere a analiților în soluție

Cateva Studii privind determinarea unor microelemente din probe biologice prin metode spectrometrice sunt trecute în tabelul 2.11.

Tabelul 2.11. Studii privind determinarea unor microelemente din probe biologice

Probe biologice	Microelemente studiate	Metoda de determinare	Bibliografie
Carne de găina	Cu, Cd, Pb, Se, Mn, As, Cr, Ni, Co, Al, Zn, Fe	AAS	Uluozlu, 2009
Pește	Cu, Fe, Mn, Zn, Se, Cr	AAS	Tuzen, 2009
Ficat	Cu, Zn	FAAS	Mesko, 2006
Rinichi de porc, ficat bovin	Cd, Cu, Pb	FAAS	Pereira-Filho, 2002
Lapte	Cu, Fe, Pb	FAAS	Florian, 2001
Crab	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	ICP-OES	Mutlu, 2011

2.3. SURSELE DE MICROELEMENTE UTILIZATE PENTRU SUPLIMENTAREA RAȚIILOR DE HRANA A ANIMALELOR

Surse convenționale - sărurile anorganice

Pe piață există un număr extrem de mare de amestecuri de săruri minerale destinate nutriției animale. Într-o serie de țări ale Uniunii Europene, există o legislație restrictivă față de folosirea unor amestecuri minerale la nivele ridicate și compuse din surse anorganice, surse suspectate ca fiind potențiali agenți de poluare (Nicholson, 2008).

Surse neconvenționale - aditivi fitogenici în hrana animalelor

În ultimii 50 de ani microelemente precum Cu și Zn au început să fie folosite, pe scară largă și la nivele foarte ridicate (Carlson, 1999; Hill, 2001; Poulsen, 1995) în hrana purceilor în locul antibioticelor cu rol de stimulatori de creștere. Folosirea antibioticelor în hrana animalelor este interzisă în UE datorită preocupărilor privind instaurarea rezistenței bacteriilor la om și animale (Lalles, 2007). Insa si practica folosirii nivelelor ridicate de microelemente are un impact negativ și de lungă durată asupra mediului (sol și apă freatică) din jurul marilor ferme (Nicholson, 2008). În acest context se înscriu cercetările privind utilizarea plantelor/ aditivilor fitogenetici. Se ridică însă întrebarea dacă aceste plante pot să fie și o sursă naturală de microelemente (Rozica, 2005), biodisponibile la nivel intestinal, astfel ca balastul de mineral excretat să fie diminuat.

Capitolul 3

ASPECTE PRACTICE ALE STUDIULUI PRIVIND CORELAȚIA DINTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU PLANTE ȘI EXTRACTE DIN PLANTE

3.1. LUAREA ȘI PREGĂTIREA PROBELOR PENTRU ANALIZĂ

În vederea realizării experimentelor în cadrul studiului privind corelațiile dintre conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora în rațiile suplimentate cu plante sau extracte din plante, a fost necesară organizarea corectă a etapelor de lucru, în Laboratorul de Chimie Analitică și Analize instrumentale în vederea determinării concentrațiilor de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn dintr-un număr foarte mare de probe biologice de tipuri diferite cât și pentru organizarea experimentelor de nutriție animală.

Luarea și pregătirea probelor de material vegetal

Materialul vegetal (plantele folosite ca suplimente în experimentele de nutriție) recoltat și uscat natural a fost mărunțit prin tăiere, măcinat în moara și cernut prin sita cu orificii pătrate cu latura de 1 mm, conform prevederilor din Regulamentul (CE) nr. 152/2009. Probele prelevate din materiile prime furajere componente ale rației și din nutrețul combinat, au fost prelevate folosind eșantioane colective (10 kg) reduse prin metoda sferturilor la eșantioane de 1 kg.

Probele de plante, extracte de plante, materii prime furajere, nutrețuri combinate, uscate și măcinate au fost aduse în soluție prin dezagregare cu microunde.

Luarea și pregătirea probelor de material biologic de origine animală

Probele de origine animală (fecale, urină, ser, organe) recoltate pe parcursul desfășurării experimentelor de nutriție au fost prelevate astfel:

- Pe parcursul experimentelor, fecalele au fost recoltate cantitativ, o dată pe zi. La sfârșitul perioadei de bilanț (o săptămână), probele prelevate au fost cântărite și omogenizate foarte bine pentru a se constitui probe medii săptămânale. Probele de fecale uscate și măcinate au fost aduse în soluție prin dezagregare cu microunde.
- Urina a fost recoltată o dată pe zi și s-a înregistrat cantitatea eliminată. O cotă de 10% din cantitatea de urină eliminată a fost depozitată în sticle de plastic cu dop înfiletat, în care s-a adăugat o soluție de acid sulfuric 0,1 N astfel încât să asigure un pH de 2-4.
- Serul - La începutul și la finalul experimentelor, de la fiecare animal aflat în studiu, s-au recoltat câte 7 mL de sange, din vena cavă anterioară, în tuburi cu heparină.

- Organe - La încheierea experimentului, purceii au fost sacrificați conform prevederilor din Legea privind protecția și bunăstarea animalelor (Dir. 93/119/CCE, Ordin 180/2006). La fiecare purcel sacrificat s-au recoltat probe de organe (ficat, rinichi, splina, inima, plămân, creier).

Pentru stabilirea metodei optime de aducere în soluție a analiților din probele de organe, s-a efectuat un *studiu comparativ* al rezultatelor obținute folosind trei metode de dezagregare: pe cale uscată, pe cale umedă și cu microunde. Acest studiu s-a făcut pe ficat folosind un material de referință certificat: Bovine liver CRM – BCR 185R. În urma comparării rezultatelor experimentale a fost aleasă pentru dezagregarea probelor biologice, metoda cea mai eficientă din punct de vedere analitic și economic, dezagregarea cu microunde.

3.2. STABILIREA CONDIȚIILOR OPTIME DE LUCRU PENTRU DETERMINAREA MICROELEMENTELOR Fe, Cu, Mn, Zn DIN PROBE BIOLOGICE

În vederea stabilirii condițiilor de lucru pentru determinările cantitative ale microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe biologice de material vegetal și organic prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără, s-au folosit reactivi de puritate analitică și aparatura de laborator corespunzătoare scopului stabilit. Pentru transvazare, diluții și stocare s-a folosit sticlărie clasa A.

3.3. ORGANIZAREA EXPERIMENTELOR DE NUTRIȚIE ANIMALĂ

Tehnica experimentală folosită în studiul privind absorbția și utilizarea microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din diferite surse vegetale utilizate în hrana purceilor după înțărare, s-a bazat pe folosirea cuștilor de digestibilitate în experimentele de tip *microtest* și a boxelor în experimentele de tip *macrotest*.

Experiențele de tip *microtest*, s-au desfășurat pe purcei masculi metiși în stare fiziologică corespunzătoare, sănătoși cu o capacitate normală de ingerare a hranei. Numărul de purcei/lot a fost de 4 purcei/lot. Experimentele au durat aproximativ 30 de zile, în funcție de perioada în care purceii înțărcați au atins greutatea de 30 de kg. Structura de bază a rației experimentale a fost aceeași pentru toți purceii aflați în experimente.

În cadrul experimentelor de tip *macrotest*, realizate s-au folosit ca material biologic 16 purcei metiși, după înțărare, cazați în cuști din fier beton, cu grătar pentru scurgerea dejecțiilor. Evacuarea dejecțiilor s-a realizat pe pernă de apă. Animalele au fost cazate câte 8 în fiecare boxă.

Porcii au fost cântăriți individual la intrarea în experiment, săptămânal și la sfârșitul experimentului. Pe parcursul experimentului s-a urmărit evoluția parametrilor zootehnici: greutatea corporală, sporul mediu zilnic, consumul mediu zilnic de furaje și consumul specific.

Capitolul 4

VALIDAREA METODELOR DE DETERMINARE A MICROELEMENTELOR Fe, Cu, Mn, Zn DIN PROBE BIOLOGICE

În acest capitol sunt prezentate rezultatele experimentale obținute și concluziile formulate pe baza acestora în cadrul experimentelor efectuate privind alegerea și validarea metodelor de dezagregare și determinare a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn, din probe biologice de natură animală și vegetală (Untea, 2010a; Untea 2012a).

4.1. ALEGEREA METODEI DE ADUCERE ÎN SOLUȚIE A MICROELEMENTELOR Fe, Cu, Mn, Zn DIN PROBE DE FICAT

Pentru a alege metoda optimă de dezagregare a probelor de ficat, în vederea determinării cantitative a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn, prin FAAS, s-au comparat rezultatele obținute prin folosirea a trei metode: dezagregarea pe cale uscată, dezagregarea pe cale umedă și dezagregarea cu microunde. Determinările au fost făcute folosind ca material de referință: Certified bovine liver (CRM – BCR 185R) (Untea, 2012a). Dintre rezultatele obținute prin aplicarea celor trei metode de aducere în soluție, la dezagregarea cu microunde, s-au obținut cele mai apropiate procente de recuperare de 100% și medii caracterizate de cele mai mici valori ale deviației standard.

4.2. VERIFICAREA ÎN LABORATOR A METODEI DE DETERMINARE A MICROELEMENTELOR Fe, Cu, Mn, Zn PRIN SPECTROMETRIE DE ABSORBȚIE ATOMICĂ CU FLACĂRĂ

Metoda de determinare a microelementelor prin spectrometrie de absorbție atomică cu flacără a fost verificată în laborator, urmărind o serie de parametri: linearitate, domeniu de lucru, sensibilitate, limită de detecție și limită de cuantificare (Untea, 2010a, Untea 2012a) în conformitate cu regulile internaționale (Validation of Analytical Procedures, 1995).

Verificarea parametrilor de performanță pentru metoda de determinare a fierului, cuprului, manganului și zincului prin FAAS

Linearitatea, domeniul de lucru și sensibilitatea metodei de determinare au fost evaluate prin trasarea dreptei de etalonare cu 10 puncte, folosind soluții standard cu concentrații cuprinse între 0,5 și 5 ppm pentru Fe ; 0,4 și 4 ppm pentru Cu ; 0,2 și 2 ppm pentru Mn și 0,1 și 1 ppm pentru Zn.

Limita de detecție și limita de cuantificare a metodei de determinare a fierului, cuprului, manganului și zincului prin FAAS

În scopul determinării limitei de detecție, LOD și a limitei de cuantificare, LOQ s-au preparat serii de 5 soluții, cu aceeași concentrație : soluția etalon entru Fe, cu concentrația cea mai mică

folosită pentru trasarea curbei de etalonare (0,5 ppm) a fost diluată de 50 ori (LOD = 0,03 ppm si LOQ = 0,22 ppm); soluția etalon pentru Cu, cu concentrația de 0,4 ppm a fost diluată de 40 ori (LOD = 0,014 ppm si LOQ = 0,06 ppm); soluția etalon pentru Mn, cu concentrația de 0,2 ppm a fost diluată de 20 ori (LOD = 0,04 ppm si LOQ = 0,16 ppm) și soluția etalon pentru Zn, cu concentrația de 0,1 ppm a fost diluată de 10 ori (LOD = 0,008 ppm si LOQ = 0,03 ppm).

4.3.VALIDAREA METODEI DE DEZAGREGARE CU MICROUNDDE

Validarea metodei de dezagregare cu microundde pentru probe de ficat

Metoda de aducere în soluție a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn folosind dezagregarea probei cu microundde a fost validată urmărind parametrii specifici protocolului: exactitate (acuratețe), precizia, repetabilitatea, reproductibilitatea și recuperarea. Pentru a calcula parametrii de performanță ai metodei, s-a preparat o serie de 8 probe de material de referință organic (ficat bovin CRM – BCR 185R) cu conținut certificat: 184 ppm Fe, 277 ppm Cu, 11,07 ppm Mn și 138,6 ppm Zn (**Untea, 2012a**).

Evaluarea **exactității** metodei de dezagregare cu microundde s-a determinat folosind 8 probe de material de referință certificate și apoi s-a determinat conținutul de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn prin spectrometrie de absorbție atomică.

Valorile obținute pentru **exactitate** au fost de 101,80% pentru Fe ; 99,09% pentru Cu; 98,13% pentru Mn și 98,18% pentru Zn. Valorile calculate se încadrează în intervalul impus de criteriul de performanță (bias $\pm 2\%$), astfel încât, metoda poate fi considerată validată pentru parametrul **exactitate**.

Datele obținute la determinarea **preciziei** metodei de determinare cantitativă a microelementelor (Fe, Cu, Mn, Zn) din probe de ficat prin FAAS după dezagregare cu microundde au fost :

- *Fier* - precizia în aceeași zi : RSD = 0,46% ; 0,60% ; 0,66%, iar în zile diferite : RSD = 1,48%;
- *Cupru* - precizia în aceeași zi : RSD = 1,50% ; 1,23% ; 1,03% iar în zile diferite : RSD = 1,18%;
- *Mangan* - precizia în aceeași zi : RSD = 1,87% ; 1,96% ; 1,74% iar în zile diferite : RSD = 1,92%;
- *Zinc* - precizia în aceeași zi : RSD = 1,68% ; 1,95% ; 1,62% iar în zile diferite : RSD = 1,81%.

Criteriul de performanță impus: valoarea maximă admisă a RSD este în conformitate cu ecuația Horwitz : $RSD = 2^{(1-0.5\lg C)}$. Pentru o concentrație de 1 ppm, RSD = 10,72%. În cazul metodelor validate s-au obținut valori RSD < 2%, deci criteriul de performanță a fost îndeplinit.

Datele obținute la determinarea **reproductibilității** metodei de determinare cantitativă a cuprului din probe de ficat prin FAAS după dezagregare cu microundde au fost :

- *Fier* - RSD = 1,93% pentru analistul 1 și RSD = 1,14% pentru analistul 2;
- *Cupru* - RSD = 1,50% pentru analistul 1 și RSD = 1,47% pentru analistul 2;
- *Mangan* - RSD = 1,98% pentru analistul 1 și RSD = 1,61% pentru analistul 2;
- *Zinc* - RSD = 1,72% pentru analistul 1 și RSD = 1,82% pentru analistul 2.

Valorile RSD < 2%, ceea ce arată că metoda poate fi considerată validată pentru acest parametru.

Din datele obținute la determinarea parametrului **regăsire** pentru metoda de determinare cantitativă a fierului, cuprului, manganului și zincului din probe de ficat prin FAAS după dezagregare cu microunde, au rezultat procente de regasire de 101,41 pentru Fe ; 101,72 pentru Cu ; 100,45 pentru Mn și 100,51 pentru Zn. Randamentul de regăsire a fost cuprins în intervalul $100\% \pm 2\%$, deci metoda poate fi considerată validată pentru acest parametru.

Validarea metodei de dezagregare cu microunde pentru probe de amestec de plante

Pentru a calcula parametrii de performanță ai metodei, s-a preparat o serie de 8 probe de material de referință vegetal (amestec botanic MIXED POLISH HERBS INCT-MPH-2) cu conținut certificat (460 ppm Fe, 7,77 ppm Cu, 191 ppm Mn și 33,5 ppm Zn).

La determinarea **exactității** metodei de determinare cantitativă a microelementelor din probe de material vegetal prin FAAS după dezagregare cu microunde, s-au obținut următoarele valori: 99,85% pentru Fe; 98,38% pentru Cu; 98,13% pentru Mn și 98,81% pentru Zn. Valorile obținute se încadrează în intervalul impus de criteriul de performanță (bias $\pm 2\%$), astfel încât, metoda poate fi considerată validată pentru parametrul exactitate.

Datele obținute la determinarea **preciziei** metodei de determinare cantitativă a microelementelor (Fe, Cu, Mn, Zn) din probe de material vegetal prin FAAS după dezagregare cu microunde au fost :

- *Fier* - precizia în aceeași zi : RSD = 0,38% ; 0,47% ; 0,99%, iar în zile diferite : RSD = 1,53%;
- *Cupru* - precizia în aceeași zi : RSD = 1,47% ; 1,66% ; 1,64% iar în zile diferite : RSD = 1,85%;
- *Mangan* - precizia în aceeași zi : RSD = 0,74% ; 1,18% ; 0,75% iar în zile diferite : RSD = 1,08%;
- *Zinc* - precizia în aceeași zi : RSD = 1,68% ; 0,94% ; 1,40% iar în zile diferite : RSD = 1,84%.

Valorile RSD < 2%, ceea ce arată că metoda poate fi considerată validată pentru acest parametru.

La determinarea **reproductibilității** metodei de determinare cantitativă a microelementelor (Fe, Cu, Mn, Zn) din probe de material vegetal prin FAAS după dezagregare cu microunde s-au obținut următoarele valori:

- *Fier* - RSD = 1,93% pentru analistul 1 și RSD = 1,14% pentru analistul 2;
- *Cupru* - RSD = 1,87% pentru analistul 1 și RSD = 1,10% pentru analistul 2;
- *Mangan* - RSD = 1,83% pentru analistul 1 și RSD = 0,99% pentru analistul 2;
- *Zinc* - RSD = 1,84% pentru analistul 1 și RSD = 1,83% pentru analistul 2.

Valorile RSD < 2%, ceea ce arată că metoda poate fi considerată validată pentru acest parametru.

Pentru metoda de determinare cantitativă a microelementelor (Fe, Cu, Mn, Zn) din probe de material vegetal (material de referință MIXED POLISH HERBS INCT-MPH-2) prin FAAS după dezagregare cu microunde, **regasirea** a fost de 100,33% pentru Fe; 100,63% pentru Cu; 98,21% pentru Mn și 101,27% pentru Zn. Randamentul de regăsire a fost cuprins în intervalul $100\% \pm 2\%$, deci metoda poate fi considerată validată pentru acest parametru.

4.4. CALCULAREA INCERTITUDINII DE MĂSURARE LA DETERMINAREA MICROELEMENTELOR Fe, Cu, Mn, Zn DIN PROBE DE MATERIAL BIOLOGIC PRIN SPECTROMETRIE DE ABSORBȚIE ATOMICĂ CU FLACĂRĂ, DUPĂ DEZAGREGARE CU MICROUND

Cuantificarea surselor de incertitudine

Scopul determinărilor experimentale efectuate este de a cuantifica incertitudinea apărută în etapele parcurse într-o analiză. Acest lucru poate fi făcut utilizând date experimentale proprii sau date obținute din presupuneri bine fundamentate.

- **Volumul (V)** - Incertitudinea compusă asociată folosirii unui balon de 50 mL, este alcătuită din trei incertitudini individuale: etalonarea, repetabilitatea, temperatura
- **Masa (m)** - Incertitudinea compusă asociată masei, $u(m)$ este alcătuită din: incertitudinea de linearitate; incertitudinea metrologică; incertitudinea de repetabilitate; incertitudinea de rezoluție.
- **Concentrația de microelement (C_0)** – Incertitudinea asociată concentrației de microelement din probele de natura animală și vegetală se calculează cu ajutorul curbei de etalonare corespunzătoare.

Pentru a calcula incertitudinea standard compusă a unui produs, $u(r)/r$ se compun incertitudinile standard care intervin în rezultatul final. Datele folosite pentru calculul incertitudinii de măsurare pentru probele de ficat bovin (P1) și de material vegetal (P2) sunt prezentate în tabelul 4.42.

Tabelul 4.42. Datele folosite pentru calcularea incertitudinii de măsurare a concentrațiilor de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn din probe de ficat bovin și material vegetal (materiale de referință)

	u(V)	u(m)	S_{xx}	S	u(c₀)	r	U(r)
FIER							
P1	0,029	0,00012	7,58	0,0076	0,089	187,31	0,179
P2	0,029	0,00012	7,58	0,0076	0,080	459,33	0,160
CUPRU							
P1	0,029	0,00012	5,75	0,153	1,669	274,48	3,338
P2	0,029	0,00012	0,63	0,029	0,357	7,65	0,713
MANGAN							
P1	0,029	0,00012	0,40	0,049	0,632	10,86	1,263
P2	0,029	0,00012	1,44	0,156	1,582	188,73	3,164
ZINC							
P1	0,029	0,00012	0,32	0,178	2,294	136,07	4,588
P2	0,029	0,00012	0,32	0,178	2,315	33,10	4,630

Din tabelul 4.42 se observa valori ridicate ale incertitudinii de măsurare în raport cu rezultatul determinării în cazul unor concentrații mici de microelement în proba de analizat. Unul din factorii care influențează valoarea finală a incertitudinii este domeniul de lucru, care trebuie stabilit în funcție de domeniul de concentrații în care se găsește analitul în proba de analizat.

4.5. STUDIU INTERLABORATOARE PENTRU VALIDAREA METODEI DE DETERMINARE A MICROELEMENTELOR Fe, Cu, Mn, Zn DIN PROBE DE NATURĂ VEGETALĂ ȘI STABILIREA CONȚINUTULUI DE MICROELEMENTE DIN PLANTE

Cunoasterea cu precizie a conținutului de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn în plantele folosite ca adaosuri în rațiile de hrană ale purceilor din experimentele efectuate în cadrul elaborării tezei de doctorat, este necesară pentru a calcula nivelul de includere al acestora în rațiile purceilor, în cadrul experimentelor de bilanț mineral (Untea, 2009; Untea, 2010b; Untea, 2010c; Untea, 2012d). La studiul au participat 7 laboratoare din 6 institute de cercetare din România.

Pentru stabilirea șirurilor de date omogene, a mediei robuste, a deviației standard și a incertitudinii s-a aplicat Algoritmul A (Thompson, 2006). Valorile asumate, deviațiile standard și incertitudinile asociate ale șirurilor de date corespunzătoare determinărilor de Fe, Cu, Mn și Zn din cele 3 plante analizate, sunt prezentate în tabelul 4.44.

Tabelul 4.44. Rezultatele obținute în urma folosirii algoritmului A pentru șirurile de date corespunzătoare determinării concentrațiilor de Fe, Cu, Mn și Zn din probe de plante recoltate din flora spontană

Element	Mărimi	Afină		Oregano		Colțul babei	
		Medie aritmetică mg/kg	Valoare asumată mg/kg	Medie aritmetică mg/kg	Valoare asumată mg/kg	Medie aritmetică mg/kg	Valoare asumată mg/kg
Fe	Medie	81,32	81,11	1886,47	1868,80	279,43	278,25
	Deviație standard	13,47	16,57	250,91	240,99	48,89	51,57
	Incertitudine		3,78		55,00		11,77
Cu	Medie	4,68	4,54	9,90	10,87	7,19	9,12
	Deviație standard	1,53	1,84	1,78	1,63	2,61	1,46
	Incertitudine		0,42		0,44		0,79
Mn	Medie	204,36	204,10	76,78	77,17	46,07	46,13
	Deviație standard	11,35	11,86	5,59	7,13	4,24	4,62
	Incertitudine		2,71		1,63		1,05
Zn	Medie	53,98	53,43	53,40	53,30	44,95	44,73
	Deviație standard	4,60	5,68	3,15	4,41	4,34	4,94
	Incertitudine		1,30		1,01		1,13

Pentru a evalua performanțele statistice ale participanților, s-au folosit scorurile Z, Z' și Zeta.

Parametri statistici calculați pentru determinarea concentrațiilor de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn în probe de afină au aratat că în cazul cuprului, pentru laboratoarele 1 și 7 s-au calculat valori zeta cuprinse între 2 și 3, respectiv mai mari decât 3. În probele de oregano și colțul babei, determinările manganului și zincului nu au aratat diferențe între performanțele participanților.

Capitolul 5

STUDIU CHIMICO-ANALITIC AL CORELAȚIEI ÎNTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU EXTRACTE VEGETALE SAU CU PLANTE DE CULTURĂ

În căutarea unor substanțe care să înlocuiască antibioticele pentru perioada de înțărcare a porceilor, s-a propus ca alternativă utilizarea extractelor din plante (Han, 2006).

Scopul acestui studiu realizat în cadrul tezei de doctorat a fost acela de a evalua efectul utilizării în hrana porceilor înțărcați, a unor extracte de plante sau plante de cultură asupra corelației dintre conținutul de microelemente al acestora și regăsirea lor în organismul animal.

5.1. STUDIU CHIMICO - ANALITIC AL CORELAȚIEI ÎNTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU INULINĂ

În cadrul proiectului internațional FP 6 „Feed for Pig Health”, s-a desfășurat un experiment de evaluare a compusului natural inulina, folosită ca alternativă la antibiotice. În acest proiect, rolul Institutului de Cercetare - Dezvoltare pentru Biologie și Nutriție Animală (IBNA) a fost de a studia biodisponibilitatea microelementelor conținute în compușii naturali folosiți cât și efectul lor asupra statusului mineral al animalelor.

Experimentul, efectuat în cadrul părții experimentale a tezei de doctorat, a avut loc în două ferme diferite pentru a putea fi evaluate, prin comparație, influențele date de condițiile ambientale. S-au folosit: o fermă care asigură condiții stricte de igienă și o fermă cu condiții obișnuite, specifice creșterii porcilor în scopuri comerciale.

Prin experiment s-a evaluat în ce măsură suplimentul de inulină adăugat în hrană influențează nivelul microelementelor în ficatul porceilor înțărcați, prin comparație cu lotul de porci hrănit numai cu rația de bază (Untea, 2012b, Untea, 2012c).

Rezultatele obținute în studiul corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrația acestora din dietele de hrană îmbogățite cu extracte vegetale

Au fost prelevate probe de ficat de la porcii sacrificați la începutul experimentului (ziua 0 de administrare a rației cu supliment de inulină), după 5 zile și după 11 zile (la finalul experimentului). Concentrațiile de microelemente în probele de ficat recoltate de la porcii sacrificați sunt prezentate în tabelele 5.3. și 5.4.

Tabel 5.3. Efectele suplimentelor de inulină asupra depozitelor de Cu, Mn și Zn din ficatul purceilor înțărcați (Fermă comercială)

Concentrații Probe	Lot martor			Lot experimental		
	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm
Premix	0,00	50,00	35,00	0,00	50,00	35,00
Materii furajere	6,44	34,88	2,44	6,44	34,88	2,44
Total furaj	6,44	84,88	37,44	6,44	84,88	37,44
Ficat - 28 de zile (LB)	207,14 ± 5,7	206,79 ± 8,7	10,41 ± 0,8	207,14 ± 5,7	206,79 ± 8,7	10,41 ± 0,8
Ficat - 33 de zile	144,12* ± 16,5	193,43 ± 17,1	10,85 ± 0,5	143,38* ± 10,8	188,57* ± 19,4	10,79 ± 0,6
Ficat - 39 de zile	26,62* ± 5,5	131,95* ± 2,8	10,29 ± 1,4	71,31* ± 7,6	128,15* ± 15,2	9,93 ± 1,4

Nota: * - semnificativ diferit față de LB ($p \leq 0.05$) (LB = linia de bază)

Nu s-au înregistrat diferențe semnificative ($p \leq 0,05$) între loturi în ceea ce privește concentrațiile de Zn din ficatul purceilor sacrificați la 33, respectiv 39 de zile. La finalul experimentului, concentrațiile de zinc din ficat au fost semnificativ mai mici ($p \leq 0,05$) decât cele determinate în probele de ficat prelevate de la purceii sacrificați la 33 de zile. Explicația este legată de conținutul de zinc din rație. Suplimentul de Zn adus prin premix în rațiile purceilor a fost de doar 50 ppm față de 80 ppm nivelul recomandat de National Research Council, NRC (1998), deoarece unul dintre obiectivele experimentului a fost acela de a reduce în rație cantitățile de microelemente cu rol de promotor de creștere (Cu, Zn). În consecință, a fost redusă și absorbția zincului din hrană, concentrația de Zn din ficat fiind direct proporțională cu nivelul din rație, comportare în concordanță cu literatura de specialitate (Carlson, 1999). Inulina din rație nu a avut efect asupra concentrațiilor de Zn din ficat.

Rezultatele experimentale au arătat că suplimentele de inulină în hrana de bază nu au influențat absorbția manganului în organismul purceilor.

Concentrațiile de Cu în ficatul purceilor la finalul experimentului au fost semnificativ mai mici decât valorile înregistrate la începutul studiului. Rezultatele obținute pentru concentrațiile de Cu în ficat, sunt în acord cu datele publicate în literatura de specialitate la aceeași categorie de purcei (Jondreville, 2005; Apgar, 1995). Rezultatele din tabelul 5.3. nu au arătat diferențe semnificative între loturi după primele 5 zile de tratament (vârsta de 33 zile), dar concentrațiile de Cu în ficat au fost semnificativ diferite ($p = 0.0002$) între loturi la finalul experimentului (vârsta de 39 zile). Aceste rezultate demonstrează că, deși nivelul de Cu din rație nu a diferit între loturi, suplimentul de inulină a îmbunătățit absorbția și utilizarea cuprului în organismul purceilor înțărcați. Evoluția concentrațiilor de Cu s-a încadrat pe o pantă descendentă pe parcursul experimentului, la final, concentrațiile de Cu din ficatul purceilor lotului M reprezentând doar 12,5% din concentrația de Cu înregistrată în ficatul purceilor sacrificați la începutul experimentului și pentru lotul experimental, 34,43% din valoarea inițială (tabelul 5.4.).

Nivelul de Cu din rație (6,44 ppm) corespunde cerințele purceilor, de 5 ppm (NRC, 1998), dar sursele de Cu din rație sunt doar materiile vegetale, biodisponibilitatea cuprului fiind redusă. O rație

deficitară în Cu determină o slabă activitate a superoxide dismutazei din ficat și celulele roșii (Iskandar, 2005) ceea ce poate conduce la un nivel scăzut de Cu în ficat.

Din figura 5.1. se observă că depozitele de Cu în ficatul purceilor din experimentul desfășurat în ferma comercială sunt mai mici decât în cazul fermei experimentale, atât pentru lotul martor, cât și pentru lotul experimental. În cazul fermei comerciale, concentrațiile de Cu din ficat au scăzut pe parcursul perioadei experimentale, în timp ce pentru purceii din ferma experimentală, după o tendință inițială descrescătoare, nivelul de Cu a crescut în săptămâna finală. O posibilă explicație ar putea fi absorbția intestinală mai bună a cuprului în cazul animalelor crescute în ferma cu condiții ideale de igienă.

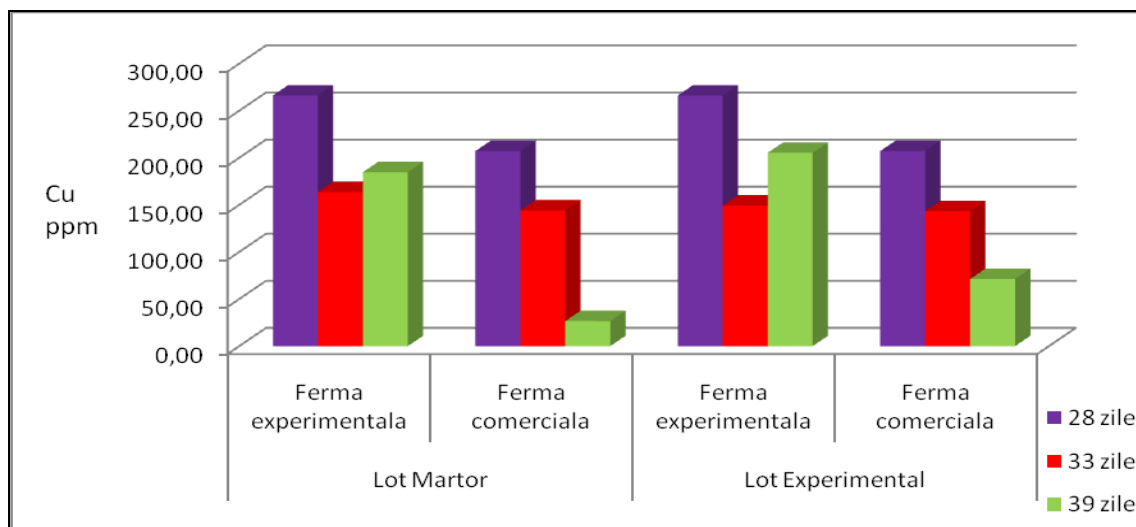


Fig. 5.1. Evoluția concentrațiilor de Cu în ficat în timp, în cazul purceilor crescuți în cele 2 ferme în care au avut loc experimentele

5.2. STUDIUL CORELAȚIEI ÎNTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIA ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU UN AMESTEC PE BAZĂ DE TOPINAMBUR ȘI FRUNZE DE CĂȚINĂ

În scopul evaluării efectelor adăugării în rația de hrană a purceilor înțărcați, a unui amestec de plante de cultură, asupra conținutului de microelemente din organismul purceilor din experiment, în vederea stabilirii de corelații între acestea, s-au organizat 2 experimente de nutriție animală. Sărurile de Fe, Cu, Mn, Zn care se folosesc de obicei ca adaosuri minerale în hrana animalelor, au fost înlocuite parțial în rațiile purceilor din experiment cu un amestec de plante de cultură, pe bază de topinambur și frunze de cătină (Untea, 2010d, Untea, 2010e; Untea, 2012f).

Materialele vegetale folosite la producerea acestui amestec rezultă ca subproduse industriale de la prepararea de suplimente alimentare naturale. S-a ales acest amestec pentru că topinamburul este bogat în inulină, o oligozaharidă care acționează la nivelul tractusului digestiv al purceilor

favorizând absorbția microelementelor, iar cățina este un adevărat premix vitamino mineral natural (Beveridge, 1999; Gutzeit, 2008).

Amestecul de plante pe bază de cătină și topinambur a fost testat la un nivel de 3% înglobare în nutrețul combinat în cadrul unui microtest folosind cuști metabolice individuale și în condiții de fermă în hala experimentală. Microelementele din materiile prime ale rației de bază depășesc necesarul. Insa datorita slabei lor biodisponibilitati, atât din furajele vegetale, datorită prezenței fitaților cât și din aditivii minerali, rațiile se suplimentează cu premixuri minerale. În ideea înlocuirii parțiale a sărurilor anorganice de Fe, Cu, Mn și Zn din rație cu suplimente provenite din amestecul de plante, fără a afecta performanțele bioproductive, rația experimentală, E, a avut nivelul microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din premix înjumătățit.

În figura 5.4. este prezentată evaluarea grafică a concentrațiilor de microelemente determinate în furajele administrate purceilor în cele 2 tipuri de experiment.

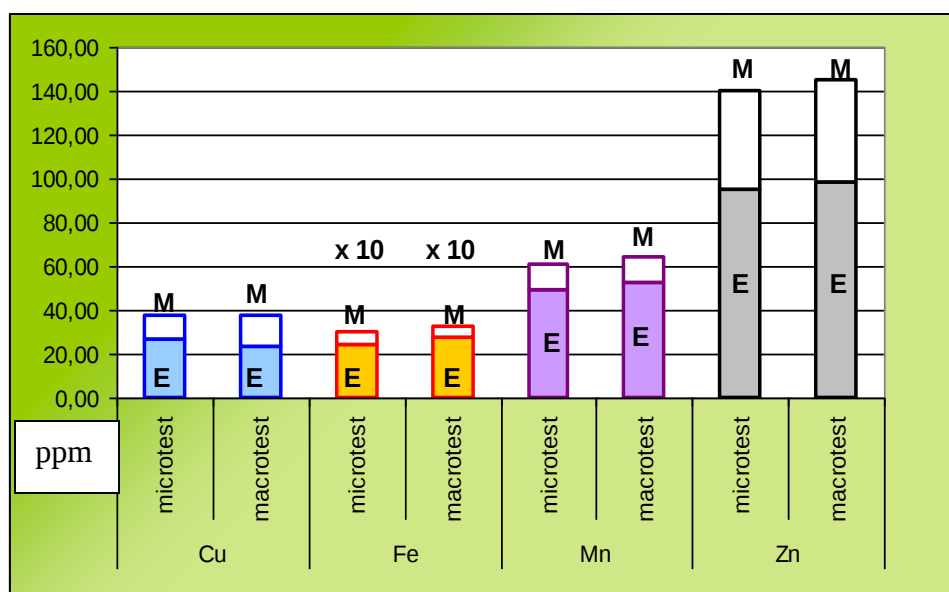


Fig. 5.4. Prezentarea grafică comparativă a concentrațiilor de microelemente determinate în furajele administrate purceilor în experimentele de tip microtest vs macrotest

Datele din figura 5.4. arată că, pentru toate cele patru microelemente studiate: Fe, Cu, Mn și Zn, atât în cazul experimentului de tip microtest, cât și a celui de tip macrotest, nivelul lor în furajele administrate loturilor experimentale, E (cu 3% amestec botanic în rație) a fost mai mic decât la lotul martor.

Rezultatele obținute în cadrul experimentului microtest au fost comparate cu cele obținute în condiții de fermă de către purceii din loturile martor, M și experimental, E. Nu au existat diferențe semnificative între mediile greutatea purceilor la începutul experimentelor. La final, au existat diferențe semnificative între purceii din loturile aparținând experimentului microtest față de cei din experimentul de tip macrotest. Nu au existat diferențe între purceii din loturile din același experiment.

Rezultatele obținute la determinările privind parametrii sângelui au aratat că, în ambele tipuri de experiment, valorile înregistrate în finalul experimentului se încadrează în limitele normalului pentru categoria de purcei care s-au aflat în experiment.

În cazul concentrațiilor de microelemente în fecale s-au înregistrat valori mai mari pentru purceii din loturile macrotestului pentru Cu, Mn și Zn, dar comparabile cu cele obținute în cazul microtestului, respectându-se proporția față de concentrațiile calculate prin raportare la lotul martor, M. În cazul fierului concentrațiile determinate în fecale au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari în condițiile experimentale specifice (de ferma) macrotestului.

În cazul fierului, pentru toate cele trei tipuri de organe prelevate de la purceii din ambele loturi ale macrotestului, concentrațiile au fost mai mici decât cele înregistrate la purceii din loturile microtestului. Această observație respectă rezultatele comparative obținute în cazul concentrațiilor regăsite în fecale. Concentrațiile de Fe din fecalele animalelor participante la macrotest au fost semnificativ mai ridicate decât în cazul celor din microtest. În acest context, depozitele de Fe în organele studiate sunt mai mari în cazul loturilor participante la microtest.

Concentrațiile de Cu în principalele organe de depozit au fost comparabile între cele două tipuri de experiment. Totodata ele au fost comparabile și între loturi, M respectiv E, cu excepția concentrației de Cu din rinichi în experimentul tip microtest unde concentrația de Cu la lotul E a fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mare decât la lotul M.

În cazul zincului, concentrațiile determinate în organele recoltate de la purceii ambelor loturi din macrotest au fost ușor mai mari decât cele determinate în organele purceilor din loturile microtestului. Diferențele însă nu au fost semnificative.

Capitolul 6

STUDIU CHIMICO-ANALITIC AL CORELAȚIEI ÎNTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU PLANTE DIN FLORA SPONTANĂ

În acest capitol, sunt descrise 2 experimente de digestibilitate și bilanț mineral realizate pe purcei, după întărcare, (10-30 kg) în vederea stabilirii biodisponibilității microelementelor Fe, Cu, Zn, Mn din nutrețuri combinate în care au fost incluși fitoaditivi. Fitoaditivii folosiți au fost: oregano, afine, colțul babei.

6.1. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE Fe, Cu, Mn, Zn DIN OREGANO, AFINĂ ȘI COLȚUL BABEI, PROVENITE DIN FLORA SPONTANĂ

Evaluarea potențialului antioxidant al plantelor recoltate din flora spontană

Rezultatele obținute la determinarea capacității de antioxidant a plantelor recoltate din flora spontană, arată că extractele alcoolice de oregano, fructe de afin și colțul babei conțin polifenoli cu activitate antioxidantă. Polifenolii din plantele menționate au capacitatea de a chelata ionii metalelor tranziționale și de a anihila radicalii liberi (Untea, 2010f).

Determinarea cantitativă a conținutului de Fe din probe de sol

Analiza probelor de sol prelevate din zona de recoltare a plantei oregano (zona Păușești) evidențiază un sol ușor acid (pH = 6,81) și o concentrație de fier mobil de 75,5 mg/kg. Valoarea pH-ului este caracteristică unui sol cu aciditate moderată.

Determinarea cantitativă a conținutului de Fe, Cu, Mn, Zn din componentele rațiilor

În scopul evaluării efectelor adăugării în rația de hrană a purceilor înțărcăți, a unui amestec de plante, asupra conținutului de microelemente din organismul purceilor din experiment, în vederea stabilirii de corelații între acestea, au fost organizate 2 experimente, tip microtest, pe purcei înțărcăți în care s-a studiat corelația între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrația acestora în dietele de hrană îmbogățite cu suplimente de plante recoltate din flora spontană (Untea, 2010g; Untea, 2011; Untea, 2012e).

În primul experiment desfășurat pe 3 loturi de purcei lotul M și loturile experimentale E1, E2 a fost testat oregano (sovârv) în rație, în prezența unor componente care să asigure rate diferite de includere a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn în premix. În premixul mineral administrat purceilor din lotul E1 nu au fost adăugate decât săruri de Zn – 0,5%, iar premixul administrat purceilor din lotul E2 a inclus microelementele Fe, Cu, Mn, Zn în proporție de 0,5% (jumătate din rata de includere a microelementelor din rația purceilor din lotul M).

În al doilea experiment, desfășurat pe 3 loturi de purcei (M, E1, E2) au fost testate amestecuri de oregano (inclusă în rație în proporție de 3%) și afină (inclus în rație în proporție de 1%) - lotul E1, respectiv oregano (inclus în rație în proporție de 3%) și colțul babei (inclus în rație în proporție de 1%) - lotul E2. Premixul administrat loturilor experimentale a inclus microelementele Fe, Cu, Mn, Zn în proporție de 0,5% (jumătate din rata de includere a microelementelor din rația lotului M).

Experimentul 1- Oregano recoltat din flora spontană are un conținut ridicat de Fe. Acest fapt dovedit prin analiză, așa cum s-a arătat în capitolul 4.5. a făcut ca nivelul de Fe în rația lotului E2 să fie ușor mai mare decât la lotul M, deși conținutul de sulfat de fier (II) din premixul rației lotului E2 a fost redus la jumătate față de nivelul rației lotului M. Prin reducerea cantităților de saruri anorganice în premix, rațiile loturilor experimentale au avut un conținut de Cu cu 68%, respectiv cu 34% mai mic decât lotul martor, Mn cu 46%, respectiv cu 22% mai mic decât lotul martor. În rațiile loturilor experimentale conținutul de oxid de zinc din premix a fost cu 50% mai mică față de nivelul celui din lotul martor. Cele două loturi experimentale nu s-au diferențiat între ele prin nivelul de Zn din rație, ci prin nivelurile celorlalte microelemente studiate: Fe, Cu, Mn.

Experimentul 2 - Plantele introduse în rațiile experimentale au suplini o parte din cantitatea de fier adusă în mod obișnuit prin premix astfel încât rațiile acestor loturi au avut un conținut de Fe cu doar 13-16% mai mic față de M. Prin reducerea cantității de sulfat de Cu (II), respectiv de sulfat de Mn (II) în premix, rațiile loturilor experimentale au avut un aport de Cu cu 73-75%, respectiv pentru Mn cu 32-34% mai mic decât cele ale lotului M. În rațiile loturilor experimentale cantitatea de oxid de zinc din premix a fost cu 50% mai mică față de nivelul lotului M. Cele două loturi experimentale nu au diferit între ele prin nivelul de Zn din rație și nici prin nivelul celorlalte microelemente studiate (Fe, Cu, Mn) și au avut un conținut de Zn cu aproximativ 35% mai mic față de lotul martor.

6.2. STUDIUL CORELAȚIEI ÎNTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU OREGANO

Experimentul prezentat în acest capitol a fost de tip microtest, fiind realizat într-o hală experimentală echipată cu cuști de digestibilitate (Untea 2010g, Untea 2011, Untea 2012e).

Valorile sporului mediu nu s-au diferențiat semnificativ ($P \leq 0,05$), chiar în condițiile reducerii conținutului de săruri anorganice de Fe, Cu, Mn și Zn în premixurile rațiilor loturilor experimentale E1 și E2 față de lotul M. Rezultatele obținute la determinările privind parametrii hematologici și biochimici ai sângelui arată că, în cazul purceilor din cele 3 loturi studiate, valorile înregistrate la finalul experimentului se încadrează în limitele normalului pentru specie și categorie (Pârvu, 2003). Cu toată variația biologică a purceilor, nu s-au înregistrat diferențe semnificative ($P \leq 0,05$) între loturi.

Datele bilanțului mineral

Pentru studiul corelației între conținutul de microelemente din organismul purceilor și concentrația acestora din dietele de hrană îmbogățite cu oregano, pe baza determinărilor din hrana și excreta (fecale și urina) s-a alcătuit un bilanț mineral.

Rezultatele de bilanț au aratat că ingesta de Fe la purceii din lotul E1 a fost aproximativ cu 12 % mai mică decât la cei din lotul M. La purceii din lotul E2, ingesta a fost mai mare cu 8% față de cei din lotul M, datorită concentrației mari de fier existente în oregano. În aceste condiții, cantitatea de Fe eliminată prin fecale a fost în valoare absolută mai mică la purceii din lotul E1 (aproximativ 7%), dar nediferit semnificativ ($P \leq 0,05$) față de purceii din celelalte 2 loturi studiate. Coeficienții de absorbție și retenție ai fierului la lotul M au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari față de cei înregistrați la lotul E1, fără a se înregistra însă diferențe semnificative ($P \leq 0,05$) față de E2. Faptul că nu au existat diferențe între coeficienții de absorbție ai fierului la M comparativ cu E2, s-ar putea explica prin nivelurile reduse de Mn și Zn în aceste rații, elemente competitive cu fierul în procesul de absorbție la nivelul tractusului digestiv (Hill, 1983).

Ingesta de Cu la lotul experimental E1, fără premix mineral, dar cu supliment de 3% oregano, a fost, cu 74% mai mică decât pentru M, iar la lotul E2 care a avut în premix jumătate din cantitatea administrată lotului M și 3% oregano, cu 46% mai mică. În aceste condiții, cantitatea de Cu eliminată prin fecale a fost cu 61,4% mai mică decât la purceii din lotul martor, pentru lotul E1 și cu 35% mai mică decât la purceii din lotul martor pentru celălalt lot experimental, E2. Așa cum era de așteptat, coeficienții de absorbție și de retenție ai cuprului la purceii din lotul M sunt semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari decât la loturile experimentale. Și între loturile experimentale au existat diferențe semnificative ($P \leq 0,05$) pentru coeficienții de absorbție și de retenție calculați. Datele de bilanț mineral au aratat că valorile coeficienților de absorbție se încadrează în plaja de valori raportată în literatura de specialitate (Veum, 2004 și Carlson, 1999) la aproximativ aceeași categorie de animale, în cazul administrării unei rații cu un conținut de 16,5 ppm Cu.

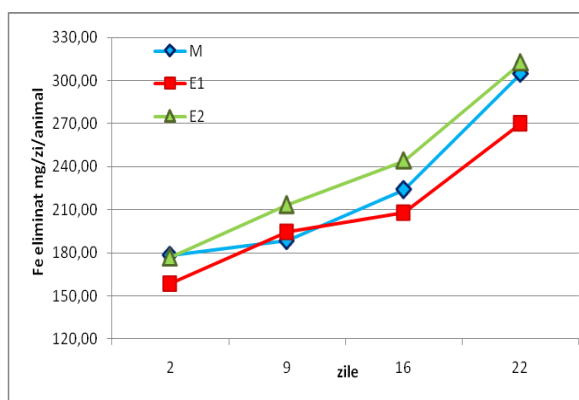
În cazul manganului, ingesta la lotul E1, a fost, cu 57% mai mică decât pentru purceii lotului martor, iar la lotul E2, cu 21% mai mică. În aceste condiții, pentru lotul E1, cantitatea de Mn eliminată prin fecale a fost cu 40% mai mică decât pentru lotul M, și cu 30% mai mică pentru celălalt lot experimental E2. Coeficienții de absorbție și de retenție ai manganului determinați pentru lotul M sunt semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari decât la loturile experimentale. Și între loturile experimentale au fost diferențe semnificative în ceea ce privește valoarea coeficienților de absorbție și retenție calculați, obținându-se valori mai mari pentru lotul E2.

Rezultatele bilanțului mineral au aratat că ingesta de Zn la purceii loturilor experimentale a fost cu 25% mai mică decât la purceii lotului martor. Cantitatea de Zn eliminată prin fecale a fost 17-18% mai mică decât la purceii lotului martor. Coeficienții de absorbție și retenție ai zincului la lotul purceii lotului martor sunt cu doar 5-10% mai mari decât la purceii din loturile experimentale (tabelul 6.24.). Se remarcă faptul că purceii lotului E1 au avut coeficienți de absorbție mai mici ($P \leq 0,05$) decât purceii celorlalte două loturi, M și E2, deși loturile experimentale au avut același nivel de Zn în rație. Explicația ar putea consta în efectul lipsei de Cu și Fe adăugat în rația lotului E1. Coeficienții de absorbție obținuți pentru Zn sunt mai ridicați decât valorile raportate în literatură în experimente desfășurate în condiții similare (Veum, 2004 – 32,8% și Carlson, 2004 – 20,9%, Revy, 2002 – 26,9%).

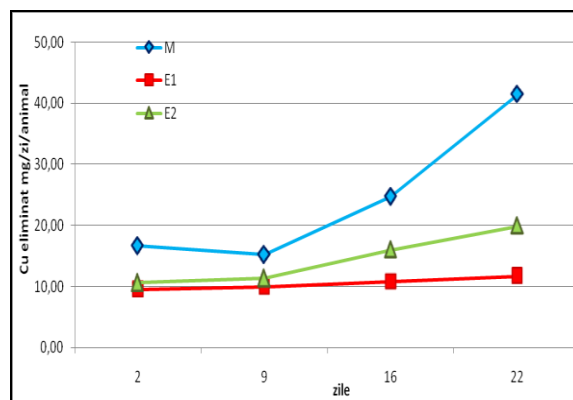
Pentru a cuantifica relația existentă între cantitățile de microelemente ingerate și cele eliminate prin fecale și urină, s-au stabilit următoarele ecuații de regresie și coeficienți de corelație:

pentru Fe: $R^2 = 0,9918$; Cu: $R^2 = 0,9918$; Mn: $R^2 = 0,9895$; Zn: $R^2 = 0,9960$. Datele prezentate mai sus au aratat că cele trei loturi studiate au respectat aceeași relație de proporționalitate între ingesta și excreta pentru toate microelementele studiate.

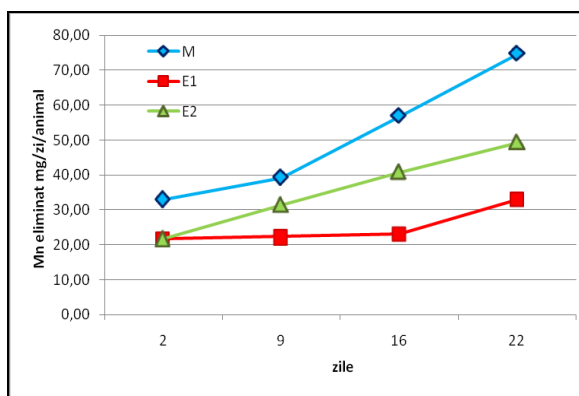
Deoarece pe durata experimentului, bilanțul mineral a fost efectuat săptămânal, s-a putut urmări evoluția în timp a eliminărilor de microelemente prin fecale. Eliminările de Fe prin fecale la lotul E2 au fost mai mari pe toată durata experimentului, față de cantitățile eliminate de purceii lotului M, fapt considerat normal având în vedere că, nivelul de Fe ingerat la lotul E1 a fost mai mare decât la lotul M. O situație diametral opusă s-a înregistrat pentru lotul E1, unde o cantitate mai mică de Fe în ingestă, față de lotul M, a condus la diminuarea valorilor de Fe excretate. Eliminările de Cu și Mn prin fecale la purceii din lotul M au fost mai mari încă din perioada de început a experimentului, fapt considerat normal, având în vedere ca la lotul M cantitățile de Cu, respectiv Mn ingerate au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari decât la loturile experimentale. Cele mai mici valori de Cu și Mn excretate prin fecale au fost înregistrate la lotul E1 care a primit hrana fara adaos de premix mineral. Cantitățile cele mai mari de Zn eliminate prin fecale s-au înregistrat la purceii din lotul M, din cauza nivelului redus de Zn în rațiile loturilor E1 si E2.



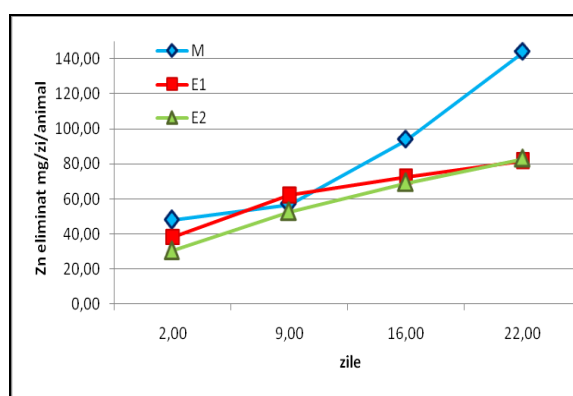
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 6.6. Evoluția eliminării de microelemente prin fecale, în timp: (a) fier, (b) cupru, (c) mangan, (d) zinc

Depozitele de Fe în ficat, splina, rinichi, inima, plaman și creier, determinate la finalul experimentului, nu au atins, la niciunul dintre cele 3 loturi, valoarea de la începutul experimentului. Fapt firesc, având în vedere: depozitele de microelemente cu care se nasc purceii; capacitatea mare de asimilare din perioada pre-înțârcare; cantitatea de Fe administrată injectabil în a 2 a zi de viață, cu scopul de a preveni anemiile (practică obișnuită în toate fermele). Cele mai mari concentrații de Fe s-au găsit în ficat și splină. Nivelul de Fe în ficatul purceilor din lotul E1 a fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mic decât cel înregistrat pentru purceii din loturile M și E2. Concentrațiile de Cu în organele de depozit ale purceilor la începutul experimentului au fost atinse și la final pentru purceii din lotul M. Cele mai mari concentrații de Cu au fost în rinichi, inimă și ficat. Între loturile experimentale E1, E2 nu au existat diferențe semnificative. Cu excepția creierului, concentrațiile de Cu determinate în organele purceilor din lotul M au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari față de cele determinate la loturile E1 și E2. Concentrațiile de Mn în organele purceilor au depășit la finalul experimentului concentrația determinată la începutul studiului. Cele mai mari concentrații de Mn s-au găsit în ficat, rinichi și plămâni. Între loturile studiate nu au existat diferențe semnificative ($P \leq 0,05$). Concentrațiile de Zn în organele purceilor nu au depășit la finalul experimentului nivelul de Zn înregistrat la începutul studiului. Cele mai mari concentrații de Zn s-au găsit în ficat unde valorile determinate la lotul M au fost semnificativ diferite ($p \leq 0,05$) față de valorile determinate la loturile experimentale. În celelalte organe, concentrațiile de Zn au fost comparabile între loturi.

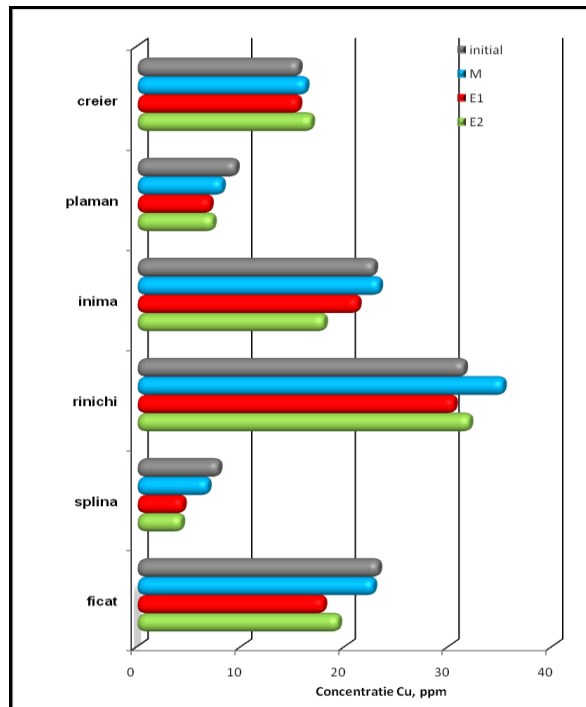
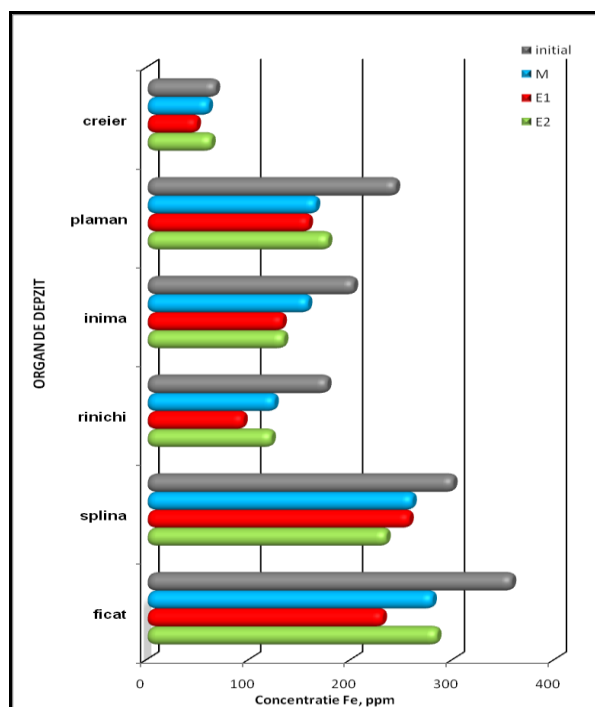
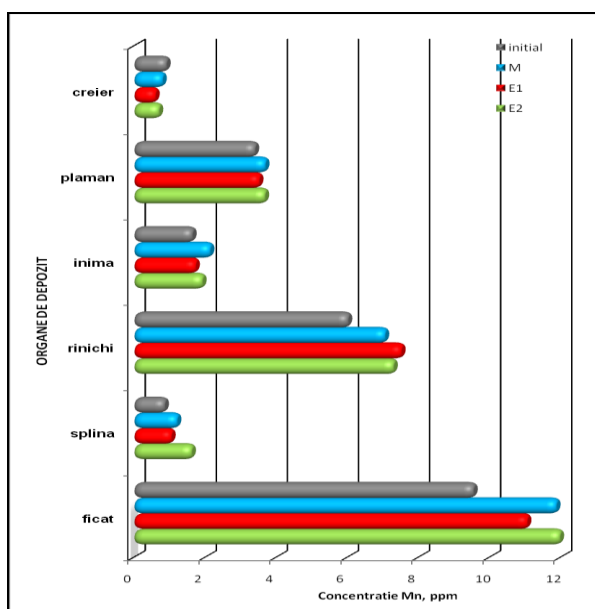
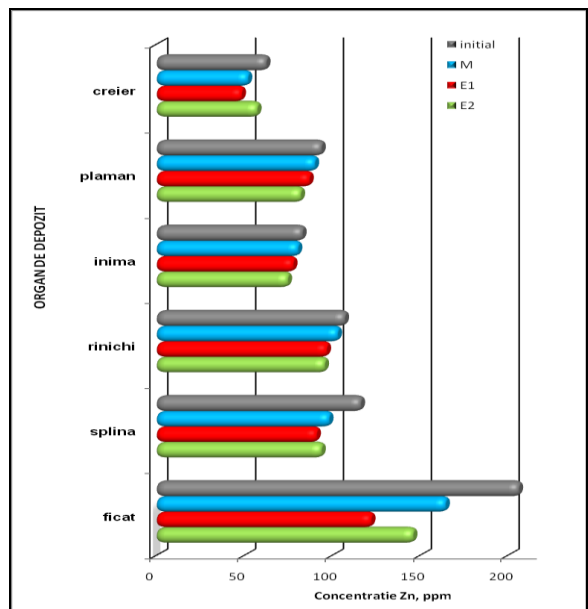


Fig. 6.10. Valori medii ale concentrațiilor de Fe, Cu, determinate în organele de depozit



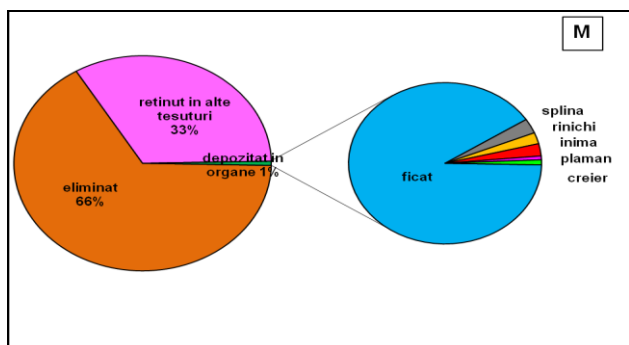
(c)



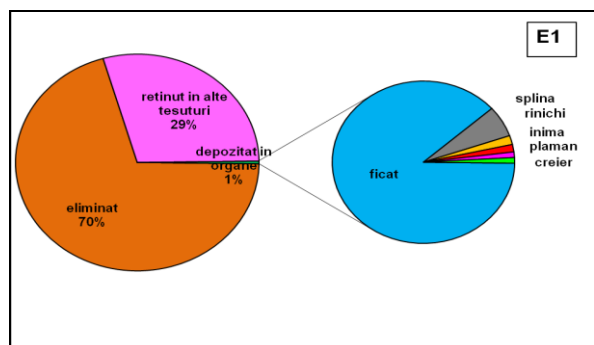
(d)

Fig. 6.10. Valori medii ale concentrațiilor de Mn, Zn determinate în organele de depozit

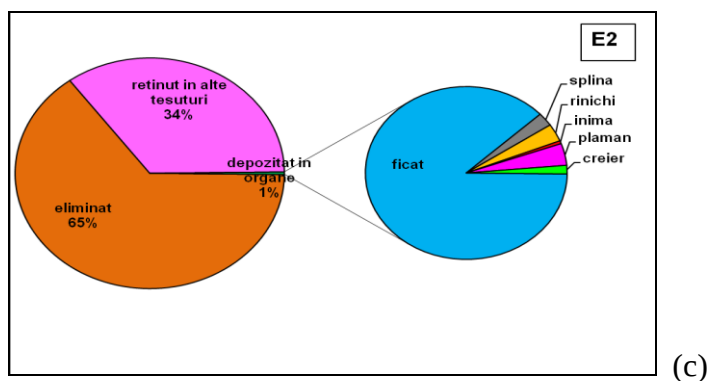
În figurile 6.11-6.14 sunt prezentate rezultatele proceselor de repartiție a cantităților de microelemente ingerate, pentru toate cele 3 loturi studiate.



(a)



(b)



(c)

Fig. 6.11. Reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale privind repartiția fierului ingerat în organismul purceilor și în excretă: (a) M; (b) E1; (c) E2

Cantitatea de microelement reținută în organismul animalului s-a considerat (Pop, 2006) ca fiind diferența dintre cantitatea de element mineral ingerată și cantitatea excretată prin fecale și urină. Din cantitatea reținută în organism s-a considerat cantitatea de microelement depozitată în organe (ficat, splină, rinichi, plămân, inima, creier) pe parcursul experimentului (diferența dintre cantitățile calculate pe baza rezultatelor experimentale la finalul experimentului și cantitățile calculate la începutul experimentului); prin diferența (cantitate de microelement reținută minus cantitatea de mineral depozitată în organe) s-a calculat cantitatea de microelement reținută în alte țesuturi.

Cel mai mare procent de Fe eliminat s-a înregistrat pentru purceii din lotul E1. În organe a fost depozitat sub 1% din fierul ingerat, această cantitate fiind repartizată preponderent în ficat.

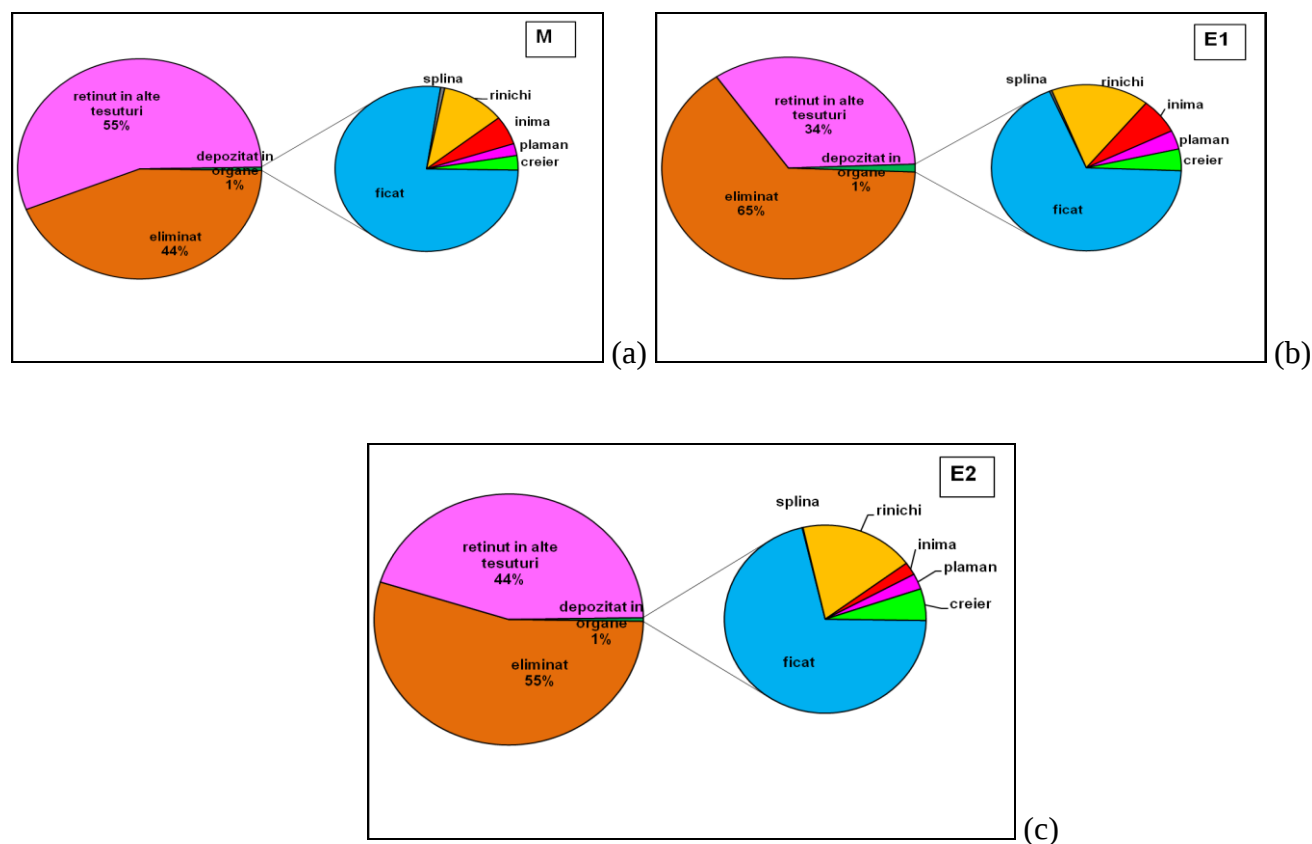


Fig. 6.12. Reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale privind repartiția cuprului ingerat în organismul purceilor și în excretă: (a) M; (b) E1; (c) E2

Procentul cel mai important de Cu reținut în organismul animal a fost înregistrat pentru purceii din lotul M, unde și cantitatea ingerată a fost cea mai însemnată. Ficatul deține cea mai mare parte a cuprului depozitat în organe fiind urmat, ca valoare, de cantitățile depozitate în rinichi.

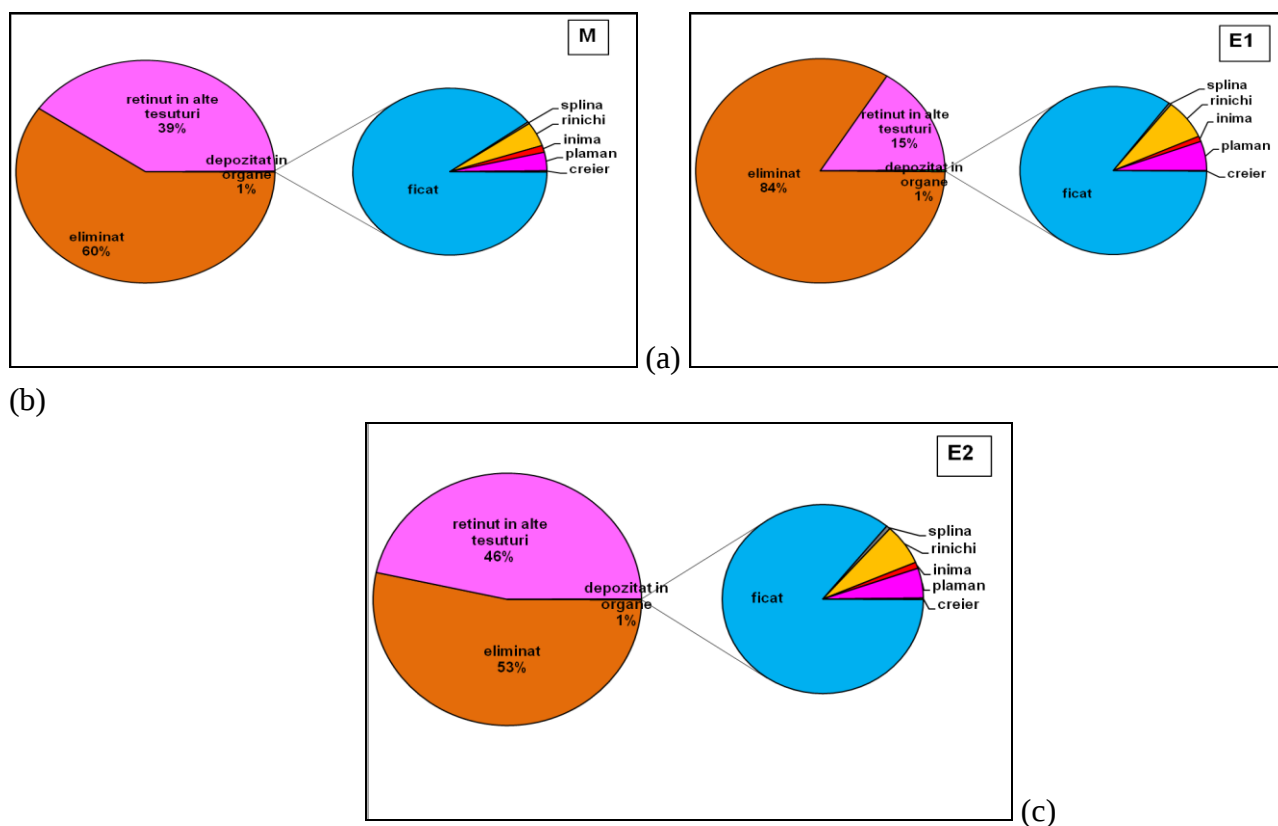


Fig. 6.13. Reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale privind repartitia manganului ingerat în organismul purceilor și în excretă: (a) M; (b) E1; (c) E2

Ca și în cazurile fierului și cuprului, cel mai mare procent de mangan eliminat a fost înregistrat pentru lotul cu cea mai mica cantitate de Mn ingerată. Ponderea cea mai mare de Mn repartizat în organe o deține ficatul.

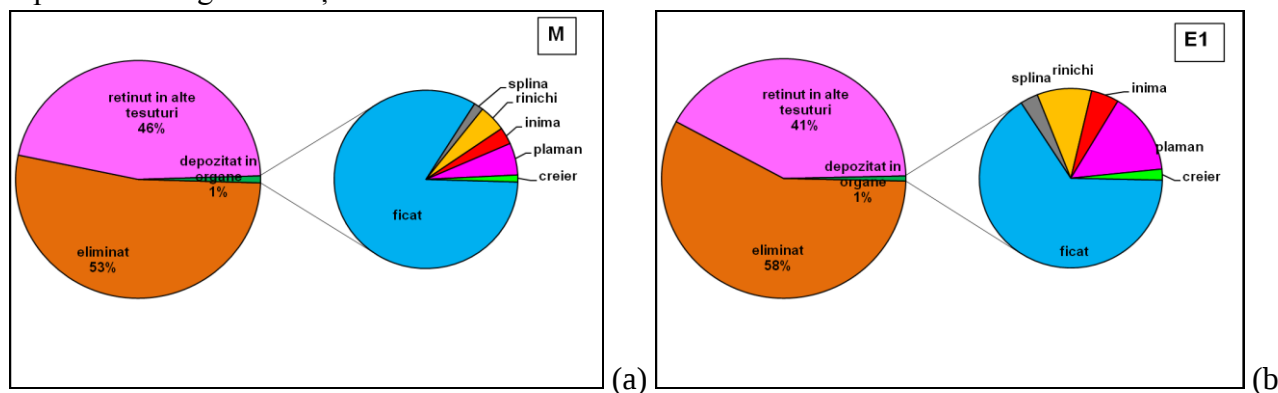


Fig. 6.14. Reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale privind repartitia zincului ingerat în organismul purceilor și în excretă: (a) M; (b) E1;

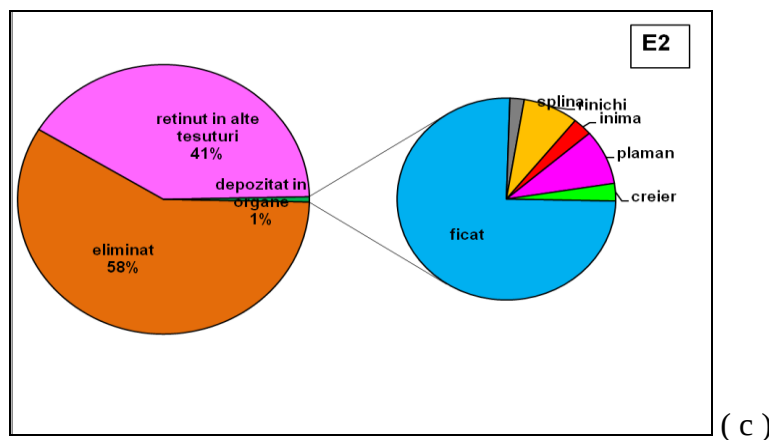


Fig. 6.14. Reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale privind repartitia zincului ingerat în organismul purceilor și în excretă: (c) E2

Din figurile 6.14. se observă că cel mai mare procent de Zn eliminat s-a înregistrat pentru lotul E1 deși cantitatea de Zn ingerată nu a diferit între loturile experimentale. În ceea ce privește cantitățile de microelemente depozitate în organe pe parcursul experimentului, ponderea cea mai mare o ocupă ficatul. Ca și în cazul celorlalte microelemente studiate, explicația este dată de faptul că ficatul are cea mai mare masă, dintre organele studiate, dar și cea mai importantă concentrație de microelement.

Cea mai mare concentrație de microelemente a fost determinată în ficat (de 2-3 ori mai mare decât în cazul altor organe). În urma raportării la masa de țesut organic, s-a confirmat faptul că ficatul este depozitul principal de microelemente al organismului.

Cantitatea de Fe depozitată în organe de către purceii din lotul M este de aproximativ 1,7 ori mai mare decât în cazul loturilor experimentale. Eficiența utilizării fierului din sursa anorganică prezentă în hrana purceilor din lotul M a fost mai ridicată.

În cazul cuprului, valorile raportărilor procentuale dintre cantitatea depozitată și cea ingerată, cât și dintre cantitatea depozitată și cea reținută în organism arată ca: $E1 > M > E2$, respectiv $E1 > E2 > M$. Pe această bază se poate trage concluzia că un nivel mai mic de Cu în rație a condus la o utilizare mai eficientă a acestuia, mai ales în cazul folosirii adaosurilor de plante în rație.

Si pentru Mn, valorile numerice ale raportului dintre cantitatea depozitată și cea ingerată, cât și dintre cantitatea depozitată și cea reținută în organism au fost favorabile lotului E1: $E1 > M > E2$. Pe această bază se poate trage concluzia că un nivel mai mic de Mn în rație a condus la o utilizare mai eficientă a acestuia.

O valoare a ingestiei de 1,3 ori mai mare la purceii din lotul M, decât la cei din cele două loturi experimentale a condus la cantități de Zn depozitate în organele animalelor lotului M de aproximativ 2 ori mai mari decât în cazul loturilor experimentale.

6.3. STUDIUL CORELAȚIEI ÎNTRE CONȚINUTUL DE MICROELEMENTE DIN ORGANISMUL ANIMAL ȘI CONCENTRAȚIILE ACESTORA DIN DIETELE DE HRANĂ ÎMBOGĂȚITE CU AMESTECURI DE PLANTE DIN FLORA SPONTANĂ

Valorile sporului mediu zilnic calculate pentru loturile martor, M și experimental, E2 (lot cu amestec de oregano și afină), nu s-au diferențiat semnificativ ($P \leq 0,05$), chiar în condițiile reducerii conținutului de săruri anorganice de Fe, Cu, Mn și Zn în premixurile rațiilor. Deși rația lotului E1 (rația cu amestec de oregano și colțul babei) a avut inclus același tip de premix ca și lotul E2, performanțele de creștere ale purceilor acestui lot au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mici decât cele ale animalelor lotului M și lotului E2. Aceste rezultate au fost cauzate de consumul semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mic înregistrat pentru acest lot. Explicația lipsei de apetit a purceilor lotului E1 este că, colțul babei (planta cu spini mici) deși a fost măcinată de 2 ori înainte de includerea în furaj, a dat totuși acestuia o consistență rugoasă, iritantă pentru porci.

Parametrii hematologici și biochimici se încadrează în intervalul normal de valori, pentru porcii din loturile M și E2. În cazul lotului E1, s-a determinat un număr de leucocite în sânge sub limita inferioară a intervalului normal ceea ce ar putea indica o stare infecțioasă instalată în organism sau un tip de anemie.

Datele bilanțului mineral

Conform rezultatelor bilanțului, ingesta de Fe la porcii din lotul E1 a fost, aproximativ cu 60 % mai mică decât la cei din lotul M datorită consumului mic de hrană. La porcii din lotul E2, ingesta a fost mai mare cu 18,5% față de cei din lotul M datorită aportului important de fier adus în hrană de plantele adăugate. În aceste condiții, cantitatea de Fe eliminată prin fecale a fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mică la loturile E1 (aproximativ cu 55%) și E2 (aproximativ cu 15%) față de M. Coeficienții de absorbție și retenție ai fierului determinați la porcii din lotul M au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari față de coeficienții determinați la porcii din loturile E1 și E2.

În cazul cuprului, ingesta la lotul E2 (fără premix mineral dar cu supliment de 3% oregano și 1% afină), a fost cu 75% mai mică decât pentru M, iar la lotul E1 (fără premix mineral dar cu supliment de 3% oregano și 1% colțul babei) a fost cu 85% mai mică decât pentru M. Ca și în cazul fierului, diferența dintre ingesta celor două loturi experimentale s-a datorat unui consum de furaj mai mic înregistrat pentru porcii din lotul E1. În aceste condiții, cantitatea de Cu eliminată prin fecalele porceilor din lotul E2 a fost cu 56% mai mică decât în cazul porceilor din lotul M. Cantitatea de Cu eliminată prin fecale de porcii din lotul E1 a fost cu 75% mai mică decât cea a porceilor din lotul M. Așa cum era de așteptat, coeficienții de absorbție și retenție ai cuprului la lotul M sunt semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari decât la loturile experimentale. Și între loturile experimentale au fost diferențe semnificative în ceea ce privește valoarea coeficienților de absorbție și retenție calculați, în favoarea lotului E2.

Rezultatele bilanțului mineral arată că ingesta de Mn la purceii din lotul E2 a fost, cu 55% mai mică decât la cei din lotul martor. La lotul E1, ingesta de Mn a fost cu 75% mai mică decât la lotul M. Diferența între loturile experimentale a fost determinată de consumul diferit de hrană. Cantitatea de Mn eliminată prin fecale la lotul E2 a fost cu 52% mai mică decât la lotul M, iar pentru purceii de la E1 cu 62% mai mică decât la lotul M. Coeficienții de absorbție și retenție ai manganului la lotul M sunt semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari decât la loturile experimentale. Și între loturile experimentale au fost diferențe semnificative ($P \leq 0,05$) în ceea ce privește valoarea coeficienților de absorbție și retenție calculați, în conformitate cu datele obținute pentru ingesta și excreta.

Ingesta de Zn la purceii din lotul E2 a fost cu 25% mai mică decât pentru purceii din lotul M, iar la animalele din lotul E1 cu 85% mai mică. Diferență între loturile experimentale a fost adusă de consumul diferit de hrană. Cantitatea de Zn eliminată prin fecale la lotul E2 a fost cu 19% mai mică decât la lotul M, iar pentru purceii din lotul experimental E1 cu 75% mai mică decât pentru animalele din lotul M. Coeficienții de absorbție și retenție ai zincului la purceii din lotul M sunt mai mari decât la purceii din lotul E2, dar nesemnificativ. Valorile calculate pentru aceeași coeficienti în cazul purceilor din lotul E1 au diferit semnificativ față de animalele din loturile M și E2.

Cu ajutorul datelor de bilanț au fost construite graficele din figura 6.19. Ele evidențiază corelația deosebit de bună între cantitatea de microelement ingerată și cea excretată de animalele participante la experiment.

Pentru a cuantifica relația existentă între cantitățile de microelemente ingerate și cele eliminate prin fecale și urină, s-au considerat ecuațiile de regresie și coeficienții de corelație: pentru Fe: $Y = 0,5061X + 54,918$; $R^2 = 0,9964$; pentru Cu: $Y = 0,3764X + 3,1152$; $R^2 = 0,9956$; pentru Mn: $Y = 0,5133X + 5,8562$; $R^2 = 0,9889$; pentru Zn: $Y = 0,4727X + 9,5494$; $R^2 = 0,9970$.

În cazul celor trei loturi studiate s-a respectat aceeași relație de proporționalitate între ingesta și excreta pentru toate microelementele studiate. Cantitățile mici de microelemente ingerate cât și de microelemente excretate sunt evidențiate prin situarea punctului corespunzător lotului E1 în partea inferioară a graficului.

Deoarece pe durata experimentului, bilanțul mineral a fost efectuat săptămânal, se poate urmări evoluția eliminărilor de microelemente prin fecale (figura 6.20.).

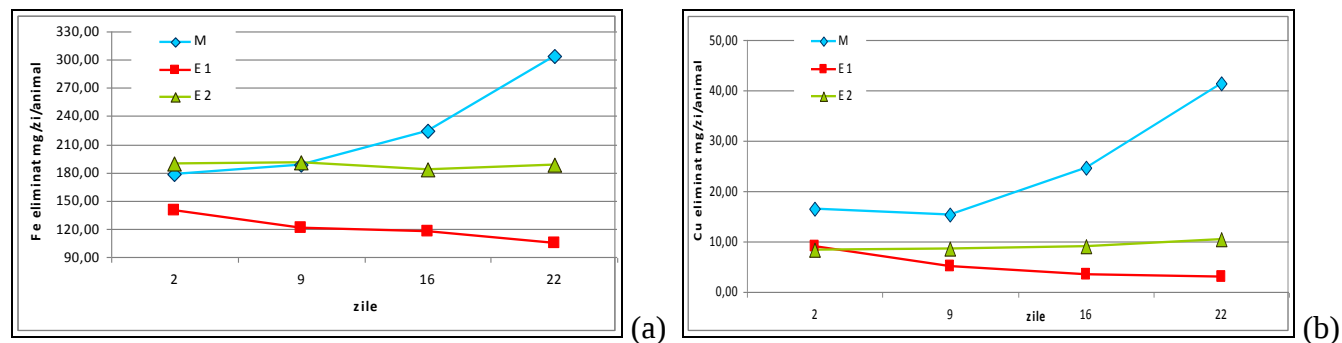
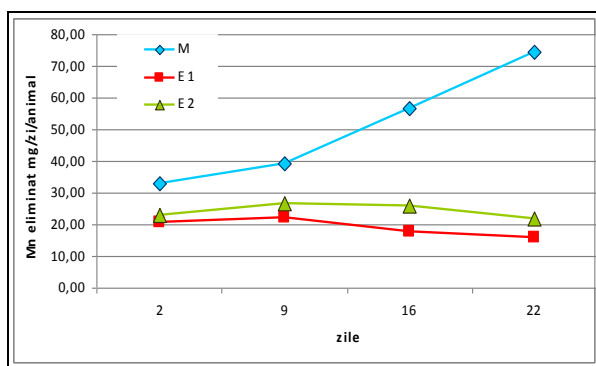
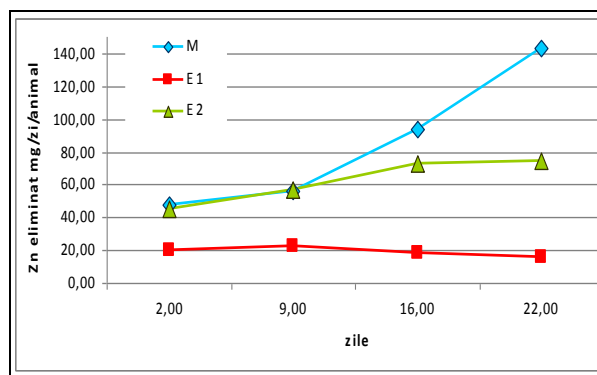


Fig. 6.20. Evoluția eliminării de microelemente prin fecale, în timp: (a) fier, (b) cupru



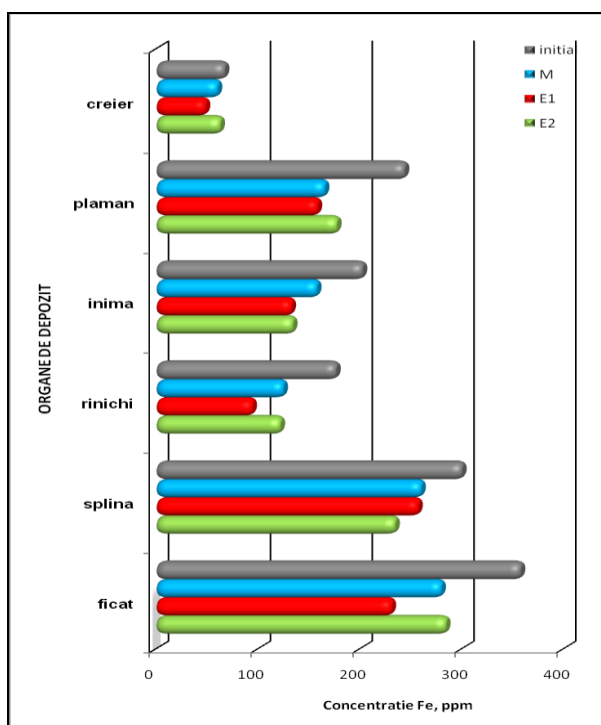
(c)



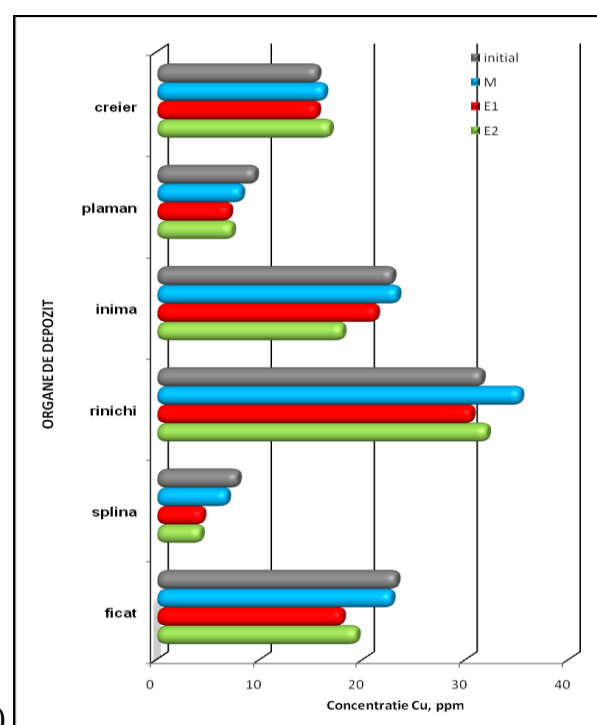
(d)

Fig. 6.20. Evoluția eliminării de microelemente prin fecale, în timp: (c) mangan, (d) zinc

Canțitățile mici de Fe ingerate se regăsesc, proporțional și în canțitățile eliminate, graficul corespunzător lotului E1 având o alură descendentă. Tendința eliminărilor de Fe pentru purceii din lotul M este ascendentă, în timp ce graficul corespunzător purceilor din lotul E2 este constant în timp. Eliminările de Cu și Mn prin fecale la purceii din lotul M au fost mai mari încă din perioada de început a experimentului, datorita unor concentrații mai mari de microelemente în furaj. Tendința descendentă a eliminărilor de Cu și Mn în timp este similară observațiilor făcute în cazul fierului. Eliminările de Zn prin fecale la purceii din lotul M depășesc ca valoare canțitățile corespunzătoare animalelor din cele două loturi experimentale, fiind astfel evidențiat nivelul redus de Zn din rațiile loturilor E1 și E2. Cele mai mici canțități eliminate pe tot parcursul experimentului caracterizează purceii din lotul E1 în conformitate cu canțitățile ingerate.



(a)



(b)

Fig. 6.21. Valori medii ale concentrațiilor de Fe (a), Cu (b), determinate în organele de depozit

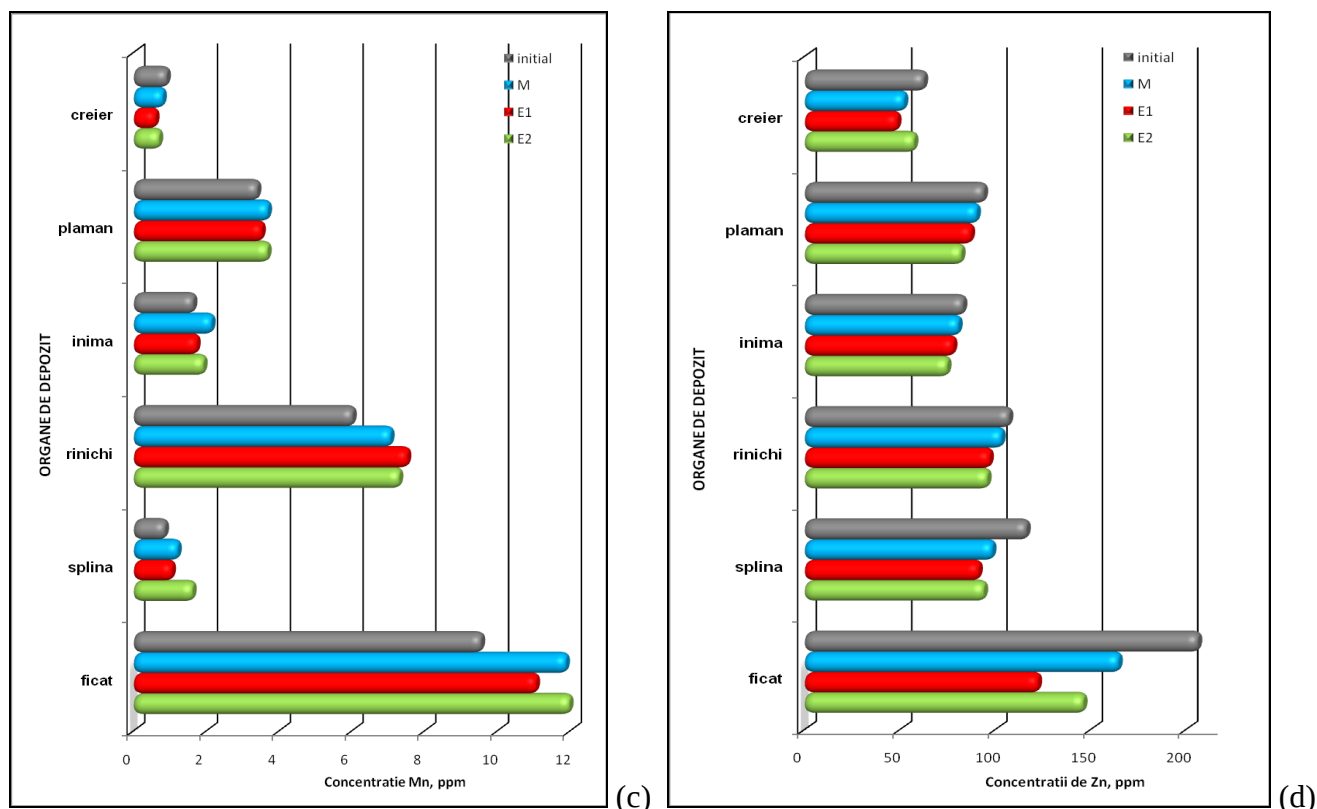


Fig. 6.21. Valori medii ale concentrațiilor de Mn (c), Zn (d) determinate în organele de depozit

Nivelul concentrațiilor de Fe determinate în organele purceilor sacrificați la începutul experimentului nu au fost egale în finalul experimentului la niciunul dintre cele 3 loturi. Cantitățile de Fe determinate în organele animalelor din lotul E1 sunt în concordanță cu parametrii evaluați anterior, adică semnificativ mai mici față de cazul animalelor din loturile M și E2. Pentru toate organele, concentrațiile de Cu determinate în cazul purceilor din lotul M au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mari decât cele regăsite în organele purceilor din loturile experimentale. Acest fapt este în conformitate cu ingesta mai mare de Cu la lotul M. Concentrațiile de Cu în organele animalelor din lotul E1 au fost semnificativ ($P \leq 0,05$) mai mici față de cele înregistrate la loturile M și E2. Între concentrațiile de Mn din organele animalelor aparținând loturilor M și E2 nu au existat diferențe semnificative. Cele mai mari concentrații de Zn s-au găsit în ficat. Concentrațiile de Zn determinate în organele animalelor, altele decât ficatul, nu s-au diferențiat semnificativ ($P > 0,05$) între loturile M și E2.

Cantitatea de Fe depozitată în organele purceilor lotului M a fost de aproximativ 2,7 ori mai mare decât în cazul lotului E2. Deși cantitatea de Cu ingerată de animalele din lotul M a fost de 4 ori mai mare decât cantitatea ingerată de cele din lotul E2, cantitatea de Cu depozitată în organe de purceii din lotul M în fiecare zi a experimentului a fost de doar 2,3 ori mai mare. Se poate considera că un nivel mai mic de Cu în rație a condus la o utilizare mai eficientă a acestuia. Raportul dintre cantitatea de Mn ingerată de purceii din lotul M față de cea ingerată de animalele din lotul E2, a fost

de 2,2. Raportul dintre cantitatea de Mn depozitată de purceii din lotul M față de E2 a fost de 1,7. Rapoartele dintre cantitatea depozitată și cea ingerată, cât și dintre cantitatea depozitată și cea reținută în organism, sunt favorabile animalelor lotului E2. Se poate considera că un nivel mai mic de Mn în rație a condus la o utilizare mai eficientă a acestuia. Pentru purceii din lotul E1, la care s-a înregistrat o eliminare masivă de Mn prin fecale, cantitatea reținută în organism a avut o valoare mică, comparativ cu celelalte loturi. Datorită valorii negative înregistrate pentru depozitele de Zn în organele purceilor din lotul E1, s-au obținut valori negative și pentru rapoartele calculate astfel încât se poate concluziona că rația administrată a fost inefficientă în privința depozitării zincului în organismul animalelor. Coeficienții obținuți prin cele două tipuri de raportări au fost superiori pentru animalele din lotul M.

CONCLUZII

Microelementele sunt esențiale pentru majoritatea proceselor metabolice de bază care au loc în organismul animal. Principalele funcții ale microelementelor sunt legate de participarea la transportul sanguin al oxigenului, hematopoeza, respirația tisulară și au rol funcțional în sistemele enzimatice. Rațiile purceilor sunt suplimentate în mod obișnuit cu microelemente, care se adaugă în hrana animalelor sub formă de compuși anorganici sau organici din surse naturale sau de sinteză. Principalii factori care limitează suplimentarea cu microelemente a rației de bază a purceilor sunt legați de biodisponibilitatea surselor de microelemente și de impactul acestora asupra mediului înconjurător. În acest context, în cadrul elaborării tezei de doctorat au fost efectuate studii privind înlocuirea suplimentelor de substanțe anorganice din hrana animalelor cu plante sau extracte din plante pentru îmbunătățirea calității produselor animale și pentru o mai bună protecție a mediului.

Obiectivul tezei a fost de a caracteriza din punct de vedere chimico-analitic mai multe tipuri de probe biologice de origine vegetală și animală în vederea evaluării corelațiilor existente între conținutul de microelemente din rațiile de hrană și regăsirea acestora în organismul animal. În mod concret, s-au evaluat aceste corelații în cazul suplimentării rațiilor purceilor recent înțărcați cu anumiți fitoaditivi (specii și amestecuri de plante din flora spontană și de cultură) în ideea îmbunătățirii statusului mineral și a protejării mediului prin reducerea cantităților de premixuri minerale. Fitoaditivii (aditivii fitogenici) folosiți ca suplimente în hrana animalelor sunt plante sau produși derivați din plante care sunt înglobați în rațiile furajere cu scopul de a îmbunătăți productivitatea animalelor sau/și pentru a crește calitatea alimentelor obținute de la aceste animale. Premixurile minerale (amestecuri de substanțe anorganice) sunt folosite în mod curent ca suplimente în hrana animalelor.

Originalitatea datelor prezentate în cadrul tezei de doctorat constă în:

- caracterizarea următoarelor resurse vegetale: cătina, topinambur, oregano, afină și colțul babei, din punct de vedere al conținutului de microelemente Cu, Fe, Mn, Zn. Pe baza datelor obținute, s-a putut stabili, care dintre aceste plante pot fi folosite ca surse de microelemente în hrana purceilor recent înțărcați;

- evaluarea efectelor resurselor vegetale propuse din perspectiva folosirii lor ca surse de microelemente, asupra statusului mineral al purceilor înțărcați. Aceste plante au fost utilizate și evaluate, pentru prima dată, ca posibili agenți de prevenire a afecțiunilor asociate dezechilibrelor minerale produse prin înțărirea purceilor, de exemplu anemia feriprivă. De asemenea, prin folosirea acestor plante, s-a studiat posibilitatea reducerii adaosurilor de microelemente de origine anorganică în rațiile purceilor (practica uzuală), implicit reducerea cantităților de microelemente eliminate prin fecale, componentă importantă pentru strategiile de protejare a mediului.

Pentru atingerea obiectivelor, s-a pornit de la realizarea unui studiu bibliografic privind microelementele esențiale și folosirea metodelor spectrometrice pentru determinarea conținutului de microelemente din probe vegetale și probe biologice de origine animală.

În continuare, în primul capitol din partea experimentală a tezei de doctorat, au fost evidențiate aspectele practice ale studiului prin precizarea modalităților de luare și pregătire a probelor pentru analiză, stabilirea condițiilor optime de lucru pentru determinarea concentrațiilor de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn din probe biologice și organizarea experimentelor de nutriție animală: experimente de tip *microtest* și experimente de tip *macrotest*. Această etapă a fost urmată de validarea metodelor de determinare a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe biologice și prezentarea rezultatelor obținute în experimentele de nutriție animală care au vizat stabilirea de corelații între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu extracte vegetale, plante din flora spontană, sau plante de cultură.

Din punct de vedere analitic, probele biologice au o matrice organică complexă care conține specii chimice a căror proporție poate exista de la nivelul urmelor până la componenți majori. Acest fapt a impus dezvoltarea unei game largi de metode analitice. Totuși, spectrometria de absorbție atomică este considerată a fi metoda de referință pentru analiza microelementelor din probe biologice.

Aspectele practice ale organizării experimentelor efectuate în cadrul studiilor din teza de doctorat privind evaluarea efectelor unor suplimente din plante sau extracte din plante asupra conținutului de microelemente din organismul animal se referă la: prelevarea și pregătirea probelor biologice (materiale vegetale sau probe de origine animală) în vederea analizării lor; stabilirea condițiilor optime de lucru pentru determinarea concentrațiilor de microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe biologice, validarea sau verificarea în laborator a metodelor de lucru folosite; organizarea experimentelor de nutriție animală: experimente de tip *microtest* și experimente de tip *macrotest*.

Studiul privind compararea metodelor de dezagregare a probelor biologice de origine animală și vegetală, în vederea determinării cantitative a conținutului de microelemente, a fost efectuat pe materiale de referință și a avut ca rezultat alegerea metodei de dezagregare cu microunde ca fiind metoda optimă de aducere în soluție a microelementelor din probe de ficat și din probe de material vegetal. Această metodă necesită cel mai scurt timp de lucru, un volum mediu de reactivi concentrați și este caracterizată de exactitate exprimată prin valori foarte apropiate de 100%.

S-a urmat protocolul de validare pentru metoda de dezagregare cu microunde și determinare prin FAAS a microelementelor Fe, Cu, Mn și Zn din probe de ficat – material de referință. În urma validării metodei de determinare a fierului, cuprului, manganului și zincului din probe biologice de origine animală și vegetală prin spectrometrie de absorbție atomică în flacără, după dezagregare cu

microunde și a calculului incertitudinii asociate, s-a putut trage concluzia, pe baza rezultatelor obținute, că metoda corespunde scopului propus de a realiza un studiu chimico-analitic al corelației dintre conținutul de microelemente din dietele de hrană suplimentate cu extracte de plante, sau cu plante și nivelul de regăsire al acestora în organismul animal.

Întrucât nu se dispune de un material de referință pentru validarea metodei de determinare a microelementelor Fe, Cu, Mn, Zn din probe de natură vegetală din flora spontană și stabilirea conținutului de microelemente din astfel de plante, s-a organizat un studiu interlaboratoare. Rezultatele furnizate de către participanții la studiu au alcătuit șiruri de date care acoperă o plajă relativ largă de valori, iar media aritmetică calculată nu caracterizează șirurile formate. Pentru stabilirea șirurilor de date omogene, a mediei, a deviației standard și a incertitudinii s-a aplicat Algoritmul A. Pentru a evalua capacitatea de analiză a laboratoarelor participante, s-au calculat scorurile Z, Z' și Zeta. Din totalul datelor obținute pentru scorurile analizate, s-au înregistrat 9 valori zeta discutabile sau nesatisfăcătoare. Aceste rezultate pot fi puse pe seama unor valori subestimate ale incertitudinilor de calcul raportate de către participanții la studiul interlaboratoare. Rezultatele obținute în urma aplicării Algoritmului A, au arătat că toate cele 3 plante analizate conțin concentrații importante de microelemente. Valorile determinate justifică folosirea acestor plante în studii de nutriție animală. Plantele oregano, afină și colțul babei, analizate au fost folosite ca adaosuri în rațiile de hrană ale unor porci înțărcați în cadrul a două experimente

Rezultatele analizelor chimice efectuate în experimentul de nutriție animală în cadrul studiului chimico-analitic al corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu inulina, au arătat că prezența inulinei a îmbunătățit biodisponibilitatea cuprului din rațiile de hrană ale porcilor înțărcați. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între loturi în privința depozitelor de Mn și Zn din ficat. Biodisponibilitatea cuprului a fost mai crescută în cazul porcilor crescuți în condiții de igienă ideale față de cei crescuți în condițiile unei ferme comerciale.

Experimentul efectuat pentru studiul chimico-analitic al corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrațiile acestora din dietele de hrană îmbogățite cu plante de cultura, a demonstrat ca utilizarea unui amestec format din tuberculi presăși de topinambur (*Helianthus tuberosus*) și frunze de cătină (*Hippophae rhamnoides*), sub formă de pulbere uscată, în rațiile porcilor, în care aportul de săruri anorganice a fost redus la jumătate (în comparație cu un premix comercial), nu a afectat negativ performanțele bioproductive și nici profilul parametrilor hematologici ai porcilor, care s-au înscris în valorile specifice speciei și categoriei. Amestecul a fost testat, atât în condiții de microtest, cât și condiții de macrotest, iar datele obținute în experimentul macrotest au fost confirmate de cele furnizate de experimentul microtest.

Pentru studiul corelației între conținutul de microelemente din organismul animal și concentrația acestora din dietele de hrană îmbogățite cu plante din flora spontană, s-au organizat două experimente. Fitoaditivii folosiți în experimente au fost incluși în rații individual sau în amestecuri. Plantele folosite au fost: oregano (*Origanum Vulgare L.*), afină (*Vaccinium myrtillus L.*), colțul babei (*Tribulus terrestris*) și un amestec de cătină și topinambur.

În cadrul experimentului în care hrana unor porci îngrășiți au fost adăugate suplimente de oregano, ca surse organice de microelemente, performanțele bioproductive nu au fost afectate prin scăderea conținutului de microelemente din premixul mineral administrat porcilor. Nivelurile de microelemente (Fe, Cu, Mn, Zn) excretate au fost proporționale cu cele ingerate, fapt important din punct de vedere al poluării mediului cu metale grele. Biodisponibilitatea microelementelor din oregano, a compensat nivelul scăzut de element mineral primit prin premix.

În experimentul în care în hrana porcilor îngrășiți au fost adăugate amestecuri de plante recoltate din flora spontană, ca surse organice de microelemente, performanțele bioproductive nu au fost afectate prin scăderea conținutului de microelemente din premixul mineral administrat porcilor, în cazul folosirii unui amestec de oregano și afină. Nivelurile de microelemente Fe, Cu, Mn, Zn excretate au fost proporționale cu cele ingerate, fapt important din punct de vedere al poluării mediului cu metale grele. Biodisponibilitatea microelementelor din amestecul de oregano și afină, a compensat nivelul scăzut de element mineral primit prin premix.

Datorită consistenței iritante pe care a imprimat-o suplimentul de colțul babei furajului, pentru porcii lotului care a primit supliment de oregano și colțul babei s-au înregistrat parametri bioproductivi semnificativ mai mici decât pentru celelalte loturi studiate. Și cantitățile de microelemente eliminate, au fost reduse pentru porcii acestui lot, acest fapt fiind în concordanță cu cantitățile mici de microelemente ingerate. Pe parcursul experimentului nu au fost depozitate cantități de microelemente în tesuturile organice evaluate. Rația administrată porcilor a fost ineficientă în privința depozitării microelementelor în organismul animalelor. Biodisponibilitatea microelementelor din amestecul de oregano și colțul babei, a fost redusă și a afectat statusul microelementelor în organismul porcilor, acest amestec neputând compensa microelementele primite de porci în mod uzual prin premix.

Rezultatele studiilor chimico-analitice efectuate pe probe biologice de material vegetal și de organe animale obținute în cadrul unor experimente de nutriție animală, sunt prezentate și discutate în teza de doctorat în cuprinsul a 4 capitole (Capitolele 3 - 6). Ele sunt prezentate în 134 de tabele și 66 de figuri. Datele experimentale au fost discutate în corelație cu informațiile existente în literatura de specialitate, prezentată sistematizat în Capitolele 1 și 2.

Pe baza rezultatelor experimentale obținute în cadrul studiilor efectuate pentru elaborarea tezei de doctorat, se poate aprecia că înlocuirea adăsurilor de minerale sub formă de săruri sau oxizi anorganici și a antibioticelor în hrana porcilor, cu anumite plante de cultură sau din flora spontană sau cu extracte de plante, are un efect benefic asupra sănătății și a creșterii animalelor, a calității produselor alimentare și a protejării mediului. Pot fi recomandate în acest sens, inulina (extrasă din cicoare), oregano și fructele de afină (din flora spontană) și cățina și topinamburul cultivate ca plante medicinale.

Teza de doctorat este prezentată pe parcursul a 270 de pagini și cuprinde 207 referințe bibliografice.

BIBLIOGRAFIE

(selecție din teză)

- ***Validation of Analytical Procedures. Methodology, step 4. ICH Topic Q2B (CPMP/ICH/281/95). Definitions and Terminology, step 5. ICH Topic Q2A (CPMP/ICH/381/95), (1995).
- Apgar G.A., Kornegay E.T., Lindemann M.D. and Notter D.R., *J. Anim. Sci.*, **73**, 2640-2646, (1995).
- Beveridge, T., Li, T.S., Oomah, B.D., Smith, A., *J Agric Food Chem.*, **47(9)**, 3480-8, (1999).
- Carlson M.S., Hill M.G., Link J.E., *J. Anim. Sci.*, **77**, 1199-1207, (1999).
- Da-Col, J.A., Domene, S.M.A., Pereira-Filho, E.R., *Food Analytical Methods*, **2(2)**, 110-115, (2009).
- Demirel, S., Tuzen, M., Saracoglu, S., Soylak, M., *Journal of Hazardous Materials*, **152 (3)**, 1020-1026, (2008).
- Doner, G., Akman, S., *Anal. Lett.*, **33**, 3333-3341, (2000).
- Doner, G., Ege, A., *Analytica Chimica Acta*, **520(1-2)**, 217-222, (2004).
- Emons, H., Held, A., Ulberth, F., *Pure Appl. Chem.*, **78**, 135-143, (2006).
- Ettle, T., Schelegel, P., Roth, F.X., *Journal of animal physiology and animal nutrition*, **92**, 35-43, (2007).
- Florian, D., Knapp, G., *Anal. Chem.*, **73 (7)**, 1515-1520, (2001).
- Han, Y.K., Thacker, P.A., *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8 (5)**, 868-875, (2009).
- Han, Z.K., Wang, G.J., Yao, W., Zhu, W.Y., *Curr. Iss. Intest. Microbiol*, **7**, 53-60, (2006).
- Hill, G.M., Mahan D.C., Carter S.D., Cromwell G.L., Ewan R.C., Harold R.L., Lewis P.S., Miller P.S., Shurson G.C., Veum T.L., *J. Anim. Sci.*, **79**, 934-941, (2001).
- Iskandar, M., Swist, E., Trick, K., Wang, B., L'Abbe, M.R. & Bertinato, J., *Nutrition Journal*, **4**, 35-37, (2005).
- Jondreville, C., Hayler, R. and Feuerstein, D., *Animal Science*, **81**, 77-83, (2005).
- Lalles J.P., *Archiva Zootechnica*, **11 (1)**, 5-15, (2008).
- Lalles, J.P., Bosi, P., Smidt, H., Stockes, C.R., *Livestock Science*, **108(1-3)**, 82-93, (2007).
- Loh, G., Eberhard, M., Brunner, R.M., Hennig, U., Kuhla, S., Kleessen, B. & Metges, C.C., *Journal of Nutrition*, **136**, 1198-1202, (2006).
- Mesco, M.F., Moraes, D.P., Barin, J.S., Dressler, V.L., Knapp, G., Flores, E., *Microchemical Journal*, **82(2)**, 183-188, (2006).
- Mutlu, C., Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., *Bull Environ Contam Toxicol.*, **87(3)**, 282-6, (2011).
- Nicholson, F; Chambers, B.J., *Trace elements in animal production systems*, Wageningen Academic Publishers, 55-63, (2008).
- Parvu Gh., Costea M., Pirvu M., Nicolae B., *Tratat de Nutritia Animalelor*, Coral Sanivet, Bucuresti, (2003).
- Pereira-Filho, E.R., Berndt, H., Arruda, M.A.Z., *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**, 1308-1315, (2002).

- Pop M.I., Halga P., Avarvarei T., *Nutritia si alimentatia animalelor*, vol I., Editura Tipo Moldova, Iasi, (2006).
- Poulsen H.D., Larsen T., *Livest. Prod.sci.*, **43**, 235-242, (1995).
- Revy, P.S., Jondreville, C., Dourmad J.Y., Guinotte, F. Nys, Y., *Anim. Res.*, **51**, 315-326, (2002).
- Rincker M.J., Hill, G.M., Link J.E., Rowntree J.E., *J. Anim. Sci.*, **82**, 3189-3197, (2004).
- Rincker, M.J., Clarke, S.L., Einstein, R.S., Link, J.E., Hill, G.M., *J.Anim.Sci.*, **83**, 2137-2145, (2005).
- Rozica, S., Onjia, A., Dogo, S., Slavkovic, L., Popovic, A., *Talanta*, **67(1)**, 233-239, (2005).
- Scholz-Ahrens, K. & Schrezenmeir, J., *Journal of Nutrition*, **137**, 2513-2523, (2007).
- Soylak, M., Colak, H., Tuzen, M., Turkoglu, O., Elci, L., *Journal of Food and Drug Analysis*, **14(1)**, 62-67, (2006).
- Soylak, M., Tuzen, M., Souza Anderson, S., das Gracias, A.K.M., Ferreira, S.L.C., *Journal of Hazardus Materials*, **149 (2)**, 264-268, (2007).
- Soylak, M., Unsal Y.E., *Food and Chemical Toxicology*, **48(6)**, 1511-1515, (2010).
- Spears, J.W., Hansen, S.L., *Trace elements in animal production systems*, Wageningen Academic Publishers, 55-63, (2008).
- Thompson, M., *Accred. Qual. Assur.*, **10**, 574-575, (2006).
- Tuzen, M., *Food and Chemical Toxicology*, **47(8)**, 1785-1790, (2009).
- Tuzen, M., Soylok, M., *Food Chem.*, **102**, 1089-1095, (2007).
- Uluozlu, O.D., Tuzen, M., Mendil, T., Soylok, M., *Journal of Hazardous Materials*, **163 (2-3)**, 982-987, (2009).
- Untea, A.**, Criste, R., Olteanu, M., Olaru, R., Enache, L., Estimation of Fe and Zn concentration from 3 nourishing supplements to organizing a nutrition experiment on weaned piglets, *4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, Prague, Czech Republic, 4-6 November, **2009** (prezentare poster).
- Untea, A.**, Criste, R.C. and Vladescu, L.; Development and validation of a liver samples preparation method for FAAS trace elements content determination, *7th Aegean Analytical Chemistry Days*, Lesvos, Grecia, 29 sept. – 3 oct., (2010 a) (prezentare poster).
- (Untea, 2010b) - Criste, R.D., **Untea, A.**, Olteanu, M., Costache, I., Balint, L., Ionescu, M, Studiu interlaboratoare de determinare a concentratiei de Cu in trei plante din flora spontana in vederea evaluarii potentialului acestora ca surse naturale de minerale pentru purcei, *Arhiva Zootehnica*, 13:2, 19-29, (2010).
- Untea, A.**, Criste, R., Cornescu, G., Radutoiu, D., Interlaboratory study on Mn determination in 3 species of spontaneous flora used as alternative mineral sources for weaning piglets (10-30 kg), *XIV International Symposium Feed Technology*, Novi Sad, Serbia, 97-104, (2010c).
- (Untea, 2010d) – Hebean, V., Lefter, N., Criste, R.D., **Untea, A.**, Tamas, V., Belala, D., Effects of partial replacement of copper sulphate from weaned piglets diets (10-30 kg) with a botanical mix on bioproductive performance and Cu excreta, *7th International Copper Meeting: Copper in Biology*, 16-20 octombrie (2010), Alghero, Sardinia (prezentare poster).

- (Untea, 2010e) - Lefter, N., **Untea, A.**, Hebean, V., Belala, D., Tamas, V., Effects of a botanical mix in weaned piglets diets (10-30 kg) on bioproductive performance and excreta of some trace elements (Zn, Fe, Mn), *Al 9lea Simpozion Internațional de Biologie și Nutriție Animală*, Bucuresti, Romania, 23-24 septembrie, (2010) (prezentare poster).
- (Untea, 2010f) - Papuc C., Criste R., Durdun N., **Untea A.**, Nicorescu A. The effect of some mineral and phytogenic additives, rich in polyphenols, upon lipid peroxidation process, *Revista de Chimie*, **61** (10), 920-925, (2010).
- Untea, A.**, Criste, R.D., Radutoiu, D., Effects of the supplemental oregano (*Oregano Vulgaris*) given to weaned piglets on iron absorption, retention and elimination, *al 9-lea Simpozion Internațional de Biologie și Nutriție Animală*, Bucuresti, Romania, 23-24 septembrie, (2010g), (comunicare orală).
- Untea A.**, Criste R.D., Panaite T., Costache I.; Effect of the dietary oregano (*origanum vulgare*) on Cu and Zn balance in weaned piglets, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **25** (1), S35-S40, (2011).
- Untea, A.**, Criste, R.C. and Vladescu, L.; Development and validation of a microwave digestion – FAAS procedure for Cu, Mn and Zn determination in liver; *Revista de Chimie*, **63** (4), 341-346, (2012a).
- (Untea, 2012b) Taranu I., Marin D. E. , **Untea A.**, Janczyk P., Motiu M., Criste R. D., and Souffrant W.B., Effect of dietary natural supplements on immune response and mineral bioavailability in piglets after weaning, *Czech Journal of Animal Science*, **57**(7), 332-343, (2012b).
- Untea, A.**, Criste, R.D., Taranu, I., Souffrant, W.-B., Ianckic, P., Vladescu, L., Dragomir, C., Effects of dietary inulin on mineral bioavailability in recently weaned piglets, *Czech Journal of Animal Science*, (2012c) (trimis la revistă).
- (Untea, 2012d) Criste, R.D., **Untea, A.**, , Olteanu, M., Radutoiu, D., Lacatusu A. and Vladescu, L., Microelements content assesement of some plant species of Romanian spontaneous flora, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (2012) (trimis la revistă)
- (Untea, 2012e) – Criste, R.D., **Untea, A.**, Vladescu, L., Olteanu, M., Mircea E., Lacatusu, A., Oregano, a Possible Natural Source of Trace Elements: Iron Status in Piglets, *Animal Feed Science and Technology*, (2012) (trimis la revistă).
- (Untea, 2012f) –**Untea, A.**, Criste, R.D., Vladescu, L., Tamas V., Lefter N., Mihaila C., The effect of a botanical mix in weaned piglets diets (10-30 kg) on Cu status, *Journal of Animal Feed Science*, (2012) (in lucru).
- Veum, T.L., Carlson, M.S., Wu, W.C., Bollinger, D.W., Ellersieck, M.R., *J. Anim. Sci.*, **82**, 1062-1080, (2004).