

## Interação de zinco e vitamina A em ratos na lactação. Modelo de deficiência experimental

Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama<sup>1</sup> y Silvia Maria Franciscato Cozzolino<sup>2</sup>

**RESUMO.** Desenvolveu-se um modelo experimental de deficiência de zinco e vitamina A em ratos, no período de lactação, logo após o nascimento dos animais. O delineamento consistiu de um período de depleção de 4 semanas após o nascimento. Os animais do grupo teste receberam ração á base de caseína deficiente em zinco e vitamina A e os do grupo controle a ração padrão segundo as recomendações do «Committee on Laboratory Animal Diets». Foram utilizadas ratas adultas pós-parto, *Rathus norvegicus*, var. *albinus*, (*Rodentia Mammalia*), com 6 filhotes machos cada, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da USP. Ao final do período de depleção, verificou-se que o peso dos animais do grupo controle (109,1 g  $\pm$  3,9g) foi significativamente superior aos dos grupo teste (40,8g  $\pm$  6,7g). Da mesma forma a concentração de zinco nos fêmures dos animais do grupo controle (115,7  $\mu$ g/g  $\pm$  5,4  $\mu$ g do osso) foi significativamente superior á dos animais do grupo teste (35,5  $\mu$ g/g  $\pm$  3,3  $\mu$ g/g). A concentração de vitamina A no plasma dos animais do grupo controle (31,5  $\mu$ g/dL  $\pm$  2,5  $\mu$ g/dL) também foi significativamente superior quando comparada á dos animais do grupo teste (8,9  $\mu$ g/dL  $\pm$  3,4  $\mu$ g/dL), entretanto a concentração de vitamina A hepática foi semelhante para os dois grupos. Pelos resultados obtidos podemos concluir que houve interação de zinco e vitamina A a nível de mobilização de vitamina A do fígado e depleção de zinco. Embora a concentração plasmática de vitmaina A tivesse indicado uma depleção, esta não pode ser considerada total tendo em vista as reservas hepáticas.

### INTRODUÇÃO

A deficiência de zinco na dieta no período da lactação, resulta na redução da produção láctea bem como na concentração de zinco no leite. Consequentemente, os filhotes

**SUMMARY.** Interaction of vitamin A and zinc in lactating rats. **Experimental deficiency model.** An experimental deficiency model of vitamin A and zinc in lactating rats was developed. The experimental design consisted in a depletion period of 4 weeks immediatly after birth where test group animal received a casein based feed, deficient in zinc and vitamin A, and a control feed according to the recommendations of the Committee on Laboratory Animal Diets. Female *Rathus norvegicus*, var. *albinus* (*Rodentia, Mammalia*) with 6 young males each were used. These came from the Biotério of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas of USP. At the end of the depletion period it was found that the weight of the males control group (109,1 g  $\pm$  3,9 g) was significantly greater than that of the test group (40,8 g  $\pm$  6,7 g). The same was true for the concentration of zinc in the femurs of these animals, in the control group the concentration was significantly greater (115,7  $\mu$ g/g  $\pm$  5,4  $\mu$ g/g) than in the test group (35,5  $\mu$ g/g  $\pm$  3,3  $\mu$ g/g). The concentration of vitamin A in the plasma of the control group (31,5  $\mu$ g/dL  $\pm$  2,5  $\mu$ g/dL) also was significantly greater than the test group animals (8,9  $\mu$ g/dL  $\pm$  3,4  $\mu$ g/dL). The concentration of hepatic vitamin A was similar for both groups. We can conclude that there was interaction of zinc and vitamin A, by liver and depletion in zinc. Although the plasmatic concentration of vitmain A indicates a depletion, this cannot be considered as total because of the hepatic reserves.

recebem menor quantidade deste mineral e apresentam sintomas de deficiência, como, redução da concentração plasmática do elemento, redução do crescimento e elevação da taxa de mortalidade (1).

Quanto a vitamina A, estudos indicam que a maior transferência de vitamina A da mãe para os filhotes ocorre no período da lactação, através do aleitamento materno. Assim, o estado nutricional relacionado a vitamina A das ratas e dos filhotes é influenciado pela ingestão de vitamina A na dieta (2).

A deficiência de zinco e vitamina A em ratos no período

1 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, CPCS. Estrada do Aleixo, 1756, Manaus AM. CEP. 69011-000. Brasil.  
2 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Nutrição. Av. Prof. Lineu Prestes, 580. USP. São Paulo. CEP. 05508-900. Brasil.

de lactação, são raros na literatura, entretanto, alguns trabalhos tem mostrado que a maior teratogenicidade da deficiência concomitante desses dois nutrientes ocorre no período de gestação e são resultantes da interação entre estes nutrientes (3).

No sentido de se avaliar a interação entre zinco e vitamina A em ratos recebendo dietas deficientes nestes dois nutrientes, nos propusemos a desenvolver um modelo experimental a partir do nascimento, que nos possibilitasse a obtenção de animais depletados nestes dois nutrientes.

## MATERIAL E METODOS

**Animais e rações:** No estudo de depleção de zinco e vitamina A no período de lactação, utilizou-se 10 ratas adultas, pós-parto, (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, *Rodentia mammalia*), com 6 filhotes machos cada, provenientes da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, subdivididos em grupos controle e teste. Os filhotes e suas respectivas mães receberam uma ração completa á base de caseína (Grupo Controle) e uma ração á base de caseína deficiente em zinco e vitamina A (Grupo Teste), de acordo com as recomendações do «Committee on Laboratory Animal Diets» (4), segundo a Tabela 1.

TABELA 1  
COMPOSIÇÃO PERCENTUAL BÁSICA DAS RAÇÕES  
A BASE DE CASEÍNA\*

Componentes	Ração controle	Ração deficiente em Zn e vit. A
Proteína	18,0 ± 0,2	19,3 ± 1,3
D.L. Metionina	0,3	0,3
Oleo de soja	5,0	5,0
Celulose	5,0	5,0
Sacarose	10,0	10,0
Mistura vitamínica	1,0	1,0 <sup>1</sup>
Mistura salina	3,5	3,5
Zinco (mg%)	3,6 ± 1,5	0,5 ± 0,3
Bitartrato de colina	0,2	0,2
Amido (q.s.p. 100%)	55,0	55,0

\* Caseína lavada com ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1%, por duas vezes e água desionizada por dez vezes.

1 Mistura vitamínica sem adição de vitamina A.

2 Mistura salina sem adição de zinco.

Durante o período de depleção, foi oferecida ração deficiente em zinco e vitamina A e água desionizada, tanto para as ratas mães como para os filhotes, sendo a ingestão do animal «ad libitum». O controle de peso dos animais foi semanal e o da ração a cada 2 dias.

## METODOS

**Lavagem de vidrarias:** A fim de minimizar a contaminação por metais, especialmente o mineral em estudo, toda a vidraria foi lavada inicialmente com extran 5%, enxaguada por no mínimo 6 vezes com água desionizada e colocada em solução de ácido nítrico a 30% sendo assim mantida por no mínimo 12 horas. Em seguida foi enxaguada com água desionizada por no mínimo 6 vezes e seca em estufa com temperatura controlada. Os comedouros e outros materiais de aço inoxidável como as bandejas da estufa ventilada, bicos de bebedouros e acessórios do moinho e homogeneizador, seguiram o mesmo processo anteriormente descrito, diferindo apenas na solução utilizada para a desmineralização que foi o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1%.

**Ração:** A caseína utilizada foi previamente lavada com EDTA 1% segundo a Tabela 2, devido ao fato da mesma originalmente possuir 21 µg Zn/g. O procedimento utilizado na lavagem da caseína seguiu as recomendações da literatura e as otimizadas no laboratório de Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas com algumas modificações em relação ao de Mazza (5).

TABELA 2  
PROCEDIMENTO PARA A LAVAGEM DE CASEÍNA

Produto	Etapas
Caseína comercial integral (2 kg)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Caseína + 8 litros de solução aquosa de EDTA 1%.</li> <li>2. Agitação por 20 minutos com homogeneizador elétrico</li> <li>3. Decantação e filtração.</li> <li>4. Caseína + 6 litros de solução aquosa de EDTA 1%</li> <li>5. Agitação por 20 minutos</li> <li>6. Decantação e filtração</li> </ol>
* Operação realizada por 10 vezes	<ol style="list-style-type: none"> <li>*7. Caseína + 6 litros de água desionizada.</li> <li>*8. Agitação por 20 minutos.</li> <li>*9. Decantação e filtração.</li> <li>10. Estufa ventilada à 60 °C por uma noite para a secagem. As bandejas de aço inoxidável foram previamente desmineralizadas com EDTA 1% e com água desionizada por 6 vezes.</li> <li>11. Pulverização da caseína em moinho elétrico, acondicionamento em sacos plásticos hermeticamente fechados, e conservação em geladeira até o momento de utilização.</li> </ol>

**Material biológico:** Para a obtenção do plasma, o sangue foi coletado pela artéria abdominal com a utilização de agulha descartável e recolhido diretamente em tubo de centrífuga heparinizado após anestesia do animal por inalação com éter

etílico p.a. Em seguida, foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O plasma assim obtido foi acondicionado em microtubo de polietileno de 1,5 mL, previamente lavado e desmineralizado e armazenado em freezer a -70 °C até a análise.

Imediatamente após a coleta sanguínea, o fígado foi removido, enxaguado em solução salina geleada e acondicionado em freezer a -70 °C até a análise.

Os fêmures, após a remoção, foram separados dos tecidos moles aderentes, pesados e analisados.

**Análise química:** A análise química das rações quanto à Composição centesimal, seguiu a recomendação da AOAC (6).

O teor de zinco nas rações e material biológico foi determinado pelo método preconizado por Parker et al. (7), em espectrofotômetro de absorção atômica, após a digestão via úmida. Para o controle da análise, seguiu-se as recomendações de Cornelis (8), utilizando-se como material de referência a «Total Diet 1548» NBS (National Bureau of Standards).

As concentrações de vitamina A e carotenóides no plasma e fígado dos animais, foram determinadas pelo método proposto por Bessey & Lowry modificado por Flores (9).

Para a análise estatística, utilizou-se a metodologia de análise de variância e o teste de Tuckey com 5% de probabilidade (10).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A deficiência de zinco foi obtida oferecendo-se aos animais, no período da lactação, ração à base de caseína sem a adição de zinco na mistura salina e a caseína foi lavada com EDTA 1%. Segundo a literatura, o procedimento comum para a eliminação dos teores residuais de zinco, do produto, é a lavagem com EDTA 1%, que teria uma função quelante (5, 11). A concentração inicial e final de zinco na caseína utilizada em nosso estudo, foi respectivamente 21 µg/g e 3 µg/g, estando adequada aos propósitos do estudo. Não foi observada nenhuma manifestação de diarreia durante o período de estudo decorrente do resíduo de EDTA.

Quanto aos possíveis contaminantes do meio ambiente que eventualmente pudessem interferir na depleção de zinco, tentou-se minimizar através da desmineralização.

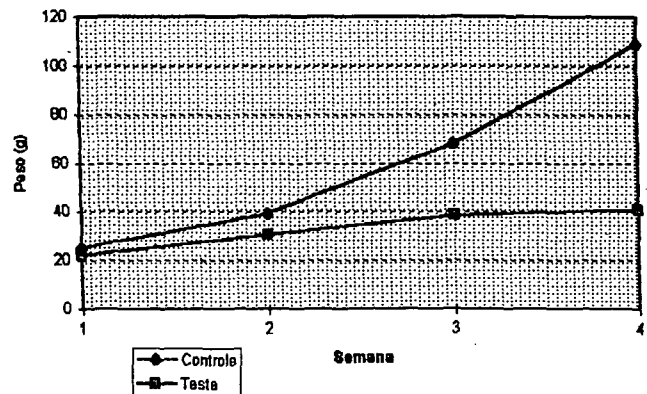
Em relação a vitamina A, apenas omitimos a adição na mistura vitamínica.

A deficiência de vitamina A é geralmente induzida em ratos após o desmame, através de uma ração semi-sintética deficiente em vitamina A ou pela incorporação adicional de ácido retinóico para acelerar a depleção das reservas (12, 13). Nessas condições o «plateau» da curva de crescimento e a redução de vitamina A no plasma, estágio de deficiência, ocorreria após 6 a 12 semanas (14, 15).

Ratas gestantes tem sido utilizadas como modelo para se obter animais deficientes em vitamina A por meio de ração isenta de vitamina A, contendo ácido retinóico ou suprimento restrito de retinol (16). Um modelo recentemente sugerido para a produção da deficiência de vitamina A em ratos após o desmame, foi a hepatectomia parcial (60%), visando a remoção das reservas em associação com uma ração deficiente em vitamina A (17). Neste estudo, foi desenvolvido um modelo experimental de deficiência de zinco e vitamina A a partir do nascimento, ou seja, com ratos pós-parto e seus respectivos filhotes, que receberam uma ração à base de caseína deficiente em zinco e vitamina A.

De acordo como os resultados obtidos, observou-se que na primeira semana de depleção não houve uma diferença significativa entre os pesos dos animais controle e teste, entretanto, a partir da segunda semana houve diferença extremamente significativa, Fig. 1.

FIG. 1  
Evolução ponderal média dos filhotes do grupo controle e teste



O zinco é um nutriente essencial para o crescimento normal e desenvolvimento de muitas espécies (18), assim como a vitamina A (19).

É possível que os estoques de zinco dos ratos recém nascidos, e o leite rico em zinco no período da lactação, 13 a 17 µg/mL, (20) tenham interferido na evolução ponderal da primeira semana. Entretanto; ao final do experimento, observou-se uma redução significativa do peso dos animais do grupo teste em relação ao controle, refletindo uma redução da concentração de zinco no leite e conseqüentemente um suprimento inadequado, ocasionando a deficiência nos filhotes e nas ratas conforme os estudos de Mutch & Hurley (1).

Neste contexto, um outro fator adicional foi a deficiência concomitante de vitamina A. O zinco está envolvido na manutenção do transporte normal de vitamina A no plasma (21). Há sugestões de que a deficiência de zinco interfere com a síntese da proteína ligadora de retinol (RBP), resultando na incapacidade dos ratos deficientes em zinco em mobilizar

adequadamente a vitamina A do fígado (22).

De acordo com os estudos de Duncan & Hurley (3), a deficiência simultânea de zinco e vitamina A em ratos no período gestacional, produziu uma teratogenicidade maior do que se previa pelo efeito adicional da interação entre os nutrientes mencionados, fato que poderia ter interferido significativamente na depleção de zinco e vitamina A nos animais durante o período da lactação.

Uma das consequências importantes da deficiência de zinco é o seu efeito sobre o crescimento. Investigações sobre os mecanismos deste efeito são complicados em função da anorexia (23). Segundo Park et al (24), a quantidade limitada de zinco disponível em animais deficientes, é utilizada para as funções vitais do organismo em detrimento ao crescimento. Algumas explicações quanto às alterações no peso corporal em função da deficiência de zinco, estão nas taxas de síntese e degradação protéica, justificadas pela atividade reduzida da timidina kinase que portanto prejudicaria a síntese de DNA e divisão celular (18). Todas essas alterações repercutem no organismo principalmente em relação ao desenvolvimento, provocando sua redução ou parada que pode ser restabelecida com a suplementação de zinco (25).

Da mesma forma, estudos tem relatado que animais submetidos a uma ração deficiente de vitamina A, crescem até que quase toda reserva vitamínica seja consumida, interrompendo aí o crescimento, apresentando a seguir «um plateau» na curva de crescimento, seguido pela perda de peso e morte do animal (13).

Os resultados deste nosso estudo, mostraram ainda que o consumo de ração deficiente em zinco e vitamina A pelos animais, resultou em alterações importantes no estado nutricional. Somando-se ao retardo de crescimento, observou-se ao final do experimento, outros sinais como a anorexia, paralisia das patas dianteiras e traseiras, postura anormal e dermatite de pata susceptíveis ao sangramento. Para a avaliação da depleção de zinco, foi utilizada ainda, a concentração de zinco nos fêmures.

De acordo com a Tabela 3, ao final do período de depleção observou-se que houve uma redução significativa dos teores desde mineral nos fêmures dos animais do grupo teste, tanto nas ratas como nos filhotes. Isso pode representar uma alteração do estado nutricional decorrente da ingestão de ração deficiente, com conseqüente redução das reservas orgânicas (11)

Para a determinação da biodisponibilidade de zinco, os fêmures tem sido o parâmetro de escolha (26). Acredita-se que o zinco existente no osso, possa ser liberado durante os estados de deficiência para os locais onde a necessidade é mais crítica, inclusive para o crescimento (26). Atualmente, Zhou et al (27), sugerem a existência de dois «pools» de zinco, um de «turnover» rápido, onde o zinco pode ser facilmente removido quando necessário e como isso manter a homeostase sem uma redução substancial no crescimento, outro de «turnover» lento onde o zinco não pode ser utilizado sem a perda do osso. Portanto, quando os animais sofrem uma restrição marginal de

zinco, o primeiro «pool», contendo de 10 a 20% do zinco total, é facilmente utilizado para as necessidades dos tecidos moles, seguido pela redução da taxa de crescimento para a manutenção da homeostase de zinco.

TABELA 3  
MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DOS TEORES DE ZINCO NOS FÊMURES, VITAMINA A NO PLASMA E FÍGADO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E TESTE AO FINAL DO PERÍODO DE DEPLEÇÃO

Parâmetros	Ratas		Filhotes	
	Controle	Teste	Controle	Teste
Zinco Fêmures (µg/g)	202,0±19,8 <sup>a</sup>	166,5±11,1 <sup>a</sup>	115,7±5,4 <sup>a</sup>	35,5±3,3 <sup>b</sup>
Vit. A fígado (µg/g)	111,8±4,4 <sup>a</sup>	194,5±3,7 <sup>a</sup>	22,6±2,1 <sup>a</sup>	26,4±5,8 <sup>a</sup>
Vit. A plasma (µg/dL)	43,31±3,4 <sup>a</sup>	26,8±4,4 <sup>b</sup>	31,5±2,5 <sup>a</sup>	8,9±3,4 <sup>a</sup>

\* As mesmas letras no sentido horizontal não diferem entre si ao nível de  $p < 0,05$  de probabilidade.

Entretanto, parece não existir reserva de zinco no organismo humano, e apenas uma pequena porção poderia estar disponível para ser redistribuída para prevenção dos sintomas de deficiência (28).

Em relação à concentração de zinco nos fêmures, os resultados sugerem que uma ração restrita em zinco, estaria comprometendo a biodisponibilidade do mesmo, principalmente no animal jovem onde as necessidades estão aumentadas.

No que se refere aos teores de vitamina A nos tecidos, Underwood et al (29), estudaram o efeito da depleção progressiva de vitamina A nas reservas hepáticas de retinol em ratos, e observaram que os níveis plasmáticos permaneciam normais enquanto as concentrações hepáticas não estivessem abaixo de 10 µg de retino/g de tecido. Outros achados semelhantes, sugerem que na inadequação de vitamina A na dieta, existe um mecanismo de compensação interna que mantêm os níveis plasmáticos, a partir de reservas endógenas, em uma concentração necessária para suprir os tecidos a um nível ideal, isto, enquanto houver uma quantidade razoável de vitamina A no fígado (30).

No presente estudo, com a depleção concomitante de zinco e vitamina A, de acordo com a Tabela 3, observa-se uma redução significativa de vitamina A no plasma dos filhotes do grupo teste. Ao contrário do que se verifica em estudos de depleção de vitamina A na lactação, não houve diferença significativa na concentração de vitamina A hepática dos filhotes. Os dados demonstram que embora não houvesse diferença significativa na concentração de vitamina A no fígado destes animais, a concentração de vitamina A no plasma foi bastante inferior nos animais deficientes, sugerindo

uma limitação maior do zinco, uma vez que a vitamina A não foi adequadamente mobilizada do fígado para o plasma. Quanto ao teor de vitamina A no fígado das ratas mães, houve maior concentração nos animais que receberam a ração deficiente em zinco e vitamina A em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Comportamento inverso foi observado quanto a concentração de vitamina A no plasma, Tabela 3. Neste caso, os teores reduzidos de vitamina A no plasma em ratos deficientes em zinco e vitamina A, parece ser efeito específico da deficiência de zinco sobre a mobilização de vitamina A do fígado.

Portanto, estes resultados são consistentes com o propósito de que o zinco e a vitamina A interagem a nível de mobilização hepática (21) e estão em concordância com os resultados de Smith et al (30) e Duncan & Hurley, (3).

### CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi desenvolvido e de acordo com os resultados obtidos, sugere-se que houve interação entre zinco e de vitamina A a nível de mobilização de vitamina A do fígado para o plasma e deficiência desses dois nutrientes no modelo experimental, embora no caso da vitamina A, a nível marginal.

### REFERENCIAS

- Mutch P.B., Hurley L.S. Effect of zinc deficiency during lactation on postnatal growth and development of rats. *J. Nutr. Philadelphia* v. 104, p. 828-42, 1974.
- Davila M.E., Morris L., Cleary M.O., Row C. Vitamin A during lactation: relationship of material diet to milk vitamin A content and to the vitamin A status of lactating rats and their pups. *J. Nutr. Philadelphia*, v.115, n.8, p.1033-41, 1985.
- Duncan J.R., Hurley L.S. An interactions between zinc and vitamin A in pregnant and fetal rats. *J. Nutr. Philadelphia* v. 108, p.1431-38, 1978.
- Committee on laboratory animal diets/Assembly of Life Sciences National Research Council. Control of diets in laboratory animal experimentation. *Nutr. Abstr. Rev. Slough*, v. 49, p.413-19, 1979.
- Mazza R.P.D. Biodisponibilidade de zinco de diferentes fontes de suplementação em dieta regional de São Paulo. São Paulo, 155p. (Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP), 1992.
- Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14 ed. Arlington, 1141p. 1984.
- Parker M.M., Homeller F.L., Mahlen D.J. Determination of copper and zinc in biological material. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v.13, p. 40-42, 1967.
- Cornelis R. Use of references materials in trace element analysis of foodstuffs. *Food Chem. Barking* v. 43, p.307-13, 1992.
- Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.F., López J.A. The determination of vitamin A and carotene in small quantities of blood serum. *J. Biol. Chem Baltimore*, v.166, p.177-79. 1946.
- Pimentel Gomes F. Curso de estatística experimental. 12 ed. Piracicaba, 467p. 1987.
- Swenerton H., Hurley L.S. Severe zinc deficiency in male and female rats. *J. Nutr. Philadelphia* v.95, p. 8-18, 1968.
- Dowling J.E., Wald G. The biological function of vit. A acid. *Proc. Nat. Acad. Sc. US.* v.46, p.587-608, 1960.
- Lamb A.J., Apiwatanaporn P., Olson J.A. Induction of rapid synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J.Nutr. Philadelphia*, v.1005, p.1140-48. 1974.
- John A., Sivakumar B. Effect of vitamin A deficiency on nitrogen balance and hepatic urea cycle enzymes and intermediates in rats. *J. Nutr. Philadelphia*, v.119, p.29-35, 1989.
- Ravi Kumar K., Das A. Effect of vitamin A deficiency on urinary calculus formation in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* v.8, p.51-60, 1990.
- Rogers W.E., Bieri J.G. Vitamin A deficiency in the rat prior to weaning. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.132, p.622-24. 1969.
- Sivakumar B., Panth M. A new model for producing vitamin A deficiency in rats. *Internat J. Vit. Nutr. Res.* v.63, p.56-62, 1993.
- Underwood E.J. Trace elements in human and animal nutrition. 4<sup>ed</sup>. New York, Academic Press, p.196-233. 1977.
- Takahashi Y.I., Smith J.E., Winick M. Goodman D.S. Vitamin A deficiency and fetal growth and development in the rat. *J. Nutr. Philadelphia*, v.105, p.1299-1310, 1975.
- Hurley L.S., Muth P.B. Prenatal and postnatal development after transitory gestational zinc deficiency in rats. *J. Nutr. Philadelphia*, v. 105, p. 649-56, 1973.
- Smith J.C. Jr., McDaniel E.G., Fan F.F., Halsted J.A. Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism. *Science, Washington*, v. 181, p.954-55, 1973.
- Smith J.E., Brown E.D., Smith J.C. The effect of zinc deficiency on the metabolism of retinol-binding protein in the rat. *J. Lab. Clin. Med. St. Louis*, v.84, p.692-977, 1974.
- Chester J.K., Quatterman J. Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. *Br. J. Nutr.*, London, v. 24, p.1061-69, 1970.
- Park J.H.Y., Grandjean C.J., Antonson D.L., Vanderhoop J.A. Effects of isolated zinc deficiency on the composition of skeletal muscle, liver and bone during growth in rat. *J. Nutr. Philadelphia*, v. 116, p.610-17, 1986.
- Prasad A.S. Experimental zinc deficiency in humans. In: Inglett G.E. ed. Nutritional bioavailability of zinc. *Am Chem Soc. Washington*, p.1-14, 1983.
- Moncilovic B., Belonje B., Giroux A., Shah B.G. Total femur zinc as the parameter of choice for a zinc bioassay in rats. *Nutr. Rep. Int. Los Altos*, v.12, n.3, p.197-203, 1975a.
- Zhou J.R., Canar M.M., Erdamn J.W. Jr. Bone zinc is poorly released in young growing rats fed marginally zinc restricted diet. *J. Nutr. Philadelphia*, v.123, p.1383-88, 1983.
- Jackson M.J., Lowe N.M. Physiology role of zinc. *Food Chem, London*, v. 43, p.233-38, 1992.
- Underwood B.A., Loerch J.D., Lewis K.C. Effects of dietary vitamin A deficiency retinoic acid and protein quantity and quality on serially obtained plasma and liver levels of vitamin A in rats. *J. Nutr. Philadelphia*, v.109, p.796-806, 1979.
- Smith J.C., Brown E.D., McDaniel E.G., Chen W. Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *J. Nutr. Philadelphia*, v.106, p.569-74, 1977.

Recibido: 17-11-1994

Aceptado: 04-10-1995