



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
E RECURSOS PESQUEIROS



**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE E ZINCO DE ALTA
BIODISPONIBILIDADE SOBRE NOVILHAS NELORE PRECOCE E DE SEUS
RESPECTIVOS EMBRIÕES EM RECEPTORAS NAS CONDIÇÕES AMAZÔNICAS**

TEREZINHA TEIXEIRA DE SOUZA

Manaus - Amazonas

Maio/2026

TEREZINHA TEIXEIRA DE SOUZA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE E ZINCO DE ALTA
BIODISPONIBILIDADE SOBRE NOVILHAS NELORE PRECOCE E DE SEUS
RESPECTIVOS EMBRIÕES EM RECEPTORAS NAS CONDIÇÕES AMAZÔNICAS**

Orientador(a): Dr(a). Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas como requisito final para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração Produção Animal.

Manaus - Amazonas

Maio/ 2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- S729e Souza, Terezinha Teixeira de
Efeito da suplementação de cobre e zinco de alta biodisponibilidade sobre novilhas nelore precoce e de seus respectivos embriões em receptoras nas condições amazônicas / Terezinha Teixeira de Souza. - 2026.
68 f. : il., p&b. ; 31 cm.
- Orientador(a): Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Manaus, 2026.
1. Desempenho reprodutivo. 2. Indução da puberdade. 3. Microminerais hidroxilados. 4. Precocidade. I. Ferraz Junior, Marcos Vinicius de Castro. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros. III. Título
-

TEREZINHA TEIXEIRA DE SOUZA**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE E ZINCO DE ALTA BIODISPONIBILIDADE SOBRE NOVILHAS NELORE PRECOCE E DE SEUS RESPECTIVOS EMBRIÕES EM RECEPTORAS NAS CONDIÇÕES AMAZÔNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros. Aprovado em 18 de maio de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS VINICIUS DE CASTRO FERRAZ JUNIOR**
Data: 18/05/2026 11:12:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior

Documento assinado digitalmente
 **MICHEL DO VALE MACIEL**
Data: 18/05/2026 11:30:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Michel do Vale Maciel

Documento assinado digitalmente
 **CHRISTIANO RAPHAEL DE ALBUQUERQUE BORGES**
Data: 18/05/2026 11:49:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Christiano Raphael Albuquerque Borges

Documento assinado digitalmente
 **RHAISSA GARCIA DE ASSIS**
Data: 18/05/2026 12:27:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Rhaíssa Garcia de Assis

Documento assinado digitalmente
 **JULIANO ISSAKOWICZ**
Data: 18/05/2026 11:22:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Juliano Issakowicz

**Aos meus pais,
José Domingos e Nilvanira, por serem o alicerce da
minha vida, exemplo de força, dignidade e amor incondicional.
Tudo o que sou e conquistei tem origem em vocês.
*DEDICO***

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por sempre ser meu alicerce em todos os momentos desta trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Vinicius de Castro Ferraz, pela orientação segura, confiança, oportunidades concedidas e pelos valiosos ensinamentos, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação acadêmica e profissional.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (PPGCARP), pela oportunidade de realização deste doutorado e pelo suporte acadêmico oferecido.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/UPS), pela oportunidade de realização do experimento e pelo suporte acadêmico oferecido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa de estudo e pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, pela disponibilidade em ceder sua propriedade para a condução do experimento, bem como pela confiança e contribuições ao longo deste percurso.

Ao grupo de pesquisa NEPA, pela parceria, amparo e pelos momentos de aprendizado e convivência ao longo dessa jornada. Agradeço aos integrantes: Bismark, Paulo Ricardo, Nelma Fragata, Alexandre Siqueira e Carlos Brandão.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, pela troca de conhecimentos que muito enriqueceram minha formação.

Aos meus irmãos, Francisco, Josiandro, Odete, Josene, Jardel e Naiara, pelo apoio constante e incentivo durante todos esses anos.

Aos meus tios, João Neto e Corina pelo apoio e carinho ao longo de toda a minha trajetória.

Às amigas Géssica Neves, Larissa Salgado e Gisele Santos, pela amizade, companheirismo e pelos momentos compartilhados ao longo desta etapa.

Ao meu marido, Ancelmo Rodrigues, e à minha filha, Helena, por serem minha base, minha força e minha motivação diária. Esta conquista também é de vocês.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, estiveram presentes nesta caminhada, contribuindo para que este sonho se tornasse realidade.

RESUMO

A presente tese teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de cobre (Cu) e zinco (Zn) na forma de hidroximinerais, sobre o status mineral, o desempenho reprodutivo de novilhas doadoras e fêmeas receptoras de embriões bovinos. No capítulo I, foi apresentado uma revisão bibliográfica sobre: a eficiência reprodutiva e precocidade de novilhas Nelore; suplementação de microminerais e seus efeitos na reprodução. No capítulo II, foram avaliados os efeitos da suplementação de cobre (Cu) e zinco (Zn), na forma de hidroximinerais, sobre a produção de oócitos e embriões, o status mineral e o desempenho reprodutivo de novilhas doadoras e fêmeas receptoras de embriões, bem como investigar a influência da precocidade sexual e das variáveis fisiológicas sobre a probabilidade de prenhez. A suplementação com microminerais hidroxilados não afetou a taxa de prenhez nem as perdas gestacionais precoces e tardias, tanto em doadoras quanto em receptoras. A precocidade das doadoras, entretanto, influenciou significativamente os resultados de fertilidade: embriões de novilhas púberes tardias apresentaram maiores taxas de prenhez (44%) do que aqueles de novilhas púberes precoces (23%) ($P = 0,01$). As concentrações séricas de cobre diminuíram ao longo da estação reprodutiva em todos os tratamentos ($P < 0,0001$). Observou-se uma associação positiva entre a concentração sérica de zinco e o escore de condição corporal da receptora ($P = 0,04$). Esses achados sugerem que os benefícios da suplementação hidroximinerais podem ser mais evidentes em cenários de deficiência mineral ou maior desafio nutricional. No capítulo III, foram avaliados os efeitos da suplementação de cobre (Cu) e zinco (Zn), na forma de hidroximinerais, sobre o desempenho produtivo, o status mineral, as características reprodutivas e a taxa de prenhez de fêmeas bovinas, bem como investigar as relações entre essas variáveis por meio de análises multivariadas e modelos de regressão logística. A suplementação com hidroximinerais aumentou a concentração sérica de Zn ($P = 0.0183$) e reduziu a concentração plasmática de Cu ($P = 0.0132$), indicando alterações no metabolismo mineral; no entanto, não foram observadas melhorias no peso corporal, escore de condição corporal, ganho médio diário ou variáveis reprodutivas ($P > 0.05$). As análises de regressão logística e PCA confirmaram a ausência de associações entre concentrações minerais, parâmetros produtivos e probabilidade de prenhez. Em condições adequadas de manejo e nutrição, os hidroximinerais não aumentaram a eficiência reprodutiva.

Palavras-chave: Desempenho reprodutivo; Indução da puberdade; Microminerais hidroxilados; Precocidade.

ABSTRACT

The present thesis aimed to evaluate the effects of copper (Cu) and zinc (Zn) supplementation in the form of hydroxy trace minerals on the mineral status and reproductive performance of donor heifers and recipient cows. Chapter I presents a literature review addressing reproductive efficiency and sexual precocity in Nellore heifers, as well as trace mineral supplementation and its effects on reproduction. In Chapter II, the effects of Cu and Zn supplementation, in the form of hydroxy trace minerals, were evaluated on oocyte and embryo production, mineral status, and reproductive performance of donor heifers and embryo recipient females. In addition, the influence of sexual precocity and physiological variables on pregnancy probability was investigated. Supplementation with hydroxy trace minerals did not affect pregnancy rate or early and late embryonic losses in either donors or recipients. However, donor precocity significantly influenced fertility outcomes: embryos derived from late-maturing heifers showed higher pregnancy rates (44%) than those from early-maturing heifers (23%) ($P = 0.01$). Serum copper concentrations decreased throughout the breeding season across all treatments ($P < 0.0001$). A positive association was observed between serum zinc concentration and body condition score in recipient females ($P = 0.04$). These findings suggest that the benefits of hydroxy trace mineral supplementation may be more evident under conditions of mineral deficiency or greater nutritional challenge. In Chapter III, the effects of Cu and Zn supplementation, in the form of hydroxy trace minerals, were evaluated on productive performance, mineral status, reproductive characteristics, and pregnancy rate of bovine females. Additionally, the relationships among these variables were investigated using multivariate analyses and logistic regression models. Hydroxy trace mineral supplementation increased serum Zn concentration ($P = 0.0183$) and reduced plasma Cu concentration ($P = 0.0132$), indicating changes in mineral metabolism. However, no improvements were observed in body weight, body condition score, average daily gain, or reproductive variables ($P > 0.05$). Logistic regression and principal component analyses confirmed the absence of associations between mineral concentrations, productive parameters, and pregnancy probability. Under adequate management and nutritional conditions, hydroxy trace minerals did not improve reproductive efficiency.

Keywords: Reproductive performance; Puberty induction; Hydroxy trace minerals; Precocity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figure 1 Serum zinc concentration in female bovine embryo recipients according to treatments at the beginning and middle of the breeding season.....	46
Figure 2 Serum copper concentration in female bovine embryo recipients according to treatments at the beginning and middle of the breeding season.	46
Figure 3 Relationship between pregnancy probability and serum copper concentration in bovine female embryo recipients..	47
Figure 4 Relationship between pregnancy probability and serum zinc concentration in bovine female embryo recipients.	47
Figure 5 Relationship between serum Zn concentration and body condition score of female bovine embryo recipients..	48
Figure 6 Relationship between serum Cu concentration and body condition score of female bovine embryo recipients..	48
Figure 7 Relationship between pregnancy probability and body condition score of bovine females receiving embryos.	49

CAPÍTULO III

Figure 1 PCA analysis of quantitative variables of bovine embryo recipient females.....	63
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1 Average agronomic and nutritional characteristics of pasture during the experimental period.....	40
Table 2 Average mineral contents in pasture during the experimental period.....	40
Table 3 Average oocyte and embryo production of Nellore heifers	42
Table 4 Performance of embryo recipient females receiving mineral supplements.....	43
Table 5 Effect of mineral supplementation on reproductive performance and serum Cu and Zn concentrations of embryo recipient females.....	44
Table 6 Effect of mineral supplementation on reproductive performance and serum Cu and Zn concentrations of donor nellore heifers.	44
Table 7 Effect of precocity of donor nellore heifers on reproductive performance and serum concentration of Cu and Zn.	45

CAPÍTULO III

Table 1 Chemical composition of experimental diets for Nellore heifers.....	56
Table 2 Average agronomic and nutritional characteristics of pasture during the experimental period.....	58
Table 3 Average mineral contents in pasture during the experimental period.....	58
Table 4 Effect of mineral supplementation on reproductive performance and serum Cu and Zn concentrations of F1 crossbred heifers (Angus x Nellore) in fixed-time embryo transfer.....	61
Table 5 Logistic equations for the effect of the studied variables and their relationship with the pregnancy rate.	62

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Pecuária de corte no Brasil, eficiência reprodutiva e precocidade	17
3.2 Importância dos microminerais na reprodução bovina.....	19
3.3 Cobre e zinco: funções fisiológicas e impacto na função ovariana.....	21
3.4 Cobre e zinco: qualidade embrionária e ambiente uterino	23
3.5 Hidroximinerais como fontes de alta biodisponibilidade	25
4. REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO II – SUPPLEMENTATION WITH HYDROXY TRACE MINERALS III: EFFECTS ON OOCYTE AND EMBRYO PRODUCTION AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF DONOR AND RECIPIENT NELLORE HEIFERS.....	35
ABSTRACT	35
5. Introduction	36
6. Materials and methods.....	37
7 Results	41
8 Discussion.....	49
9 Conclusion.....	50
10 References	51
CAPÍTULO III – EFFECT OF HYDROXYMINERAL SUPPLEMENTATION ON THE REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF EMBRYO DONOR AND RECIPIENT HEIFERS....	53
Abstract.....	53
11 Introduction	54
12 Materials and methods.....	55
13 Results	60
14 Discussion.....	64
15 Conclusion.....	65
Acknowledgments	65
16 References	66
17 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é uma das atividades econômicas mais importantes no estado do Amazonas, principalmente no interior. Nos últimos anos, as crescentes preocupações com os impactos ambientais decorrentes da expansão acelerada dessa prática impulsionaram a demanda por tecnologias que visam aumentar a produtividade, reduzir custos e assegurar a sustentabilidade econômica, social e ambiental. Paralelamente, observa-se um deslocamento da produção de bovinos de corte para a região Norte do Brasil, atribuível em parte aos preços acessíveis das terras, à disponibilidade hídrica e ao clima favorável na região (Mores et al., 2022). Nesse sentido, estudos voltados para a intensificação da pecuária de corte revela-se crucial tanto para a modernização do setor quanto para a preservação ambiental.

Entre as estratégias de intensificação, a redução da idade ao primeiro parto destaca-se como um dos principais fatores para o aumento da eficiência produtiva, uma vez que eleva o número de bezerros produzidos por vaca ao longo de sua vida reprodutiva (Nunez-Dominquez et al., 1991). No Brasil, o Nelore (*Bos indicus*) é a principal raça de corte produzida (Miszura et al., 2021). No entanto, um desafio significativo associado a essa raça são as novilhas que alcançam a maturidade sexual tardiamente, ou seja, entram na vida produtiva entre 2 e 3 anos de idade, ou até mais velhas, em comparação às raças europeias (*Bos taurus*), nas quais a puberdade ocorre, por volta dos 2 anos (Gunski et al., 2001; Sereno et al., 2001; Ferraz et al., 2018; Miszura et al., 2021). A idade avançada na puberdade e, consequentemente, no primeiro parto é um fator que impacta negativamente o retorno econômico na bovinocultura de corte (Eler et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Terakado et al., 2015; Lima, et al., 2020).

Embora amplamente difundido na prática de campo, o conceito de novilhas precoces baseado exclusivamente na prenhez após protocolos hormonais carece de validação científica consistente. Haja visto que, essa denominação pode não estar correta, uma vez que o uso de hormônios pode induzir uma ovulação e não necessariamente induzir a puberdade, visto que algumas novilhas não respondem ao protocolo e a taxa de perda gestacional tende a ser mais alta nessa categoria. Dessa forma, acredita-se que novilhas induzidas por meio de protocolos hormonais, sem seleção para precocidade sexual (“tardias”) que ficam prenhes, podem ser classificadas como precoces, induzindo

a uma falha na seleção genética. Apesar dos protocolos hormonais serem uma ferramenta efetiva, eles não podem modificar a genética da fêmea.

Técnicos de campo têm relatado altas taxas de perda embrionária e baixa taxa de prenhez nas novilhas emprenhadas precocemente. No entanto, ainda não há publicações científicas que tenha avaliado de forma abrangente a taxa de perdas embrionárias precoce e tardia dessas novilhas ditas precoce. A maioria dos estudos conduzidos até o momento limitou-se a acompanhar o desenvolvimento dessas novilhas até a manifestação da puberdade ou até a confirmação da prenhez aos 30 dias. Assim, permanece incerto se a menor eficiência reprodutiva observada está associada à indução precoce da ovulação ou a outros fatores fisiológicos, nutricionais ou metabólicos ainda não elucidados.

Além disso, é amplamente comprovado na literatura que novilhas pré-púberes apresentam baixa qualidade embrionária quando passam por produção *in vitro* de embriões (Kauffold et al., 2005; Landry et al., 2016; Landry et al., 2018). No entanto, não é sabido se novilhas induzidas à puberdade por meio de protocolo hormonal produzem embriões de menor qualidade quando comparado com novilhas púberes espontaneamente, e se isso é um fator determinante para a baixa taxa de prenhez observada nas novilhas emprenhadas precocemente.

Nesse contexto, a nutrição mineral, especialmente o suprimento de microminerais como o cobre (Cu) e o Zinco (Zn), desempenham papel fundamental na regulação da função reprodutiva. Esses elementos estão envolvidos em processos essenciais, como a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), a divisão celular, a oxidação e a manutenção da integridade celular. Alguns estudos demonstraram que adição de Zn na fertilização *in vitro* pode diminuir os danos ao DNA e apoptose nas células do cumulus por agir como antioxidante (Lequarre et al., 2001; Picco et al., 2010 e Jeon et al., 2014; LU et al., 2018), bem como aumentar a atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) nas células do cumulus, proporcionando um efeito antioxidante nos embriões (Anchordoquy et al., 2013; 2014). Apesar desses avanços, ainda são limitados os estudos que avaliam o efeito da suplementação de Cu e Zn em novilhas Nelore e seu efeito na qualidade embrionária, a produção de embriões e a mortalidade embrionária em condições de campo.

A forma de suplementação mineral pode influenciar a biodisponibilidade desses elementos. Estudos recentes têm mostrado que microminerais na forma de hidroximinerais apresentam maior estabilidade no rúmen e melhor biodisponibilidade em comparação às fontes tradicionais, resultando em maiores concentrações plasmáticas e hepáticas de Cu e Zn (Vanvalin et al., 2018; Vanvalin et al., 2019). Entretanto, ainda são

limitados os estudos que avaliam o uso de microminerais na forma de hidroximinerais e seus efeitos na eficiência reprodutiva.

Diante do exposto, levanta-se a hipótese de que a suplementação de Cu e Zn na forma de hidroximinerais, por apresentar maior biodisponibilidade, melhora o status mineral de novilhas Nelore, aumentando a competência ovocitária, o desenvolvimento embrionário e a eficiência reprodutiva. Além disso, hipotetiza-se que novilhas submetidas à indução hormonal apresentem menor qualidade embrionária e menor taxa de prenhez quando comparadas a novilhas púberes espontaneamente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de cobre (Cu) e zinco (Zn) na forma de hidroximinerais, sobre o status mineral, o desempenho reprodutivo de novilhas doadoras e fêmeas receptoras de embriões bovinos.

2.2. Objetivos Específicos

CAPÍTULO II:

Experimento I – Produção in vitro de embriões

- Avaliar o efeito da suplementação de Cu e Zn sobre a produção e qualidade de oócitos (graus G1, G2, G3 e oócitos viáveis);
- Avaliar a interação entre os tratamentos e a precocidade sexual sobre a resposta ovariana;
- Avaliar o efeito da suplementação sobre a produção total de embriões.

Experimento II – Transferência dos embriões

a) Desempenho produtivo e status mineral

- Avaliar o efeito da suplementação sobre o peso corporal e o escore de condição corporal das fêmeas receptoras;
- Avaliar as concentrações séricas de Cu e Zn em doadoras e receptoras;

b) Desempenho reprodutivo

- Avaliar o efeito da suplementação sobre a taxa de prenhez e as perdas gestacionais precoces e tardias;
- Avaliar o diâmetro do corpo lúteo em doadoras e receptoras;
- Avaliar o efeito da precocidade sexual das doadoras sobre a taxa de prenhez dos embriões produzidos;
- Investigar a relação entre as concentrações séricas de Cu e Zn, o escore de condição corporal e a probabilidade de prenhez.

CAPÍTULO III:

- Avaliar a suplementação de Cu e Zn sobre o desempenho produtivo: peso corporal, escore de condição corporal e ganho médio diário;
- Avaliar o status mineral, por meio das concentrações sanguíneas de Cu e Zn;

- Investigar as respostas reprodutivas e endócrinas, como: manifestação do estro, diâmetro folículo, diâmetro do corpo lúteo e concentrações de progesterona;
- Avaliar a taxa de prenhez;
- Modelar a probabilidade de prenhez em função das variáveis produtivas, minerais e reprodutivas, por meio de regressão logística;
- Analisar a inter-relação entre as variáveis estudadas por meio de análise de componentes principais (PCA).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pecuária de corte no Brasil, eficiência reprodutiva e precocidade

A pecuária de corte brasileira consolidou-se, nas últimas décadas, como uma das mais relevantes do mundo em termos de produção e exportação de carne bovina (IBGE, 2025; ABIEC, 2025). Entre 2004 e 2024, o setor apresentou avanços expressivos em produtividade, eficiência e sustentabilidade. Nesse período, o rebanho nacional cresceu 11%, enquanto a área de pastagens foi reduzida em aproximadamente 11%. Em contrapartida, a produtividade aumentou mais de 70%, passando de 2,8 para quase 5 arrobas por hectare ao ano, evidenciando o processo de intensificação produtiva e a crescente adoção de tecnologias no campo (ABIEC, 2025). O maior rebanho bovino concentra-se no Centro-Oeste, com cerca de 32%, seguida pela região Norte, que apresenta mais de 50 milhões de cabeças e crescimento aproximado de 60% nas últimas duas décadas, evidenciando a expansão da atividade em áreas tropicais (ABIEC, 2025). Ainda assim, a eficiência reprodutiva permanece como um dos principais fatores limitantes da sustentabilidade econômica dos sistemas de produção, especialmente na região Norte.

O uso da inseminação artificial (IA) tem crescido significativamente no Brasil nas últimas décadas, impulsionado principalmente pela ampla adoção da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), o que reflete na intensificação dos sistemas produtivos e o avanço do melhoramento genético nos rebanhos bovinos (ASBIA, 2025). Entretanto, ainda há aspectos relacionados às fêmeas que podem ser aprimorados para aumentar o retorno produtivo. A categoria de novilhas, destinadas à reprodução, é considerada improdutiva até que produza seu primeiro bezerro, que é a principal fonte de receita em uma fazenda de cria. Portanto, um limitante para maior desenvolvimento da pecuária de corte é a idade avançada das fêmeas ao primeiro parto, pois retarda o retorno financeiro à propriedade (Nunez-Dominguez et al., 1991).

No rebanho brasileiro, a idade ao primeiro parto (IPP) é notavelmente alta, em média, por volta dos 36 meses de idade, em contraste com países como os Estados Unidos, onde a IPP média é próxima de 24 meses (Nogueira, 2004; Day e Nogueira, 2013, Miszura et al., 2021). Essa discrepância é atribuída, no Brasil, à exposição tardia das fêmeas à reprodução, uma vez que as novilhas alcançam a puberdade por volta dos 22 e 36 meses (Nogueira, 2004). No entanto, para otimizar o desempenho reprodutivo das fêmeas de corte ao longo de suas vidas produtivas, o ideal é que elas sejam expostas à

reprodução antes dos dois anos de idade (Nunez-Dominguez et al., 1991). Alguns estudos demonstram que a antecipação da exposição reprodutiva, aliada a adequado suporte nutricional, pode reduzir significativamente a IPP sem prejuízos ao desempenho produtivo subsequente das fêmeas (Day e Nogueira, 2013; Sartori et al., 2024).

A precocidade sexual está diretamente associada à maturação funcional do eixo hipotálamo–hipófise–ovário (HHO), processo regulado por sinais metabólicos e endócrinos que refletem o balanço energético e o estado nutricional do animal. A ativação pulsátil da liberação de GnRH e, consequentemente, de LH, é sensível não apenas ao ganho de peso e à composição corporal, mas também à disponibilidade de micronutrientes essenciais envolvidos na síntese hormonal, na sinalização celular e na proteção contra o estresse oxidativo (Diskin e Kenny, 2016).

Em ambientes tropicais, como na Amazônia, a expressão da precocidade sexual enfrenta desafios adicionais. A sazonalidade da produção de forragem, a elevada umidade, o estresse térmico e a maior pressão parasitária afetam o metabolismo energético e mineral das fêmeas, retardando a ativação do eixo reprodutivo. Além disso, solos altamente intemperizados e forrageiras com baixos teores de microminerais biodisponíveis, o que pode limitar a eficiência metabólica mesmo em animais com adequado ganho de peso corporal (McDowell, 2005; Valadares Filho et al., 2016).

A adoção de biotecnologias reprodutivas, como a IATF, permitiu ampliar a taxa de serviço e antecipar a utilização reprodutiva de novilhas, inclusive pré-púberes. Protocolos hormonais à base de progesterona (P4) têm sido amplamente utilizados para induzir a primeira ovulação, possibilitando a prenhez de novilhas jovens. No entanto, evidências científicas indicam que a indução hormonal da ovulação nem sempre equivale ao estabelecimento definitivo da puberdade fisiológica, podendo ocorrer falhas na manutenção da ciclicidade estral e aumento das taxas de perdas gestacionais, especialmente em novilhas muito jovens ou com desenvolvimento corporal e metabólico incompletos (Perry, 2012; Rodrigues et al., 2013).

As taxas de puberdade obtidas após os protocolos de indução podem ser elevadas, dependendo do protocolo utilizado, das condições fisiológicas das novilhas e do manejo adotado (Imwalle et al., 1998). De modo geral, a utilização de dispositivos intravaginais de progesterona (DIV), associada a indutores de luteólise, tem demonstrado eficácia na indução da puberdade, embora variações na duração do tratamento e na reutilização dos dispositivos influenciem os resultados. Estudos relatam que protocolos com diferentes tempos de exposição à progesterona e concentrações hormonais podem impactar as taxas

de estro, ovulação e concepção em novilhas de corte (Claro Júnior et al., 2010; Rodrigues et al., 2013). Além disso, o intervalo entre o término do protocolo de indução e o início da IATF também pode influenciar a fertilidade, evidenciando a importância do ajuste estratégico dos protocolos hormonais.

Segundo Nogueira (2004) a primeira ovulação em novilhas *Bos indicus* é frequentemente seguida por um ciclo estral de curta duração, o que está associado à formação de um corpo lúteo funcionalmente imaturo e à produção reduzida de progesterona nos primeiros ciclos pós-puberdade. Além disso, pode ocorrer uma maturação pós-púbere, evidenciada pela maior fertilidade obtida após os primeiros ciclos estrais no início da puberdade (Perry, 2012). No entanto, ainda existe uma lacuna científica se o que ocorre de fato é a indução de puberdade ou apenas a indução da primeira ovulação, e se há diferença entre novilhas precoces e tardias na resposta ao protocolo hormonal para induzir a puberdade.

Dessa forma, embora a antecipação da puberdade e da prenhez represente estratégia economicamente atrativa, sua continuidade reprodutiva depende de suporte nutricional adequado, especialmente no que se refere ao suprimento de microminerais essenciais. A compreensão dos fatores que modulam a precocidade sexual em novilhas Nelore, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias nutricionais e reprodutivas que promovam não apenas a prenhez precoce, mas também a manutenção da gestação e o desempenho produtivo.

3.2 Importância dos microminerais na reprodução bovina

Os microminerais desempenham papel essencial na manutenção da homeostase metabólica e reprodutiva dos bovinos, atuando como cofatores enzimáticos, reguladores da expressão gênica e componentes de sistemas antioxidantes. Diferentemente dos macrominerais, pequenas variações na ingestão, absorção ou biodisponibilidade desses elementos podem resultar em impactos fisiológicos significativos, especialmente em tecidos de elevada atividade metabólica, como os órgãos reprodutivos (Hostetler et al., 2003; Suttle, 2021).

Na reprodução bovina, o adequado suprimento de microminerais está diretamente associado à puberdade, à dinâmica folicular, à ovulação, à função luteal, à manutenção da gestação inicial e ao desenvolvimento embrionário. Estudos indicam que deficiências, mesmo em níveis subclínicos, são suficientes para comprometer o desempenho reprodutivo, particularmente em sistemas extensivos, nos quais o monitoramento

nutricional é limitado e a suplementação mineral nem sempre atende as exigências dos animais (McDowell, 2005; Spears e Weiss, 2014; Wang et al., 2026).

Entretanto, embora os efeitos negativos da deficiência mineral sejam amplamente reconhecidos, a maior parte dos estudos disponíveis derivam de experimentos conduzidos em condições controladas ou em sistemas intensivos. Nessas condições, a interação entre nutrientes é mais previsível e o controle sobre a dieta é mais rigoroso, o que limita a extrapolação direta dos resultados para sistemas tropicais extensivos. Nesses ambientes, fatores como variabilidade na qualidade das forrageiras, presença de antagonistas minerais e flutuações sazonais na disponibilidade de nutrientes tornam o status mineral dos animais mais dinâmico e, muitas vezes, subestimado.

Em regiões tropicais, a ocorrência de deficiências minerais é amplamente documentada e resulta da combinação de solos altamente intemperizados, forrageiras com baixa concentração mineral e elevada presença de elementos antagonistas, como ferro, enxofre e molibdênio (Suttle, 2021). O estudo de McDowell et al. (1983) ilustra bem a deficiência mineral das pastagens tropicais. De acordo com esse autor, 47% das pastagens tropicais foram deficientes em cobre e 75% em zinco. Na região amazônica, essas condições são intensificadas pelo regime pluviométrico elevado, que favorece a lixiviação de minerais do solo e reduz sua disponibilidade para as plantas, tornando a suplementação mineral estratégica para a manutenção da eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos (McDowell, 2005). Ainda assim, mesmo em sistemas com suplementação, deficiências subclínicas podem persistir, especialmente quando se considera a biodisponibilidade das fontes minerais utilizadas.

Entre os microminerais de maior relevância para a reprodução bovina, destacam-se o Cu e o Zn, tanto pela elevada deficiência em sistemas tropicais quanto pelas funções fisiológicas associadas ao sistema reprodutivo. A deficiência de Cu está associada a atrasos na puberdade, irregularidade dos ciclos estrais, redução da taxa de concepção e aumento da incidência de perdas embrionárias precoces, efeitos atribuídos principalmente ao comprometimento da função luteal e da síntese de progesterona (Hostetler et al., 2003; Suttle, 2021; Wang et al., 2026). Entretanto, a magnitude desses efeitos pode variar em função da presença de antagonistas minerais na dieta, como enxofre e molibdênio, que reduz significativamente a absorção de Cu, mesmo quando os níveis dietéticos aparentam ser adequados, o que evidencia a importância de se considerar não apenas a concentração, mas também a biodisponibilidade desses elementos. De acordo com o NASEM (2016), a

exigência de Cu para bovinos de corte é em torno de 10 mg/kg de matéria seca da dieta, podendo variar conforme categoria animal e condições dietéticas.

O zinco, por sua vez, desempenha papel central na integridade celular e na regulação de processos fundamentais à reprodução, incluindo sínteses de DNA e RNA, divisão celular e modulação do apoptose. Além disso, está diretamente envolvido na foliculogênese, na maturação ovocitária e na competência dos complexos cúmulus-ovócito. Estudos indicam que a deficiência de Zn compromete a qualidade ovocitária e reduz a capacidade de desenvolvimento embrionário, mesmo na ausência de alterações evidentes no desempenho produtivo geral do animal (Jeon et al., 2016; Lu et al., 2018). No entanto, assim como observado para o Cu, grande parte dessas evidências é proveniente de estudos *in vitro* ou em experimentos controlados, havendo ainda limitada compreensão de seus efeitos em condições de campo, especialmente em sistemas extensivos. A exigência de Zn para bovino de corte é em torno de 30 mg/kg de matéria seca da dieta, conforme estabelecido pelo NASEM (2016).

Um dos principais mecanismos pelos quais o Cu e o Zn influenciam a reprodução está relacionado ao controle do estresse oxidativo. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) é particularmente prejudicial aos tecidos reprodutivos, ovócitos, embriões e células luteais apresentam sensibilidade a danos oxidativos. A enzima Cu/Zn-SOD constitui um dos principais sistemas de defesa antioxidante celular, sendo essencial para a proteção da integridade estrutural e funcional desses tecidos (Spears e Weiss, 2014; Noda et al., 2012).

Nesse contexto, o adequado suprimento de microminerais, como Cu e Zn, pode contribuir indiretamente para a eficiência reprodutiva, uma vez que esses elementos participam de mecanismos envolvidos na função luteal e na proteção contra o estresse oxidativo. Entretanto, embora a associação entre o status mineral e eficiência reprodutiva seja consistente, ainda há lacunas na literatura quanto a magnitude desses efeitos em sistemas de produção a campo e quanto à interação entre o status mineral e outras variáveis fisiológicas, como idade, condição corporal e estágio reprodutivo.

3.3 Cobre e zinco: funções fisiológicas e impacto na função ovariana

A função ovariana depende de um equilíbrio entre sinais endócrinos, metabólicos e locais, que regulam a ativação folicular, o crescimento e a seleção do folículo dominante, a ovulação e a formação do corpo lúteo. Nesse contexto, o adequado suprimento de microminerais, como o Cu e Zn, é determinante para a eficiência desses

processos, uma vez que ambos participam diretamente de vias bioquímicas essenciais à homeostase ovariana.

O zinco desempenha papel central na regulação da foliculogênese, atuando como cofator de enzimas envolvidas na síntese de DNA, na transcrição gênica e na proliferação celular. Durante o crescimento folicular, a disponibilidade adequada de Zn é fundamental para a manutenção da viabilidade das células da granulosa e do cúmulus, assim como para a comunicação bidirecional entre essas células e o ovócito. Estudos demonstram que a deficiência de Zn compromete a progressão meiótica do ovócito, reduz a competência citoplasmática e nuclear e está associada a menores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente (Picco et al., 2010; Jeon et al., 2016). Além disso, Gabel e Diaz, 2025 demonstraram que a deficiência de Zn pode induzir apoptose em células da granulosa, comprometendo a integridade do ambiente folicular.

A suplementação injetável de Zn no início do protocolo de IATF aumentou o tamanho do folículo pré-ovulatório, a concentração plasmática de P4 e as taxas de prenhez em vacas de corte. Tem sido demonstrado que o Zn inibe a apoptose em células luteais de ratos (Zhang et al., 1998) e a deficiência de Zn na dieta pode causar uma diminuição do CL em camundongos (Taneja et al., 1990). Além disso, estudos apontam que a enzima Cu/Zn-SOD para manter o tamanho de CL e a produção de P4 (Nishimura et al. 2008; Kawaguchi et al., 2013). A enzima Cu/Zn-SOD é uma das principais no mecanismo de defesa celular de espécies reativas de oxigênio (Ho, 2004). Assim, a ligação de Zn à SOD é essencial para sua função biológica adequada (Borchelt et al., 1994; Sahawneh et al., 2010). Em animais com deficiência de Zn, a atividade reduzida da Cu/Zn-SOD pode danificar as células luteais, diminuir o tamanho de CL e reduzir a produção de P4. É amplamente demonstrado que o aumento da concentração de P4 pós IA está associado ao aumento da taxa prenhez (Ferraz et al., 2016; Santos et al., 2018).

O cobre, por sua vez, está relacionado à função ovariana por meio de sua participação em sistemas enzimáticos antioxidantes e na angiogênese. A enzima Cu/Zn-SOD desempenha papel fundamental na neutralização das espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo celular intenso que caracteriza o crescimento folicular e a luteinização. A adequada atividade dessa enzima é essencial para a proteção das células ovarianas contra danos oxidativos que podem comprometer a qualidade ovocitária e a função luteal (Spears e Weiss, 2014; Noda et al., 2012).

A deficiência de Cu tem sido associada a alterações na dinâmica folicular, formação de corpos lúteos de menor tamanho e redução da secreção de progesterona.

Estudos experimentais indicam que a redução da atividade da enzima Cu/Zn-SOD favorece o acúmulo de espécies reativas de oxigênio no ovário, resultando em apoptose de células luteais e comprometimento da manutenção da prenhez, conforme demonstrado em estudos realizados com camundongos (Noda et al., 2012) e em iaques domésticos (Lou et al., 2025).

Em novilhas jovens, particularmente aquelas expostas precocemente à reprodução, a demanda por Cu e Zn pode ser ainda maior em função da concomitância entre crescimento corporal, maturação do eixo reprodutivo e ativação ovariana. Nessa fase, deficiências subclínicas desses microminerais podem não se refletir em alterações evidentes no desempenho produtivo, mas impactar negativamente a qualidade ovocitária, a taxa de ovulação e a competência luteal, comprometendo a eficiência reprodutiva a curto e longo prazo (Diskin e Kenny, 2016).

Além disso, o ambiente metabólico e mineral pode modular a resposta ovariana a protocolos hormonais de indução de puberdade e sincronização do estro. Estudos indicam que a eficiência desses protocolos depende não apenas de estratégia hormonal empregada, mas também da condição fisiológica da fêmea, influenciando a taxa de ovulação, a qualidade do corpo lúteo e a secreção de progesterona subsequente (Day e Nogueira, 2013; Perry, 2016; Wang et al., 2026).

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos pelos quais o Cu e Zn modulam a função ovariana, a maioria dos estudos foram conduzidos em condições experimentais controladas ou em espécie não zebuínas. Ainda são limitados os estudos que avaliam de forma integrada a relação entre status mineral, resposta ovariana e desempenho reprodutivo em novilhas zebuínas precoce e de seus embriões. Essa lacuna é particularmente relevante em programas que visam a antecipação da puberdade, nos quais a qualidade do ovócito produzido constitui a etapa determinante para o sucesso reprodutivo subsequente.

3.4 Cobre e zinco: qualidade embrionária e ambiente uterino

O desenvolvimento embrionário inicial constitui uma das fases mais críticas da reprodução, caracterizando-se por intensa atividade metabólica, rápida divisão celular e elevada sensibilidade a alterações no ambiente uterino. Após a fecundação, a sobrevivência e o desenvolvimentos do embrião passam a depender não apenas de sua competência intrínseca, mas também da interação com o ambiente materno, que regula processos essenciais como a implantação e a manutenção da gestação.

Nesse contexto, os microminerais exercem papel fundamental tanto na qualidade embrionária quanto na manutenção do ambiente uterino. O cobre e o zinco destacam-se por sua participação em sistemas antioxidantes, na regulação da expressão gênica e na integridade celular de tecidos embrionários e endometriais. A adequada disponibilidade desses minerais é essencial para proteger o embrião contra o estresse oxidativo, condição frequentemente associada à fragmentação do DNA, à apoptose celular e à falha no desenvolvimento embrionário (Hostetler et al., 2003; Anchordoquy et al., 2013; Suttle, 2021; Wang et al., 2026).

Embora estudos conduzidos em condições *in vitro* demonstre efeitos positivos da suplementação de microminerais sobre o desenvolvimento embrionário, a extrapolação desses resultados para estudo *in vivo* deve ser feita com cautela. Em condições de campo, o sucesso da gestação depende fortemente da capacidade uterina da fêmea receptora em sustentar o embrião, o que pode explicar a variabilidade observada nas taxas de prenhez e perdas gestacionais.

O cobre, exerce influência indireta sobre a qualidade embrionária por meio de sua atuação na função luteal e na síntese de progesterona. A adequada produção de progesterona é fundamental para a preparação do endométrio, a modulação da resposta imune uterina e a manutenção de um ambiente propício à sobrevivência embrionária. Deficiências de Cu estão associadas à redução da atividade da enzima Cu/Zn-superóxido dismutase, favorecendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio no útero e comprometendo a receptividade endometrial (Suttle, 2021; Wang et al., 2026).

O zinco, contribui diretamente para a manutenção da integridade celular e da homeostase redox, podendo influenciar o ambiente uterino, sendo fundamental para a regulação da expressão gênica e para a estabilidade de estruturas proteicas e nucleares envolvidas no desenvolvimento embrionário (Jeon et al., 2014; Lu et al., 2018). Além disso, participa de processos relacionados à comunicação materno-embrionária durante o período de reconhecimento da gestação, etapa crítica para o estabelecimento da gestação.

A sinalização adequada entre o embrião e o útero depende de um ambiente hormonal e metabólico equilibrado, no qual a progesterona exerce papel central. Dessa forma, maiores concentrações de progesterona no período pós-inseminação estão associadas a maior taxa de prenhez e menor incidência de perdas embrionárias precoces (Santos et al., 2018), evidenciando que a eficiência reprodutiva depende da integração entre qualidade embrionária e ambiente uterino. Contudo, mesmo embriões de alta

qualidade morfológica pode apresentar baixo desempenho após a transferência, caso a receptora não apresente condições fisiológicas adequadas para sustentar a gestação.

Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário, a maior parte dos estudos foram realizados *in vitro*. São limitados os estudos que avaliam, de forma integrada e em condições de campo, os efeitos da suplementação de Cu e Zn sobre a qualidade embrionária, a receptividade uterina e a manutenção da gestação em fêmea bovina, especialmente em sistemas extensivos tropicais.

Nesse contexto, torna-se fundamental compreender como o status mineral de doadoras e receptoras influencia, de forma conjunta, o sucesso reprodutivo. Em regiões como a Amazônia, onde desafios nutricionais e ambientais são intensificados, essa abordagem é essencial para elucidar os mecanismos associados às perdas gestacionais e para o desenvolvimento de estratégias nutricionais que aumentem a eficiência de programas de biotecnologias reprodutivas.

3.5 Hidroximinerais como fontes de alta biodisponibilidade

A forma química sob a qual os microminerais são fornecidos na dieta exerce influência direta sobre sua estabilidade no trato digestivo, sua absorção intestinal e, consequentemente, sua disponibilidade metabólica para os tecidos. Tradicionalmente, os microminerais utilizados para ruminantes são fornecidos na forma de sais inorgânicos, como sulfatos e óxidos. Entretanto, essas fontes apresentam limitações importantes, especialmente em sistemas de produção a pasto, nos quais a interação com componentes da dieta pode comprometer sua absorção.

Os microminerais inorgânicos são altamente reativos no ambiente ruminal, podendo interagir com elementos antagonistas, como enxofre, molibdênio e ferro, além de compostos fenólicos presentes nas forrageiras, formando complexos insolúveis que reduzem a disponibilidade de Cu e Zn. Em ambientes tropicais, onde a composição mineral das forrageiras e da água pode intensificar antagonismos minerais, essas interações assumem relevância ainda maior, favorecendo deficiências subclínicas mesmo quando os níveis dietéticos aparentam ser adequados (McDowell, 2005; Suttle, 2021; Spears, 2019).

Como alternativa às fontes tradicionais, os hidroximinerais têm sido propostos com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade e reduzir perdas no trato digestivo. Enquanto fontes orgânicas apresentam maior estabilidade por estarem ligadas a

compostos orgânicos, os hidroximinerais se destacam por sua estrutura cristalina única, formada por ligações covalentes, diferindo, portanto, das ligações iônicas presentes nas fontes inorgânicas. Os microminerais hidroxilados se ligam covalentemente a um grupo OH, enquanto os microminerais orgânicos se ligam covalentemente a um ligante contendo carbono (Arthington, 2015), que confere menor solubilidade no rúmen e maior estabilidade frente as interações com antagonistas (Genther e Hansen, 2015).

Segundo Arthington e Ranches, (2021), o Cu e Zn na forma de hidroximinerais apresentam dinâmica diferenciada de associação a digesta, com menor ligação à fração sólida do rúmen e liberação gradual ao longo do trato gastrointestinal. Como consequência desses mecanismos, observa-se melhora na utilização dos nutrientes, sendo relatado, em meta-análise, aumento na digestibilidade da matéria seca e da fibra em bovinos suplementados com hidroximinerais em substituição às fontes sulfato (Ibraheem et al., 2023). Embora, esses achados evidenciem a superioridade dos hidroximinerais em relação às fontes tradicionais não é absoluta e pode depender de fatores como o nível basal de deficiência mineral e as condições ambientais.

No contexto reprodutivo, a maior biodisponibilidade dos hidroximinerais pode representar vantagem estratégica, especialmente em sistemas extensivos tropicais. Ao proporcionar suprimento mais consistente de Cu e Zn aos tecidos ovarianos e uterinos, essas fontes favorecem a atividade de enzimas antioxidantes, a função luteal e a manutenção de um ambiente endócrino. No entanto, os efeitos diretos sobre a resposta reprodutiva ainda são inconsistentes na literatura, com estudos demonstrando desde ausência de efeito até respostas variáveis dependendo do status nutricional dos animais e das condições experimentais (Springman et al., 2021; Arthington e Ranches, 2021). Em programas de produção *in vitro* e transferência de embriões, nos quais a eficiência depende da integração entre qualidade embrionária e ambiente uterino, o uso de hidroximinerais pode contribuir para a redução de variabilidade na resposta das doadoras e receptoras. Ao minimizar variações no status mineral, essas fontes podem favorecer maior uniformidade na competência ovocitária, no desenvolvimento embrionário e na receptividade uterina, aspectos críticos para o sucesso das biotecnologias reprodutivas.

Apesar do crescente interesse pelos hidroximinerais, ainda são limitados os estudos que avaliam seus efeitos sobre parâmetros reprodutivos em fêmea bovina, especialmente sob as condições ambientais da Amazônia. A maioria dos estudos concentra-se em desempenho zootécnico ou status mineral hepático, com menor ênfase nos desfechos reprodutivos e embrionários.

Nesse sentido, trona-se necessário investigar de forma integrada como a suplementação de Cu e Zn na forma de hidroximinerais influencia a função ovariana, o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação. Essa abordagem é relevante em sistemas de produção da Amazônia, onde desafios nutricionais e ambientais podem amplificar os efeitos de deficiências minerais. Assim, a presente tese propõe avaliar esses efeitos de forma integrada em doadoras e receptoras, contribuindo para o avanço do conhecimento científico e para o desenvolvimento de estratégias nutricionais que aumentem a eficiência reprodutiva e a sustentabilidade dos sistemas de produção de bovino de corte.

Essa lacuna científica reforça a relevância da presente tese, que propõe avaliar os efeitos da suplementação de cobre e zinco de alta biodisponibilidade sobre doadoras, embriões e receptoras, contribuindo tanto para o avanço do conhecimento científico na interface entre nutrição mineral e reprodução bovina quanto para a aplicação prática de tecnologias que promovam maior eficiência reprodutiva, redução de perdas e aumento da rentabilidade dos sistemas de produção de bovinos de corte.

4. REFERÊNCIAS

- ANCHORDOQUY, J.M.; ANCHORDOQUY, J.P.; GALARZA, E.M.; FARNETANO, N.A.; GIULIODORI, M.J.; NIKOLOFF, N.; FAZZIO, L.E.; FURNUS, C.C. Parenteral Zinc Supplementation Increases Pregnancy Rates in Beef Cows. **Biological Trace Element Research**, 192, 175-182, 2019.
- ANCHORDOQUY, J.P.; ANCHORDOQUY, J.M.; SIRINI, M.A.; MATTIOLI, G.; PICCO, S.J.; FURNUS, C.C. Effect of different manganese concentrations during *in vitro* maturation of bovine oocytes on DNA integrity of cumulus cells and subsequent embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, 48(6):905-11. 2013.
- ANCHORDOQUY, J.P.; ANCHORDOQUY, J.M.; PICCO, S.J.; SIRINI, M.A.; ERRECALDE, A.L.; FURNUS, C.C. Influence of manganese on apoptosis and glutathione content of cumulus cells during *in vitro* maturation in bovine oocytes. **Cell Biology International**, 38, 246-53, 2014.

- ARTHINGTON, J. D.; RANCHES, J. New concepts in trace mineral supplementation of grazing cattle: hydroxy sources, injectable sources and pasture application. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 37, 305–319, 2021.
- ARTHINGTON, J.D. New concepts in trace mineral supplementation of grazing cattle hydroxy sources, injectable sources and pasture application. In: 26th **Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**, Florida, February 2015, Department of Animal Sciences, pp 104-117, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Beef Report 2025**: Perfil da pecuária no Brasil. São Paulo: ABIEC, 2025.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **INDEX ASBIA 2025**: Relatório do mercado de inseminação artificial bovina no Brasil. São Paulo: ASBIA, 2025.
- BORCHELT DR, LEE MK, SLUNT HS, GUARNIERI M, XU ZS, WONG PC, BROWN RH JR, PRICE DL, SISODIA SS, CLEVELAND DW. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. **Proc Natl Acad Sci**, 91 8292–8296, 1994.
- Claro, I.Jr.; Sá Filho, O.G.; Peres, R.F.; Aono, F.H.; Day, M.L.; Vasconcelos, J.L. Reproductive performance of prepubertal Bos indicus heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, 74, 903-911, 2010.
- DAY, M.L.; NOGUEIRA, G.P. Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. **Animal Frontiers**, 3, 6-11, 2013.
- DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Managing the reproductive performance of beef cows. **Theriogenology**, 1, 379-87, 2016.
- ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S.; TEIXEIRA, L.A. Seleção para precocidade em novilhas de corte. In: Pires AV. **Bovinocultura de corte**. FEALQ; 2010.
- FERRAZ, M.V.; PIRES, A.V.; SANTOS, M.H.; SILVA, R.G.; OLIVEIRA, G.B.; POLIZEL, D.M.; BIEHL, M.V.; SARTORI, R.; NOGUEIRA, G.P. A combination of

- nutrition and genetics is able to reduce age at puberty in Nellore heifers to below 18 months. **Animal**, 12, 569-74, 2018.
- FERRAZ, M.V.C.; PIRES, A.V.; BIEHL, M.V.; SANTOS, M.H.; BARROSO, J.P.; GONÇALVES, J.R.; SARTORI, R.; DAY, M.L. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nellore cattle. **Theriogenology**, 86(8):1939-43, 2016.
- FERREIRA, E.M.; FERRAZ JR, M.V.C.; NEPOMUCENO, D.D.; BIEHL, M.V.; MENDES, C.Q.; PIRES, A.V. Efeito da produção de novilhas à pasto sobre a puberdade. In: Rosane Cláudia Rodrigues; Michelle de Oliveira Parante. (Org.). SIMPRUPASTO: o uso da ciência e de tecnologias para a mudança de paradigmas. Chapadinha: **Edufma**, 1:128-158, 2012.
- FORMIGONI, A.; FUSTINI, M.; ARCHETTI, L.; EMANUELE, S.; SNIFFEN, C.; BIAGI, G. Effects of an organic source of copper, manganese and zinc on dairy cattle productive performance, health status and fertility. **Animal Feed Science and Technology**, 164, 191-198, 2011.
- GABEL, A.; DIAZ, F. Zinc deficiency in bovine mural granulosa cells results in hippo pathway-mediated apoptosis†. **Biology Reproduction**, 16, 1404-1413. 2025.
- GENTHER, O. N., AND S. L. Hansen. The effect of trace mineral source and concentration on ruminal digestion and mineral solubility. **Journal of Dairy Science**, 98, 566–573, 2015.
- GUNSKI, R.J.; GARNERO, A.V.; BEZERRA, L.A.F.; CORRADO, M.P.; LÔBO, R.B. Idade ao primeiro parto, período de gestação e peso ao nascimento na raça Nelore. **Ciência Agronômica**, 32, 46-52, 2001.
- HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **J Nutr Biochem** 15, 572-578, 2004.
- HOSTETLER, C.E.; KINCAID, R.L.; MIRANDO, M.A. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. **Veterinary Journal**, 166, 125–39, 2003.

- IBRAHEEM, M.; KVIDERA, S. K.; FRY, R. S.; BRADFORD, B. J. Meta-analysis of the effects of sulfate versus hydroxy trace mineral source on nutrient digestibility in dairy and beef cattle. **Journal of Dairy Science**, 106, 2386–2394, 2023.
- IMWALLE, D.B.; PATTERSON, D.J.; SCHILLO, K.K. Effects of melengestrol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers. **Biology Reproduction**, 58,1432-6, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). SIDRA: Sistema IBGE de Recuperação Automática. Rio de Janeiro: IBGE, 2025.
- JEON, Y.; Yoon, J.D.; Cai, L.; Hwang, S.; Kim, E.; Zheng, Z.; Lee, E.; Kim, D.Y.; Hyun, S. Supplementation of zinc on oocyte in vitro maturation improves preimplantation embryonic development in pigs. **Theriogenology**, 82, 866–874, 2014.
- JEON, Y.; YOON, J.D.; CAI, L.; HWANG, S.U.; KIM, E.; LEE, E.; JEUNG, E.B.; HYUN, S.H.; HWANG, W.S. Zinc supplementation during *in vitro* maturation increases the production efficiency of cloned pigs. **Journal of Reproduction Development**, 62, 635–638, 2016.
- KAUFFOLD, J.; AMER, H.A.H.; BERGFELD, U.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **The Journal of Reproduction and Development**, 51,325–332, 2005.
- KAWAGUCHI, S.; SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. Induction of the expressions of antioxidante enzymes by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction Development** 59, 219–224, 2013.
- LANDRY, D.A.; BELLEFLEUR, A.M.; LABRECQUE, R.; GRAND, F.X.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Effect of cow age on the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, 86,1240-6, 2016.
- LANDRY, D.A.; ROSSI-PERAZZA, L.; LAFONTAINE, S.; SIRARD, M.A. Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. **Reproduction**. 156, 239-248, 2018.

- LEQUARRÉ, A.S.; FEUGANG, J.M.; MALHOMME, O.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; DESSY, F.; VAN LANGENDONCKT, A. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of *in vitro* culture. **Mol Reproduction Development**, 58, 45-53, 2001.
- LIMA, R.S.; MARTINS, T.; LEMES, K.M; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H. Effect of a puberty induction protocol based on injectable long acting progesterone on pregnancy success of beef heifers serviced by TAI. **Theriogenology**, 15, 154:128, 2020.
- LOU, Y.; YANG, T.; XIA, C.; YANG, S.; DENG, H.; ZHU, Y.; FANG, J.; ZUO, Z.; GUO, H. Efeitos do cobre na secreção de hormônios esteroides, expressão de enzimas esteroidogênicas e perfis transcriptômicos em células da granulosa ovariana de íaque. **Veterinary Sciencies**, 12, 428, 2025.
- McDowell L.R., Arthington J.D. **Minerals for Grazing Ruminants in Tropical Regions**. 4th ed. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences; Gainesville, FL, USA: 2005. pp. 1–86.
- MISZURA, A.A.; FERRAZ, M.V.C.; CARDOSO, R.C.; POLIZEL, D.M.; OLIVEIRA, G.B.; BARROSO, J.P.R.; GOBATO, L.G.M.; NOGUEIRA, G.P.; BIAVA, J.S.; FERREIRA, E.M.; PIRES, A.V. Implications of growth rates and compensatory growth on puberty attainment in Nellore heifers. **Domestic Animal Endocrinol**, 74, 106526, 2021.
- MORES, G.V.; DEWES, H.; TALAMINI, E.; VIEIRA-FILHO, J.E.R; CASAGRANDA, Y.G.; MALAFAIA, G.C.; COSTA, C.; SPANHOL-FINOCCHIO, C.P.; ZHANG, D. Um Estudo Longitudinal da Dinâmica da Produção de Alimentos Brasileira. **Agricultura**, 12, 1811. 2022.
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE (NASEM). Nutrient requirements of beef cattle. 8. ed. Washington, DC: National Academies Press, 2016.
- NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T.J.; OKUDA, K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biol Reproduction**, 78, 529–536, 2008.

- NODA, Y.; OTA, K.; SHIRASAWA, T.; SHIMIZU, T. Copper/zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. **Biology of Reproduction**, 86, 16, 1–8, 2012.
- NOGUEIRA, G.P. Puberty in south american bos indicus (Zebu) cattle. **Animal reproduction science**, 82:361-72, 2004.
- NÚÑEZ-DOMINGUEZ. R.; CUNDIFF, L.V.; DICKERSON, G.E.; GREGORY, .KE.; KOCH, R.M. Lifetime production of beef heifers calving first at two vs three years of age. **Journal Animal Science**, 69, 3467–3479.1991.
- PERRY, G. A. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. **Theriogenology**, 86, 373-378, 2016.
- PERRY, G.A. Physiology and Endocrinology Symposium: Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility in heifers. **Journal Animal Science**. 90, 1172-82, 2012.
- PICCO, S.J.; ANCHORDOQUY, J.M.; DE MATOS, D.G.; ANCHORDOQUY, J.P.; SEOANE, A.; MATTIOLI, G.A.; ERRECALDE, A.L.; FURNUS C.C. Effect of increasing zinc sulphate concentration during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, 74,1141–1148, 2010.
- RODRIGUES, A.D.P.; PERES, R.F.G.; LEMES, A.P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M.H.C.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Estratégias baseadas em progesterona para induzir a ovulação em novilhas Nelore pré-púberes. **Theriogenology**, 79, 135-41. 2013.
- SANTOS, M.H, FERRAZ, M.V.C, POLIZEL, D.M, BARROSO, J.P.R, MISZURA, A.A, MARTINS, A.S, BERTOLONI, A.V, OLIVEIRA, G.B, PIRES, A.V. Decreasing from 9 to 7 days the permanence of progesterone inserts make possible their use up to 5 folds in suckled Nelore cows. **Theriogenology**, 111, 56-61, 2018.
- SARTORI, R.; ALVES, R.L.O.R.; LOPES, A.L.M. Induction of puberty vs. induction of ovulation using steroid hormones in beef heifers: a comprehensive review. **Animal Reproduction**, 21, e20240072, 2024.

- SERENO, J.R.B.; PELLEGRIN, A.O.; LARA, M.A.C.; ABREU, U.G.P.; SERENO, F.T.P.S.; CHALITA, L.V.A.S. Estimativa da idade e peso a primeira monta de novilhas no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36, 1561-1565, 2001.
- SPEARS, J. W.; WEISS, W. P. Mineral and vitamin nutrition in ruminants. **The Professional Animal Scientist**, 30, 180–191, 2014.
- SPRINGMAN, S. A.; DREWNOSKI, M. E.; FUNSTON, R. N. Effects of hydroxy trace mineral supplementation on gain and reproductive performance in beef heifers. **Livestock Science**, 245, 104425, 2021.
- SUTTLE, N. F. **Mineral nutrition of livestock**. 5. ed. Wallingford: CAB International, 2021.
- TANEJA, SK.; KAUR, R. Pathology of ovary, uterus, vagina and gonadotrophs of female mice fed on Zn-deficient diet. **Indian J Exp Biol**, 28, 1058–1065, 1990.
- TERAKADO, A.P.N.; PEREIRA, M.C.; YOKOO, M.J.; ALBUQUERQUE, L.G. Evaluation of productivity of sexually precocious Nellore heifers. **Animal**, 9, 938–943, 2015.
- VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, L. F. C.; GIONBELLI, M. P.; ROTTA, P. P.; MARCONDES, M. I.; CHIZZOTTI, M. L.; PRADOS, L. F. **BR-CORTE: exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados** – 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2016.
- VANVALIN, K.R.; GENTHER-SCHROEDER, O.N.; CARMICHAEL, R.N.; BLANK, C.P.; DETERS, E.L.; HARTMAN, S.J.; NIEDERMAYER, E.K.; LAUDERT, S.B.; HANSEN, S.L. Influence of dietary zinc concentration and supplemental zinc source on nutrient digestibility, zinc absorption, and retention in sheep. **Journal of Animal Science**, 96, 5336-5344, 2018.
- VANVALIN, K.R.; GENTHER-SCHROEDER, O.N.; LAUDERT, S.B.; HANSEN, S.L. Relative bioavailability of organic and hydroxy copper sources in growing steers fed a high antagonist diet. **Journal of Animal Science**, 97, 1375-1383, 2019.

WANG, B.; LI, X.; ZHOU, Z.; ZHU, Y.; ZUO, Z.; GUO, H. The Role of Five Key Minerals (Cu, Se, Zn, Co, Fe) in Reproductive Function of Female Cattle: Current Insights and Future Directions. **Veterinary Sciences**, 23, 2026.

ZHANG, J.H.; YU, J.; LI, W.X.; CHENG, C.P. Evaluation of Mn²⁺ stimulated and Zn²⁺ inhibited apoptosis in rat corpus luteal cells by flow cytometry and fluorochromes staining. **Chin Journal Physiol**, 41, 121–126, 1998.

CAPÍTULO II – SUPPLEMENTATION WITH HYDROXY TRACE MINERALS
III: EFFECTS ON OOCYTE AND EMBRYO PRODUCTION AND
REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF DONOR AND RECIPIENT NELLORE
HEIFERS

Terezinha Teixeira de Souza¹; Marcelo Baggio³; Alexandre Vaz Pires³; Marcos Vinicius de Castro Ferraz²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia, Universidade Federal do Amazonas.

³Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of copper (Cu) and zinc (Zn) supplementation, in the form of hydroxy trace minerals, on oocyte and embryo production, mineral status, and reproductive performance of embryo donor heifers and recipient females were evaluated, as well as the influence of sexual precocity and physiological variables on pregnancy probability. The experiment was conducted in two phases. In Experiment I, 28 prepubertal Nellore heifers (184.45 ± 1.03 kg; 8 ± 1 months) were allocated in a 2×2 factorial design, testing nutritional supplementation (hydroxy trace minerals vs. sulfates) and reproductive status (hormonally induced vs. spontaneous puberty). Heifers underwent ovum pick-up for in vitro embryo production, and cumulus–oocyte complex and embryo quality were evaluated. In Experiment II, 100 recipient heifers (2021–2022) and 89 recipient heifers (2023–2024) were assigned to a $2 \times 2 \times 2$ factorial design, including donor precocity (hormonally induced vs. spontaneous puberty), donor nutrition (hydroxy trace minerals vs. sulfates), and recipient nutrition (hydroxy trace minerals vs. sulfates). Embryos were transferred by fixed-time embryo transfer, and pregnancy outcomes were assessed. Hydroxy trace mineral supplementation did not affect pregnancy rate or early and late gestational loss in either donors or recipients. Donor

precocity, however, significantly influenced fertility outcomes: embryos from late-pubertal heifers achieved higher pregnancy rates (44%) than those from early-pubertal heifers (23%) ($P = 0.01$). Serum copper concentrations decreased throughout the breeding season in all treatments ($P < 0.0001$). A positive association was found between serum zinc concentration and recipient body condition score ($P = 0.04$). These findings suggest that the benefits of supplementation with hydroxylated minerals may be more evident in scenarios of mineral deficiency or greater nutritional challenge.

Keywords: Embryo transfer, hydroxy trace minerals, Nelore heifers, precocity, puberty induction, reproductive performance

5. Introduction

Beef cattle production represents a major economic activity in the state of Amazonas, particularly in rural areas. The rapid expansion of this sector has raised environmental concerns, emphasizing the need for technologies that enhance productivity, reduce costs, and promote economic, social, and environmental sustainability (IBGE, 2024). Production intensification, including reducing the age at first calving, is critical to maximizing lifetime calf output per cow (Núñez-Dominguez et al., 1991).

Nelore cattle, the predominant beef breed in Brazil, are characterized by late sexual maturity, with heifers typically entering the productive herd at 2–3 years of age (Gunski et al., 2001; Sereno et al., 2001; Ferraz et al., 2018). Delayed puberty and first calving negatively affect the economic efficiency of beef cattle operations (Eler et al., 2002; Ferreira et al., 2012). Hormonal protocols for puberty induction allow heifers to be classified as early (<18 months) or super early (<15 months), without altering their genetic potential.

Field observations indicate high embryonic loss rates and low pregnancy rates in early-pregnant heifers. However, comprehensive studies evaluating embryonic losses during early and late gestation in these animals are lacking. Most existing research has monitored development only until puberty onset or pregnancy confirmation at 30 days. Consequently, it remains unclear whether low pregnancy rates are a consequence of early puberty induction or other, yet uninvestigated, factors. Furthermore, prepubertal heifers have been shown to produce embryos of lower quality during *in vitro* embryo

production (Kauffold et al., 2005; Landry et al., 2016, 2018) Whether hormonally induced early-pubertal heifers generate embryos of lower quality compared to spontaneously pubertal Nelore heifers and whether this contributes to reduced pregnancy rates remains unknown.

Trace minerals, including copper (Cu) and zinc (Zn), play a key role in fertility. Adequate mineral availability during embryonic development enhances growth and viability, underscoring their essential role in embryonic metabolism (Formigoni et al., 2011; Hostetler et al., 2003). Studies suggest that zinc supplementation during *in vitro* fertilization reduces DNA damage and apoptosis in cumulus cells, acting as an antioxidant (Picco et al., 2010; Jeon et al., 2014; Lu et al., 2018). Additionally, Zn and Mn enhance superoxide dismutase (SOD) activity in cumulus cells, providing antioxidant protection to embryos (Anchordoquy et al., 2013, 2014). Despite these findings, there is limited information regarding the effects of trace mineral supplementation on embryonic mortality, embryo production, and embryo quality in Nelore heifers.

Recent studies indicate that hydroxy trace minerals may improve Cu and Zn bioavailability in ruminants, increasing plasma and liver concentrations, and enhancing nutrient digestibility compared to organic forms (VanValin et al., 2018, 2019). However, studies evaluating the use of hydroxy trace minerals in beef cattle remain scarce. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of copper (Cu) and zinc (Zn) supplementation, in the form of hydroxy trace minerals, on oocyte and embryo production, mineral status, and reproductive performance of embryo donor heifers and recipient females were evaluated, as well as the influence of sexual precocity and physiological variables on pregnancy probability.

6. Materials and methods

This study was divided into two experiments. Experiment I was conducted at the Experimental Cattle Feedlot Facility of the Laboratory of Animal Nutrition and Reproduction (LNRA), Department of Animal Science, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture (ESALQ) – University of São Paulo (USP), in Piracicaba. Experiment II was carried out on a commercial farm located in the rural area of Parintins, Amazonas, Brazil.

All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo (protocol no. 7595290414).

6.1 Experiment I: Embryo production

Animals, treatments, and supplementation management

A total of twenty-eight Nellore heifers (average body weight 184.45 kg, 8 ± 1 months of age) were used.) were used. Heifers were assigned to a randomized block design with a 2×2 factorial arrangement: one nutritional factor and one reproductive factor. The nutritional factor involved the supplementation of Cu and Zn either in the form of hydroxy trace minerals (**Hydroxy**) or conventional mineral supplementation using sulfates (**Control**) in the diet of prepubertal heifers. The reproductive factor consisted of heifers either **induced to puberty** through a hormonal protocol or those that reached **puberty spontaneously**.

Heifers were fed once daily in the morning using a total mixed ration (TMR) mixer wagon (Delaval®, Münchrütistrasse, Switzerland) equipped with an electronic scale (precision of 1 kg). The diet consisted of grass silage and a protein-energy supplement containing either hydroxy Cu and Zn (Cu = 40 mg/kg and Zn = 148 mg/kg, per kg of supplement) or conventional mineral sources (CuSO₄ = 40 mg/kg and ZnO = 148 mg/kg, per kg of supplement) at 5 g/kg of body weight, following manufacturer recommendations (BellPeso SV – Trouw Nutrition, Amersfoort, Netherlands). Heifers had ad libitum access to water. Feed was offered daily based on feed bunk readings, adjusting for orts from the previous day.

Heifers were weighed after a 14 h feed withdrawal at the beginning and end of the experiment, and every 28 days without fasting to monitor performance.

Reproductive management

At 15 months of age, heifers were classified as pubertal or non-pubertal. Those with a corpus luteum (CL) detected in two ultrasound examinations (7-day interval) were considered spontaneously pubertal. Heifers without CL at 15 months underwent a hormonal induction protocol and were considered induced-pubertal.

The protocol involved an intravaginal implant with low progesterone concentration (0.5 mg). Upon implant removal, 0.6 mg estradiol cypionate (EC) was administered. Heifers showing a CL on ultrasound 7 or 14 days after protocol completion were classified as induced-pubertal.

Fourteen days after the induction protocol, both spontaneous and induced pubertal heifers were synchronized using a new protocol: day 0 – P4 implant (0.5 mg) + 2.0 mg estradiol benzoate (EB, IM); day 7 – implant removal, followed by ovum pick-up (OPU).

Collected oocytes were used for cumulus-oocyte complex (COC) maturation, in vitro fertilization (IVF), and embryo culture, according to Sujus et al. (2014). Semen from a single bull with proven high in vitro fertility was used.

Repeated OPU sessions were performed every 7 days until 75 embryos per treatment were obtained. Embryos were cryopreserved in liquid nitrogen.

For embryo production, the number of COCs recovered, viable, atretic or degenerated, cleavage rate, and blastocyst rate were recorded.

6.2 Experiment II: Embryo transfer

Animals, treatments, and supplementation management

A total of 100 pubertal recipients (average body weight $\approx$ 350.10 kg) were used. Recipients originated from a commercial farm in the rural area of Parintins, Amazonas, Brazil, and were maintained under pasture conditions throughout the experimental period.

The experimental design was a randomized block, with recipients blocked and allocated to treatments according to age and body weight. Treatments followed a $2 \times 2 \times 2$ factorial arrangement, consisting of one reproductive factor and two nutritional factors: Reproductive factor: early or late donor heifers. Nutritional factor 1: involved the supplementation of Cu and Zn either in the form of hydroxy trace minerals (**Hydroxy**) or conventional mineral supplementation using sulfates (**Control**) in the diet of prepubertal heifers (Early and late Nellore heifers from experiment I). Nutritional factor 2: involved the supplementation of Cu and Zn either in the form of hydroxy trace minerals (**Hydroxy**) or conventional mineral supplementation using sulfates (**Control**) in the diet of recipients.

At the beginning of the experiment, recipients were weighed and assessed to obtain their initial weight and body condition score (BCS). They were subsequently identified with differently colored ear tags according to the treatments. Recipients were also weighed at the end of each breeding season. BCS was assessed at 127 days of mating in the breeding season and at the end of the experiment. The study lasted approximately 270 days.

Recipients were kept in four paddocks fenced with electric wire for control and handling. Paddocks consisted of native floodplain forage species from the Amazon region (Tables 1 and 2). Natural water sources (rivers) provided ad libitum access to drinking water. Supplements were provided in plastic troughs ad libitum. An initial offer of 15 kg

was provided per paddock, with bunk reading performed after 24 h considering 10% orts. New supplement amounts were adjusted accordingly. Supplement was weighed using a hanging hook scale and dispensed in plastic containers.

Table 1 Average agronomic and nutritional characteristics of pasture during the experimental period.

Item	Pature	
	Entry	Exit
Heigth (cm)	52.26	23.08
Kg DM/ha	1,818.97	381.61
Composition (% DM)		
Dry matter	30.91	13.68
Mineral matter	14.20	17.58
Crude protein	13.00	18.14
Neutral detergent fiber	61.70	56.70
Acid detergent fiber	32.40	42.40
Total digestible nutrients	56.80	48.40

Table 2 Average mineral contents in pasture during the experimental period.

Itens (% / DM)	Pasture	
	Entry	Exit
Calcium	0.50	0.65
Phosphorus	0.29	0.39
Potassium	2.12	2.51
Magnesium	0.23	0.37
Sulfur	0.33	0.35
Chlorine	0.46	0.71

Reproductive Management

Recipients were synchronized using a Fixed-Time Embryo Transfer (FTET) protocol. On day 0, was of the insertion of a low-dose intravaginal progesterone implant (0.5 mg) and 2.0 mg of Estradiol Benzoate (BE). Seven days after protocol initiation, the P4 implant was removed, and 0.5 mg of Cipionate Estradiol (CE), 0.5 mg of Cloprostenol (PGF2 α analog), and 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) were administered IM. Embryos were transferred 14 days after P4 device removal.

CL presence and diameter were considered at the time of embryo transfer. Recipients underwent ultrasonography (US) 13 days after embryo reception to assess CL diameter and blood perfusion using Power-Doppler US. Recipients with CL showing >25% colored area and >2 cm² were considered pregnant at 20 days (P20). Follow-up US was performed at 30 and 60 days post-ovulation to detect the embryo (P30) and fetus (P60), respectively. Birth rate was also determined. Early gestational loss (P30 – P60) and late gestational loss (P60 – Parturition) were calculated for each treatment. Non-pregnant recipients at P60 were re-synchronized for embryo transfer until all embryos were implanted.

Blood Analysis of Copper and Zinc

Blood collection was performed at the beginning and middle of the breeding season. Blood was collected from the coccygeal vein, located at the base of the animals' tail, into tubes containing K2EDTA. Plasma samples were prepared for trace element analysis to determine the amount of Cu and Zn, using atomic absorption spectrometry, as described by (Pogge; Hansen, 2013).

6.3 Statistical analysis

Heifers were used as the experimental unit for the analysis of P20, P30, P60, early and late embryonic loss, as well as embryo production variables.

Statistical analyses were conducted using the MIXED and GLIMMIX procedures of SAS 9.3. Effects were considered significant when $P \leq 0.05$ and a tendency when $0.05 \leq P \leq 0.10$. All data were tested for residual normality using the Shapiro-Wilk test, variance homogeneity using the Levene test, and outliers were removed based on studentized residuals.

All variables were analyzed using the GLIMMIX procedure, and the Satterthwaite approximation was used to determine the denominator degrees of freedom for fixed effect tests. Means were compared using the LSMEANS command.

7 Results

7.1 Experiment I: Embryo Production

There was a significant Treatment $\times$ Puberty interaction in the production of grade 2 oocytes ($P < 0.01$), grade 3 oocytes ($P < 0.01$), viable oocytes ($P < 0.01$), and total embryos produced per animal ($P < 0.01$), as shown in Table 3.

Table 3 Average oocyte and embryo production of Nellore heifers.

Item	Treataments					SEM ¹	P-value ²	
	Control		Hydroxy ³		Puberty		Treataments	P*T
	Early	Late	Early	Late				
Oocytes G1	0.53	0.42	0.35	0.20	0.06	0.18	0.06	0.59
Oocytes G2	1.43b	1.38bc	0.92c	2.10a	0.19	0.01	0.96	<0.01
Oocytes G3	13.21b	12.17b	9.94c	19.83a	1.15	<0.01	0.03	<0.01
Viable Oocytes	15.17b	13.96b	11.22c	22.13a	1.26	<.0.01	0.07	<0.01
Total Embryos	4.87b	3.75c	3.25c	6.03a	0.38	0.03	0.66	<.0.01

¹SEM = Standard error of the mean.

²Value - P = Effect of puberty, treatment and Puberty*Treatment interaction

³HTM = Hydroxy trace minerals

^{a,b,c}In the row, means without common superscripts are different by Tukey's test (P < 0.05)

7.2 Experiment II: Embryo Transfer

Supplementation with hydroxy trace minerals did not affect the performance of recipient females during the 2021–2022 breeding season (Table 4).

Table 4 Performance of embryo recipient females receiving mineral supplements.

Item ³	Treatments		SD ²	P-value
	Control	Hydroxy ¹		
Initial weight	290.25	288.95	7.69	0.90
Initial BCS	2.45	2.66	0.13	0.25
BCS 127d	3.25	3.20	0.08	0.69
Final BCS	2.57	2.69	0.09	0.39

¹Hydroxy = Hydroxy trace minerals

²SD = Standard Deviation

³BCS = Body condition score

After analyzing the average daily mineral intake of the recipient females, no effect of Zn and Cu supplementation in the form of hydroxy trace minerals was observed. Both the control group and the group receiving hydroxy trace minerals showed an average mineral intake of 56 g/day and 52 g/day, respectively.

Supplementation with hydroxy trace minerals or conventional minerals did not influence pregnancy rate, early or late embryonic loss, follicle diameter, or the serum concentrations of zinc and copper in embryo donor and recipient cows (Tables 5 and 6). However, out of 200 synchronization procedures performed, only 135 had corpora lutea (CL) larger than 11 mm in diameter, resulting in a transfer rate of 67% (135/200).

Table 5 Effect of mineral supplementation on reproductive performance and serum Cu and Zn concentrations of embryo recipient females.

Item ¹	Treatments		SEM ²	P-value
	Control	Hydroxy ³		
Pregnancy, %	32 (22/69)	33 (22/66)	-	0.66
Early embryonic loss, %	9 (2/22)	9 (2/22)	-	0.96
Late embryonic loss, %	15 (3/20)	15 (3/20)	-	0.96
Corpus luteum diameter, mm	14.10	14.70	0.40	0.54
Serum Zn concentration, µg/dL	107.50	98.30	15.03	0.63
Serum Cu concentration, µg/dL	41.91	39.17	12.60	0.56

¹Pregnancy: Percentage of pregnancy at 60 days after TETF; Corpus luteum diameter: Corpus luteum diameter in millimeters; Serum Zn concentration: Average serum zinc concentration in micrograms per deciliter; Serum Cu concentration: Average serum copper concentration in micrograms per deciliter.

²SEM = Standard error of the mean.

³Hydroxy = Hydroxy trace minerals

Table 6 Effect of mineral supplementation on reproductive performance and serum Cu and Zn concentrations of donor nellore heifers.

Item ¹	Treatments		SEM ²	P-value
	Control	Hydroxy ³		
Pregnancy, %	30 (21/70)	35 (23/65)	-	0.95
Early embryonic loss, %	4 (1/23)	13 (3/23)	-	0.95
Late embryonic loss, %	18 (4/22)	14 (3/21)	-	0.97
Corpus luteum diameter, mm	14.50	14.30	0.40	0.72
Serum Zn concentration, µg/dL	112.10	93.70	13.80	0.33
Serum Cu concentration, µg/dL	38.11	42.97	13.50	0.30

¹Pregnancy: Percentage of pregnancy at 60 days after TETF; Corpus luteum diameter: Corpus luteum diameter in millimeters; Serum Zn concentration: Average serum zinc concentration in micrograms per deciliter; Serum Cu concentration: Average serum copper concentration in micrograms per deciliter.

²SEM = Standard error of the mean.

³Hydroxy = Hydroxy trace minerals

The sexual precocity of nelore donor heifers affected the pregnancy rate of the embryos. Embryos from late-maturing heifers had a higher pregnancy rate (44%) compared to embryos from early-maturing heifers (23%) (P = 0.01). No effect of sexual precocity was observed on early or late embryonic loss, follicle diameter, or serum zinc concentrations (Table 7).

Table 7 Effect of precocity of donor nellore heifers on reproductive performance and serum concentration of Cu and Zn.

Item ¹	Treatments		SEM ²	P-value
	Early	Late		
Donor age, days	457.49	452.42	6.40	0.57
Pregnancy, %	23 (16/69)	44 (29/66)		0.01
Early embryonic loss, %	12 (2/16)	7 (2/29)		0.96
Late embryonic loss, %	14 (2/16)	11 (3/27)		0.96
Corpus luteum diameter, mm	14.7	14.10	0.40	0.15
Serum Zn concentration, µg/dL	113.3	92.50	14.40	0.28
Serum Cu concentration, µg/dL	39.00	42.07	13.70	0.52

¹Pregnancy: Percentage of pregnancy at 60 days after TETF; Corpus luteum diameter: Corpus luteum diameter in millimeters; Serum Zn concentration: Average serum zinc concentration in micrograms per deciliter; Serum Cu concentration: Average serum copper concentration in micrograms per deciliter.

²SEM = Standard error of the mean.

Serum zinc concentrations (Figure 1) were not affected by treatment (Control vs. Hydroxy trace minerals) ($P = 0.7239$), by time ($P = 0.735$), or by the interaction between treatment and time ($P = 0.5524$). No effect of treatment or interaction between treatment and time was observed for serum copper concentrations ($P = 0.3628$). However, serum copper levels were significantly affected by time ($P < 0.0001$). When the heifers were moved to floodplain pasture, Cu concentrations decreased compared to the beginning of the breeding season, when they were grazing on upland *Brachiaria humidicola* pasture. Additionally, serum copper concentrations declined over the course of the breeding season in both treatments (Figure 2).

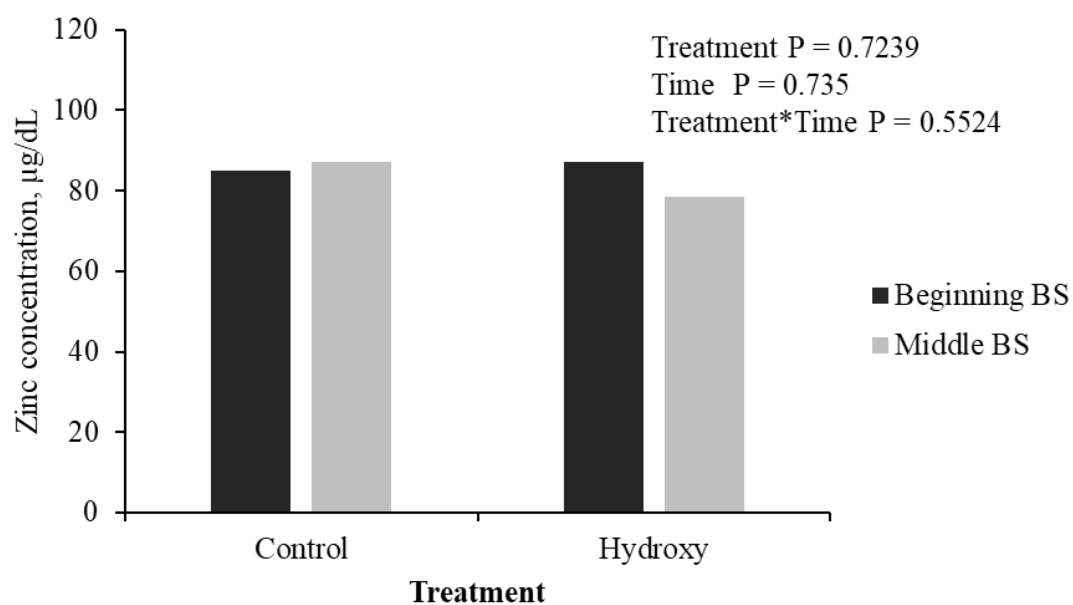


Figure 1 Serum zinc concentration in female bovine embryo recipients according to treatments at the beginning and middle of the breeding season.

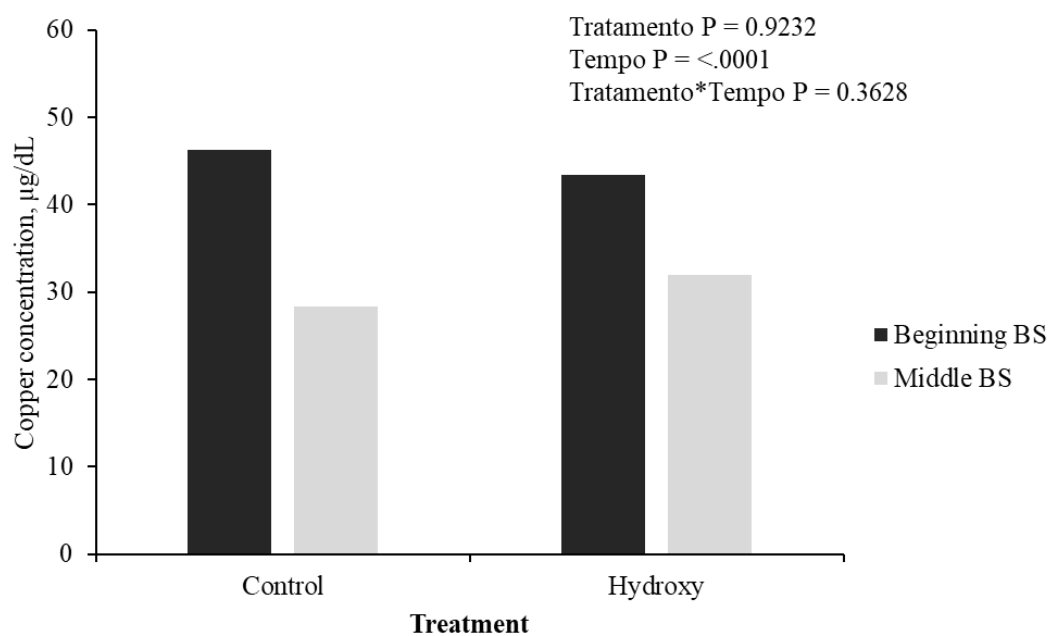


Figure 2 Serum copper concentration in female bovine embryo recipients according to treatments at the beginning and middle of the breeding season.

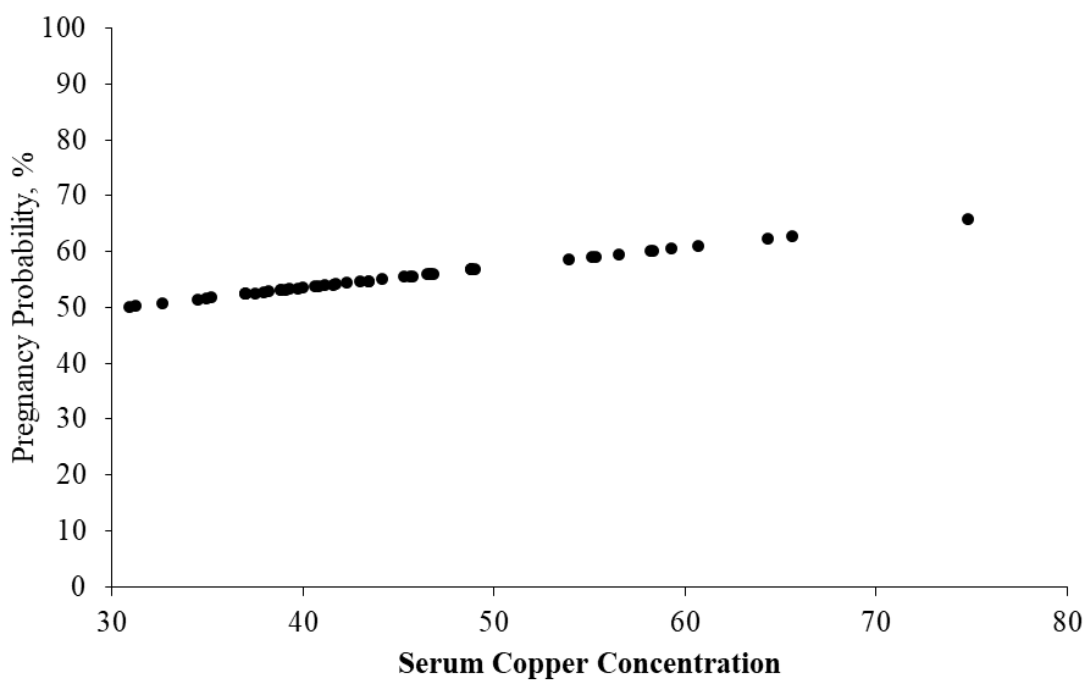


Figure 3 Relationship between pregnancy probability and serum copper concentration in bovine female embryo recipients. Pregnancy probability = $\exp(-0.4546 + 0.0149 \cdot \text{Cu}) / 1 + \exp(-0.4546 + 0.0149 \cdot \text{Cu})$ $P = 0.26$.

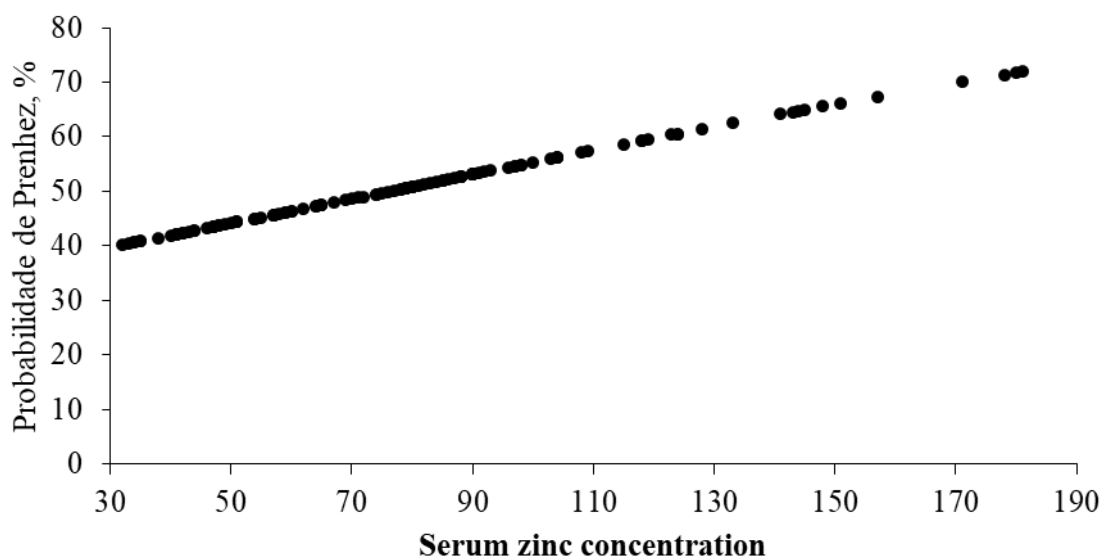


Figure 4 Relationship between pregnancy probability and serum zinc concentration in bovine female embryo recipients. Pregnancy probability = $\exp(-0.6867 + 0.009 \cdot \text{Zn}) / 1 + \exp(-0.6867 + 0.009 \cdot \text{Zn})$ $P = 0.10$.

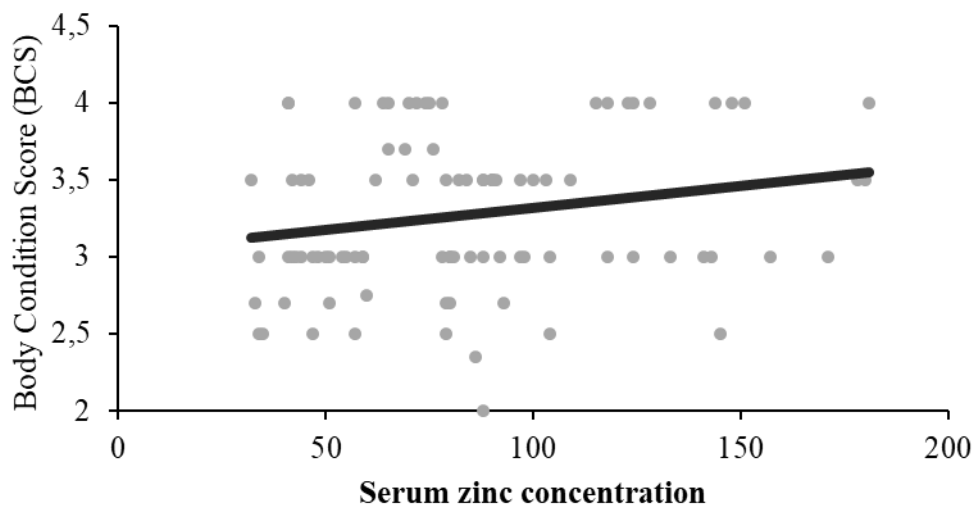


Figure 5 Relationship between serum Zn concentration and body condition score of female bovine embryo recipients. Body condition score = exp ($y = 0,0029x + 3,0273$) $P = 0.04$.

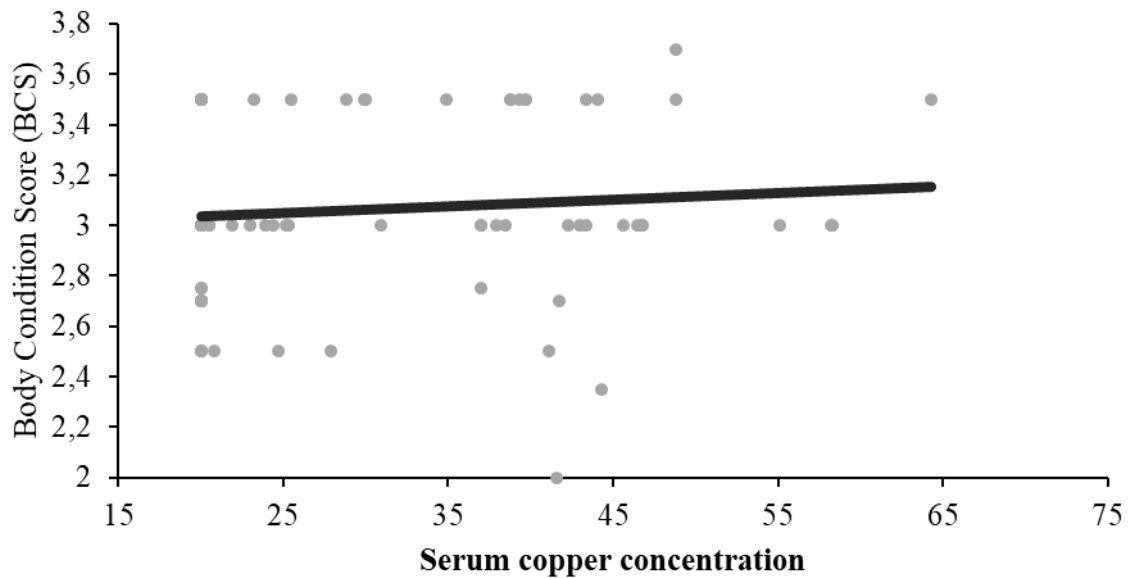


Figure 6 Relationship between serum Cu concentration and body condition score of female bovine embryo recipients. Body condition score = exp ($y = 0,0026x + 2,984$) $P = 0.44$.

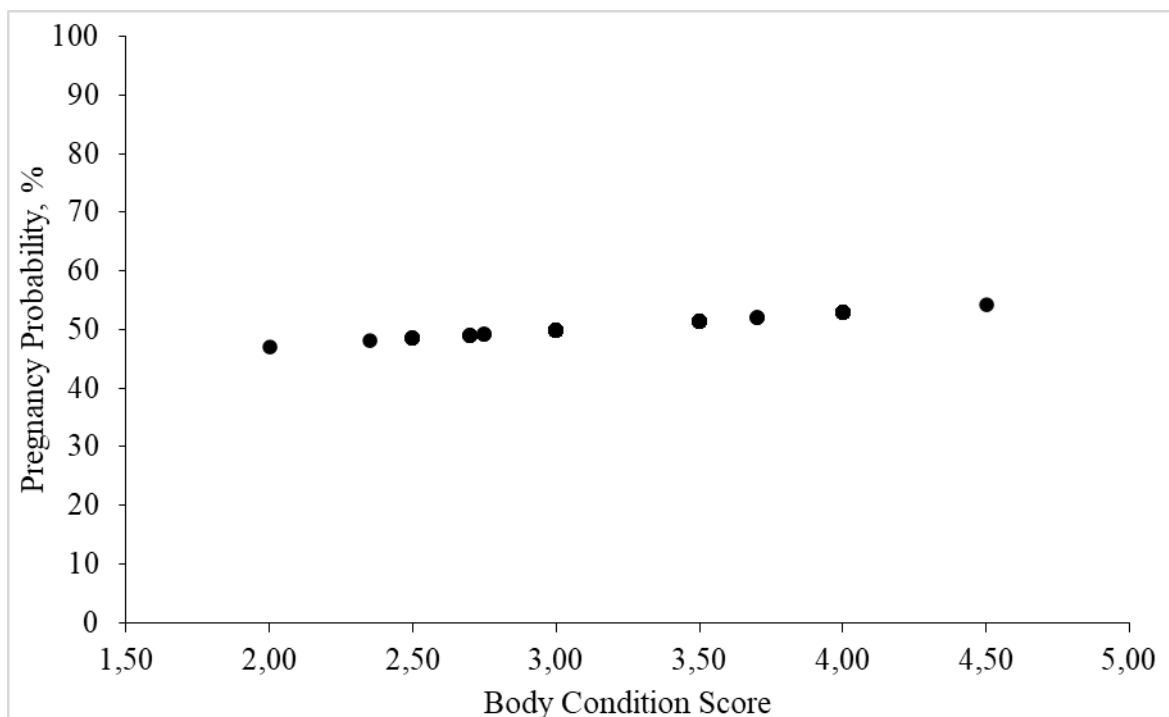


Figure 7 Relationship between pregnancy probability and body condition score of bovine females receiving embryos. Pregnancy probability = $\exp(-0.348 + 0.1157 \cdot \text{BCS}) / 1 + \exp(-0.348 + 0.1157 \cdot \text{BCS})$ $P = 0.60$.

No relationship was observed between serum Cu concentration and the probability of pregnancy in the recipients (Figure 3), nor between serum Cu concentration and BSC (Figure 6).

However, there was a tendency ($P = 0.10$) for higher serum Zn concentrations to increase the probability of pregnancy in the recipients, regardless of treatment (Figure 4).

Additionally, higher BCS were observed as serum Zn levels increased (Figure 5). The probability of pregnancy was not influenced by BCS ($P = 0.60$) (Figure 7).

8 Discussion

8.1 Experiment I – Embryo Production

The results show a significant interaction between nutritional treatment and puberty in oocyte production and the total number of embryos produced per animal. This finding suggests that both pubertal status and the form of mineral supplementation can influence the efficiency of in vitro embryo production in Nellore heifers. Previous studies have already demonstrated that the quality of the cumulus–oocyte complex (COC) is influenced by the animal's sexual maturity, with prepubertal heifers generally producing

COCs of lower quality and quantity (KAUFFOLD et al., 2005; Landry et al., 2016, 2018). In the present study, supplementation with hydroxy trace minerals was not sufficient to completely overcome the limitations associated with induced puberty, reinforcing that sexual maturity is a determining factor in embryo production.

8.2 Experiment II: Embryo Transfer

The supplementation with hydroxy trace minerals had no significant effect on the reproductive performance of recipient heifers, nor on pregnancy rate, early or late embryonic loss, follicular diameter, or serum concentrations of Cu and Zn. These results are consistent with the findings of (VanValin et al., 2018), who suggested that although hydroxy trace minerals may increase the bioavailability of microminerals, their effect on reproductive performance may be limited when baseline nutritional conditions already meet the animals' mineral requirements.

Donor heifer precocity had a significant effect on embryo pregnancy rates: late-maturing heifers produced embryos with higher pregnancy rates (44%) compared with early-maturing ones (23%). This indicates that hormonal induction of puberty may result in embryos with reduced developmental competence, possibly due to physiological or metabolic factors not yet fully understood, such as incomplete oocyte maturation or epigenetic alterations in embryos (Formigoni et al., 2011). However, precocity did not affect other variables, such as embryonic loss or follicular diameter, suggesting that the main effects are related to embryo quality rather than donor follicular physiology.

Regarding serum mineral concentrations, the results showed that Zn and Cu levels varied throughout the breeding season, with a significant drop in Cu when the heifers were moved to floodplain pastures. This highlights the importance of continuous mineral monitoring in grazing systems, as environmental variations can impact the availability of these essential micronutrients (Hostetler et al., 2003). In addition, there was a trend toward a positive association between serum Zn levels and pregnancy probability, as well as with the BCS of recipients, reinforcing the critical role of Zn in reproduction and energy metabolism in females (Anchordoquy et al., 2014; Jeon et al., 2014).

9 Conclusion

Supplementation with microminerals in the form of hydroxy trace minerals increased serum Zn concentration in Nellore heifers but had no significant effect on

pregnancy rate, embryonic losses, follicular diameter, or progesterone levels in embryo donor and recipient females. Donor precocity was the main factor influencing pregnancy rates, with embryos from late-maturing heifers showing higher pregnancy rates than those from so-called early-maturing heifers, indicating that sexual maturity is a determining factor for embryonic development.

The findings also highlight the positive relationship between serum Zn levels and recipient body condition score, suggesting that Zn plays a modulatory role in fertility, although it is not the decisive factor for reproductive performance. While the results of this study reveal some positive effects of hydroxy trace mineral supplementation, these effects were limited.

Therefore, in embryo transfer programs for Nelore heifers, selection for sexual maturity and proper puberty management appear to be more effective strategies for optimizing reproductive productivity than mineral supplementation alone in the form of hydroxy trace minerals.

10 References

ANCHORDOQUY, JP *et al.* Effect of Different Manganese Concentrations during *in vitro* Maturation of Bovine Oocytes on <sc>DNA</sc> Integrity of Cumulus Cells and Subsequent Embryo Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 905–911, 23 dez. 2013.

ANCHORDOQUY, Juan Patricio *et al.* Influence of manganese on apoptosis and glutathione content of cumulus cells during *in vitro* maturation in bovine oocytes. **Cell Biology International**, v. 38, n. 2, p. 246–253, 14 fev. 2014.

ELER, J. P. *et al.* Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers1. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 951–954, 1 abr. 2002.

FERRAZ, M. V. C. *et al.* A combination of nutrition and genetics is able to reduce age at puberty in Nelore heifers to below 18 months. **Animal**, v. 12, n. 3, p. 569–574, 2018.

FERREIRA, EM *et al.* **SIMPRUPASTO: o uso da ciência e de tecnologias para a mudança de paradigmas**. EDFMA ed. Maranhão: [S.n.]. v. 1

FORMIGONI, Andrea *et al.* Effects of an organic source of copper, manganese and zinc on dairy cattle productive performance, health status and fertility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 164, n. 3–4, p. 191–198, mar. 2011.

GUNSKI, Ricardo José *et al.* Idade ao primeiro parto, período de gestação e peso ao nascimento na raça nelore. **Ciência Agrônômica**, v. 32, p. 46–52, 2001.

JEON, Yubyeol *et al.* Supplementation of zinc on oocyte in vitro maturation improves preimplantation embryonic development in pigs. **Theriogenology**, v. 82, n. 6, p. 866–874, out. 2014.

KAUFFOLD, Johannes *et al.* **Original-The In Vitro Developmental Competence of Oocytes from Juvenile Calves is Related to Follicular Diameter** **Journal of Reproduction and Development**. [S.l.: S.n.].

KAUFFOLD, Johannes *et al.* The Developmental Competence of Oocytes from Juvenile Calves is Related to Follicular Diameter. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 325–332, 2005.

LANDRY, David A. *et al.* Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1240–1246, 15 set. 2016.

LANDRY, David A. *et al.* Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. **Reproduction**, v. 156, n. 3, p. 239–248, set. 2018.

NÚÑEZ-DOMINGUEZ, R. *et al.* Lifetime production of beef heifers calving first at two vs three years of age. **Journal of animal science**, v. 69, n. 9, p. 3467–3479, 1991.

POGGE, D. J.; HANSEN, S. L. Supplemental vitamin C improves marbling in feedlot cattle consuming high sulfur diets. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 9, p. 4303–4314, 1 set. 2013.

SERENO, José Robson Bezerra *et al.* Estimativa de la edad y peso a la primera monta de novillas en el Pantanal brasileño. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1561–1565, dez. 2001.

VANVALIN, Katherine R. *et al.* Influence of dietary zinc concentration and supplemental zinc source on nutrient digestibility, zinc absorption, and retention in sheep. **Journal of animal science**, v. 96, n. 12, p. 5336–5344, 3 dez. 2018.

VANVALIN, Katherine R. *et al.* Relative bioavailability of organic and hydroxy copper sources in growing steers fed a high antagonist diet1. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 3, p. 1375–1383, 1 mar. 2019.

CAPÍTULO III – EFFECT OF HYDROXYMINERAL SUPPLEMENTATION ON THE REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF EMBRYO DONOR AND RECIPIENT HEIFERS

Os resultados deste capítulo foram aceitos para publicação na forma de artigo científico sob o seguinte referencial:

SOUZA, T.T.; ALEXANDRINO, B.S.; CUNHA, A.R.; BELTRÃO, N.P.F.; SOUZA, J.A.S.; FERRAZ JUNIOR, M.V.C. Effect of hydroxy trace minerals supplementation on the reproductive efficiency of embryo donor and recipient heifers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – ABMVZ – 2025-13779. R1.**

Abstract

This study evaluated the effects of copper (Cu) and zinc (Zn) supplementation, in the form of hydroxy trace minerals, on productive performance, mineral status, reproductive characteristics, and pregnancy rate in female cattle, as well as to investigate the relationships between these variables through multivariate analyses and logistic regression models. The experiment was conducted in two phases: embryo production using prepubertal Nellore heifers and embryo transfer using crossbred recipient heifers. Animals received either conventional sulfate-based minerals (Control) or hydroxy trace minerals (Hydroxy). Productive traits, serum mineral status, reproductive parameters, and pregnancy outcomes were measured. Hydroxy supplementation increased serum Zn concentration ($P = 0.0183$) and reduced plasma Cu concentration ($P = 0.0132$), indicating altered mineral metabolism; however, no improvements were observed in body weight, body condition score, average daily gain, or reproductive variables such as follicle diameter, corpus luteum size, progesterone concentration, or estrus expression ($P > 0.05$). Pregnancy rate tended to be higher in the Hydroxy group (33% vs. 18%) but was not statistically significant ($P = 0.2313$). Logistic regression and PCA analyses confirmed the absence of associations between mineral concentrations, productive traits, and pregnancy probability. Under adequate nutritional and management conditions, hydroxy trace minerals did not enhance reproductive efficiency. These findings suggest that the benefits of hydroxy mineral supplementation may be more evident in scenarios of mineral deficiency or greater nutritional challenge.

Keywords: Hydroxy trace minerals; Nelore heifers; Precocity; Reproductive performance.

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos da suplementação de cobre (Cu) e zinco (Zn), na forma de hidroximinerais, sobre o desempenho produtivo, o status mineral, as características reprodutivas e a taxa de prenhez de fêmeas bovinas, bem como investigar as relações entre essas variáveis por meio de análises multivariadas e modelos de regressão logística. O experimento foi conduzido em duas fases: produção de embriões utilizando novilhas Nelore pré-púberes e transferência de embriões em novilhas receptoras. Os animais receberam suplementação mineral convencional à base de sulfatos (Controle) ou minerais traço hidroxilados (Hidroxi). Foram avaliados parâmetros produtivos, status sérico mineral, características reprodutivas e taxa de prenhez. A suplementação Hidroxi aumentou a concentração sérica de Zn ($P = 0.0183$) e reduziu a concentração plasmática de Cu ($P = 0.0132$), indicando alterações no metabolismo mineral; no entanto, não foram observadas melhorias no peso corporal, escore de condição corporal, ganho médio diário ou variáveis reprodutivas, como diâmetro folicular, tamanho do corpo lúteo, concentração de progesterona ou expressão de estro ($P > 0.05$). A taxa de prenhez apresentou tendência de ser maior no grupo Hidroxi (33% vs. 18%), porém sem significância estatística ($P = 0.2313$). As análises de regressão logística e PCA confirmaram a ausência de associações entre concentrações minerais, parâmetros produtivos e probabilidade de prenhez. Em condições adequadas de manejo e nutrição, os minerais traço hidroxilados não aumentaram a eficiência reprodutiva. Os resultados sugerem que os benefícios dessa forma de suplementação podem ser mais evidentes em cenários de deficiência mineral ou maior desafio nutricional.

Palavras-chave: Minerais traço hidroxilados; Novilhas Nelore; Precocidade; Desempenho reprodutivo.

11 Introduction

Beef cattle production is one of the most important economic activities in the state of Amazonas, especially in rural areas. The rapid expansion of this activity has raised environmental concerns, increasing the demand for technologies capable of enhancing productivity, reducing costs, and ensuring economic, social, and environmental

sustainability (IBGE, 2024). In this context, nutritional strategies that can improve reproductive performance become essential for advancing herd efficiency.

The intensification of production, including reducing the age at first calving, is crucial for increasing the lifetime weaning rate per cow (Núñez-Dominguez et al., 1991). However, Nellore cattle is the predominant beef cattle breed in Brazil and presents challenges related to late sexual maturity, with heifers entering the reproductive phase between 24 and 36 months, negatively affecting economic returns (Gunski et al., 2001; Sereno et al., 2001; Eler et al., 2002; Ferreira et al., 2012;; Ferraz et al., 2018) Hormonal protocols can induce earlier puberty, but their application does not eliminate challenges such as possible pregnancy losses and variations in embryonic development, and scientific data on these aspects remain limited (Kauffold et al., 2005; Landry et al., 2016, 2018).

In this context, mineral nutrition has gained relevance as a complementary strategy to optimize fertility. Trace minerals such as copper (Cu), zinc (Zn), and manganese (Mn) have been associated with embryonic development and the maintenance of pregnancy, influencing essential metabolic processes (Formigoni et al., 2011; Hostetler et al., 2003). Recent advances indicate that trace minerals in the form of hydroxy trace minerals exhibit greater stability and bioavailability, increasing plasma and hepatic concentrations of Cu and Zn in ruminants (VanValin et al., 2018, 2019).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of copper (Cu) and zinc (Zn) supplementation, in the form of hydroxy trace minerals, on productive performance, mineral status, reproductive characteristics, and pregnancy rate in female cattle, as well as to investigate the relationships between these variables through multivariate analyses and logistic regression models.

12 Materials and methods

This study was conducted in two experiments: Experiments I – Embryo Production and experiments II – Embryo Transfer. All procedures involving animals were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo (protocol no. 7595290414).

A total of twenty-eight Nellore heifers (average body weight ≈ 184.45 kg, 8 ± 1 months of age) were used. The animals were housed at the experimental feedlot facilities of the Animal Nutrition and Reproduction Laboratory (LNRA), Department of Animal

Science, Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, Brazil.

The experimental design was completely randomized blocks, in which heifers were blocked by sire (sires listed in Nellore genetic selection catalogs) and distributed among treatments according to body weight and age. The animals were kept in collective pens, and each pen received only one treatment throughout the experimental period. Heifers were previously adapted to the high-concentrate diet and facilities before treatments began; however, this adaptation period was not included in the experimental timeline. The study lasted approximately 270 days.

Treatments were arranged in a 2×2 factorial design, consisting of a nutritional factor and a reproductive factor. The nutritional factor involved either conventional mineral supplementation (**Control**), based on sulfates, or supplementation with Cu and Zn provided as hydroxy trace minerals (**Hydroxy**) in the diet of prepubertal heifers. The reproductive factor included heifers induced to puberty by hormonal protocol (**Non-precocious**) or heifers that reached puberty spontaneously (**Precocious**).

Heifers were fed once daily in the morning using a total mixed ration (TMR) mixer wagon (Delaval®, Münchrütistrasse, Switzerland) equipped with an electronic scale (± 1 kg precision). The diet consisted of grass silage and a protein-energy supplement at a rate of 4 g/kg body weight (Tab. 1). Water was provided ad libitum. Feed delivery was adjusted daily based on theorts measured each morning, and monthly feed refusals were recorded to calculate actual dry matter intake (DMI). Heifers were weighed after a 14-hour fast at the beginning and end of the trial and every 28 days (non-fasted) to assess growth performance.

Table 1 Chemical composition of experimental diets for Nellore heifers.

Item	Diet		
	Tifton-85 haylage	Control	Hydroxy
Nutrient,			
DM, %	49.11	88.76	88.90
CP, %	13.69	26.42	26.71
NDF, %	60.39	10.59	10.99
ADF, %	36.49	5.84	5.59
EE, %	2.84	3.05	2.89
MM, %	10.06	6.39	6.40

Cu, mg/kg	-	40.00	40.00
Zn, mg/kg	-	148.00	148.00

¹DM = dry matter; CP = crude protein; NDF = neutral detergent fiber; ADF = acid detergent fiber; EE = ether extract; OM = organic matter; MM = mineral matter; Cu: copper levels in the supplement; Zn: zinc levels in the supplement.

²Control: control treatment containing Cu = 40mg and Zn = 148 mg per kg of supplement in the form of CuSO₄ and ZnO; Hydroxy: treatment containing Cu = 40mg and Zn = 148 mg per kg of supplement in the form of Hydroxyminal.

Other minerals/minimum level: Ca = 23g/kg; P = 6 g/kg; Mg = 1 g/kg; S = 3 g/kg; F = 100 mg/kg; Mn = 30 mg/kg; Co = 2.4 mg/kg; I = 3 mg/kg; Se = 0.8 mg/kg.

Based on the nutritional profile of foods, analyzed according to the AOAC methodology (1990).

At 15 months of age, heifers were classified as pubertal or non-pubertal. Heifers that presented a corpus luteum (CL) in two consecutive ultrasonographic evaluations (7 days apart) were considered spontaneously pubertal. Heifers without a CL at 15 months were submitted to an ovulation induction protocol and classified as hormonally induced pubertal heifers. This protocol consisted of the insertion of a low-dose intravaginal progesterone implant (0.5 mg), followed by administration of 0.5 mg estradiol cypionate (EC) at implant removal.

Heifers showing a CL by 7 or 14 days after protocol completion were considered successfully induced to puberty. Fourteen days after the protocol, all heifers (both spontaneous and induced) were synchronized using a fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol. On Day 0, heifers received an intravaginal P4 implant (0.5 mg) and 2.0 mg estradiol benzoate (EB) intramuscularly. Seven days after initiation, the implant was removed, and ovum pick-up (OPU) was performed for embryo production.

Recovered oocytes were submitted to in vitro maturation (IVM) of cumulus-oocyte complexes (COCs), followed by in vitro fertilization (IVF) and embryo culture, according to the procedures described by Sujus et al. (2014). Semen from a single high in vitro fertility bull was used for fertilization, and the resulting embryos were cryopreserved in liquid nitrogen.

A total of eighty-nine pubertal recipient heifers were used for embryo transfer. These recipients originated from a commercial farm located in the rural area of Parintins, Amazonas State, Brazil. The animals were maintained under pasture conditions throughout the experimental period.

The experimental design was a randomized block design, in which recipients were blocked and distributed among treatments according to age and body weight. The treatments were **Control**: conventional mineral supplementation (sulfate-based), and **Hydroxy**: Cu and Zn supplementation in the form of hydroxy trace minerals.

At the beginning and end of the experiment, recipients were weighed and evaluated for body condition score (BCS) to obtain initial and final measurements. Animals were then identified with color-coded ear tags according to treatment group. The total duration of the experimental period was approximately 90 days.

Recipients were housed in four paddocks, each surrounded by electric fencing for animal control and containment. The predominant forage in the paddocks consisted of native floodplain grasses typical of the Amazon region (Tab. 2 and 3). Paddocks were equipped with natural water sources (rivers), ensuring ad libitum access to clean water.

Mineral supplements were provided ad libitum in plastic troughs in all paddocks. Initially, 15 kg of mineral supplement were offered per trough for both treatments. After 24 hours, trough readings were taken, considering 10% as feed refusal. Following the reading, a new quantity of supplement was supplied according to the leftover weight. The mineral supplement was weighed using a hanging fish scale, with the aid of a plastic container for handling.

Table 2 Average agronomic and nutritional characteristics of pasture during the experimental period.

Item	Pature	
	Entry	Exit
Height (cm)	52.26	23.08
Kg DM/ha	1,818.97	381.61
Composition (% DM)		
Dry matter	30.91	13.68
Mineral matter	14.20	17.58
Crude protein	13.00	18.14
Neutral detergent fiber	61.70	56.70
Acid detergent fiber	32.40	42.40
Total digestible nutrients	56.80	48.40

Table 3 Average mineral contents in pasture during the experimental period.

Itens (% / DM)	Pasture	
	Entry	Exit
Calcium	0.50	0.65
Phosphorus	0.29	0.39
Potassium	2.12	2.51

Magnesium	0.23	0.37
Sulfur	0.33	0.35
Chlorine	0.46	0.71

Recipients were synchronized using a Fixed-Time Embryo Transfer (FTET) protocol. On day 0, was of the insertion of a low-dose intravaginal progesterone implant (0.5 mg) and 2.0 mg of estradiol benzoate (EB). Seven days after the beginning of the protocol, the P4 implant was removed, and 0.5 mg of estradiol cypionate (EC), 0.5 mg of cloprostenol (a PGF₂ α analog), and 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) were administered intramuscularly. Embryo transfer was performed 14 days after P4 device removal.

The presence and diameter of the corpus luteum (CL) were considered at the time of embryo transfer. Recipients underwent ultrasonography (US) at 60 days post-transfer to evaluate pregnancy rate.

Blood samples were collected at the beginning and end of the 2023–2024 breeding season. Blood was drawn from the coccygeal vein, located at the base of the tail, into tubes containing K₂EDTA. Plasma samples were prepared for trace element analysis to determine Cu and Zn concentrations, using atomic absorption spectrometry, as described by (Pogge; Hansen, 2013).

Blood collection for progesterone analysis was performed on the day of embryo transfer. Progesterone concentrations were determined by automated chemiluminescence, using commercial kits for the IMMULITE 1000 system (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

The chemical composition of the forage was analyzed using the near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) method.

Statistical analyses were performed using the MIXED and GLIMMIX procedures of SAS version 9.3. Results were considered significant at $P \leq 0.05$ and trending at $0.05 < P \leq 0.10$.

All data were tested for residual normality using the Shapiro–Wilk test, and homogeneity of variances was assessed using the Levene test. Outliers were identified and removed based on the studentized residual (r-value).

All variables were analyzed using the GLIMMIX procedure, and the Satterthwaite approximation was applied to determine the denominator degrees of freedom for fixed-effect tests. A binomial distribution was used to analyze the effects of treatments on

pregnancy rate and estrus occurrence, while the time to estrus onset was analyzed using a normal distribution. Means were compared using the LSMEANS statement.

Additional analyses were conducted to evaluate the relationship between time to estrus, time to artificial insemination (AI), and pregnancy probability within each treatment. Furthermore, the relationship between body weight and the probability of pregnancy and estrus was evaluated using logistic regression (LIFETEST procedure) for each protocol.

13 Results

The analysis of parameters evaluated showed no significant differences in initial body weight (350 kg for the control group and 347 kg for the hydroxy trace minerals group; $P = 0.7954$) or in initial BCS (2.6 for control and 2.5 for hydroxy trace minerals; $P = 0.6515$). Mineral intake did not differ between treatments, with the control group consuming 57 g/day of supplement and the hydroxy trace minerals group consuming 62 g/day. Final body weight also showed no significant difference between groups (354 kg for control and 347 kg for hydroxy trace minerals; $P = 0.3345$), as did final BCS (2.7 for control and 2.6 for hydroxy trace minerals; $P = 0.6096$).

Average daily gain (ADG) was 0.071 kg in the control group and 0.012 kg in the hydroxy trace minerals group, without statistical significance ($P = 0.1784$). The difference in BCS between the start and end of the experiment was 0.01 for control and 0.15 for hydroxy trace minerals ($P = 0.2561$).

Regarding serum mineral concentrations, the hydroxy trace minerals group showed higher Zn levels (96.3 $\mu\text{g/dL}$) compared to the control (84.5 $\mu\text{g/dL}$; $P = 0.0183$). Similarly, copper concentration was significantly lower in the hydroxy trace minerals group (48.4 $\mu\text{g/dL}$) than in the control (58.0 $\mu\text{g/dL}$; $P = 0.0132$).

Reproductive parameters, including CL diameter (16.5 mm for control and 15.9 mm for hydroxy trace minerals; $P = 0.6483$), estrus percentage (73.0% for control and 86.8% for hydroxy trace minerals; $P = 0.1551$), P4 concentration (3.17 ng/mL for control and 2.87 ng/mL for hydroxy trace minerals; $P = 0.6608$), and follicle diameter (11.20 mm for control and 10.42 mm for hydroxy trace minerals; $P = 0.2353$) showed no significant differences between treatments. Pregnancy rate was higher in the hydroxy trace minerals group (33%, 15/45) compared to control (18%, 9/44), but this difference was not statistically significant ($P = 0.2313$; Tab. 4).

Table 4 Effect of mineral supplementation on reproductive performance and serum Cu and Zn concentrations of F1 crossbred heifers (Angus x Nellore) in fixed-time embryo transfer.

Item	Treatments		SEM ²	P-value
	Control	Hydroxy		
N	44	45	-	-
Initial body weight, kg	350	347	14	0.7954
Initial BCS (1 – 5)	2.6	2.5	0.2	0.6515
Final body weight, kg	354	347	14	0.3345
Final BCS, (1 - 5)	2.7	2.6	0.1	0.6096
ADG	0.071	0.012	0.2	0.1784
BCS difference	0.01	0.15	4.0	0.2561
Concentration de Zn, ug/dL	84.5	96.3	3.7	0.0183
Concentration de Cu, ug/dL	58.0	48.4	3.1	0.0132
Corpus Luteum Diameter, mm	16.5	15.9	1.06	0.6483
Estrus, %	73.0	86.8	-	0.1551
Concentration de P4, ng/mL	3.17	2.87	0.37	0.6608
Follicle diameter, mm	11.20	10.42	0.55	0.2353
Pregnancy rate ¹ , %	18 (9/44)	33 (15/45)	-	0.2313

¹Pregnancy: Percentage of pregnancy at 60 days after TETF; Corpus luteum diameter: Corpus luteum diameter in millimeters; Serum zinc concentration: Average serum zinc concentration in micrograms per deciliter; Serum copper concentration: Average serum copper concentration in micrograms per deciliter. Final weight and BCS – corresponds to the end of 90 days of supplementation.

²SEM = Standard error of the mean.

The probability of pregnancy and the other variables measured in the study were analyzed using logistic regression. No significant relationships were found between the studied variables and the probability of pregnancy ($P > 0.05$; Tab. 5).

Table 5 Logistic equations for the effect of the studied variables and their relationship with the pregnancy rate.

Comparison		P-value
Pregnancy vs Concentration Zn	Logit P = $-2.9568 + 0.0211Zn$	0.1933
Pregnancy vs Concentration Cu	Logit P = $0.9344 - 0.0399 Cu$	0.1063
Pregnancy vs Concentration P4	Logit P = $-0.6795 - 0.1213 P4$	0.4797
Pregnancy vs Follicle Diameter	Logit P = $-0.1911 - 0.0681 Fol.$	0.4992
Pregnancy vs CL Diameter	Logit P = $-1.9872 + 0.0639 CL$	0.2718
Pregnancy vs final weight	Logit P = $-2.9259 + 0.0056 \text{ final weight}$	0.1929
Pregnancy vs final BCS	Logit P = $-0.0737 - 0.3416 \text{ final BCS}$	0.2230
Pregnancy vs BCS Difference	Logit P = $-0.9754 + 0.0315$ BCS difference	0.1182
Pregnancy vs ADG	Logit P = $-0.9555 - 0.0020 ADG$	0.9953

Follicle – Follicle diameter on day 10 of the protocol, probable day of ovulation. Progesterone contraction (P4) and CL diameter on the day of embryo placement. None of the equations showed a significant effect.

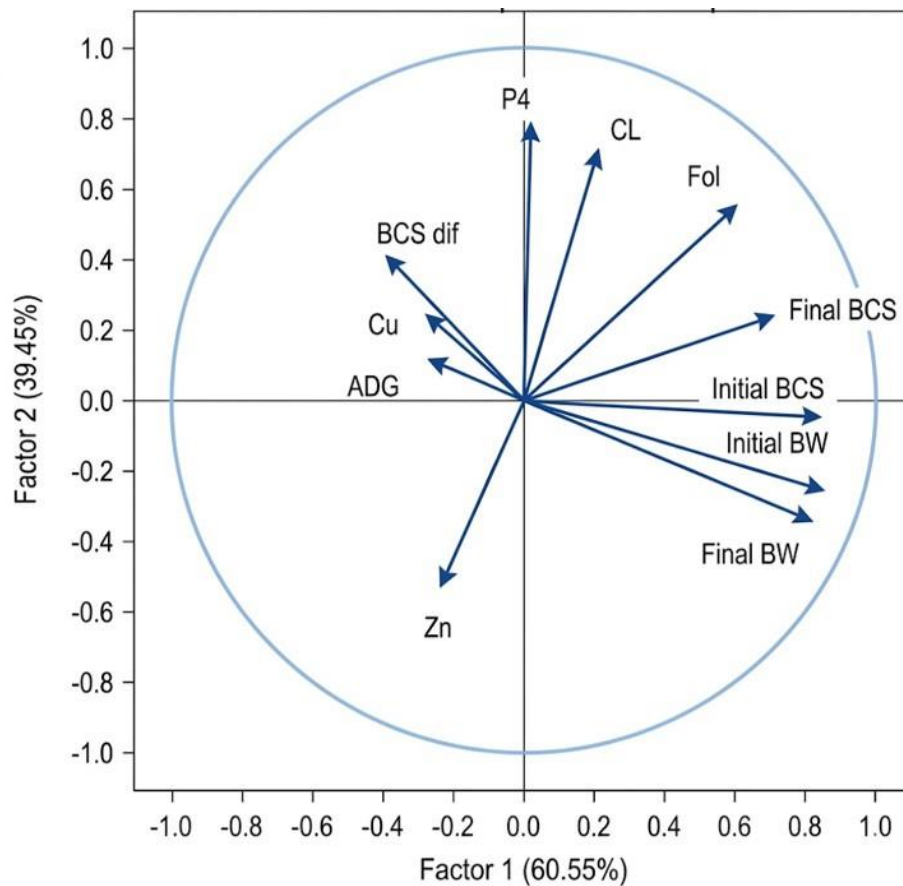


Figure 1 PCA analysis of quantitative variables of bovine embryo recipient females.

Principal Component Analysis (PCA; Fig. 1) was performed to investigate the relationships among the variables measured in the animals subjected to the treatments. The first two principal components together explained 100% of the total data variation, with Factor 1 accounting for 60.55% and Factor 2 for 39.45%.

Factor 1 was strongly influenced by the variables initial weight, final weight, initial BCS, final BCS, ovulatory follicle diameter, CL diameter, and P4 concentration, all showing positive correlations, indicating that these variables are interrelated and explain a large portion of the variation observed in this component.

Factor 2 was mainly characterized by Zn concentration, which showed a strong negative correlation with the variables associated with Factor 1, highlighting it as an independent explanatory variable relative to the body and reproductive parameters. Variables such as ADG, Cu concentration, and the change in BCS had less influence on both factors and were more diffusely distributed, suggesting a lower contribution of these variables to the overall variability of the analyzed data.

14 Discussion

The increase in serum Zn concentration observed in the Hydroxy treatment indicates greater bioavailability of this mineral source, a result consistent with the findings of (Spears; Kegley; Mullis, 2004), who reported improved intestinal absorption and reduced antagonism when Zn was supplied as a hydroxy trace mineral. This enhanced bioavailability may be related to the lower solubility of hydroxy Cu at neutral or slightly acidic pH (Spears; Kegley; Mullis, 2004). Zinc plays a critical role in physiological and reproductive processes, including DNA synthesis, maintenance of cell membrane integrity, follicular differentiation, and gonadal hormone secretion (Duffy; Yin; Redding, 2023; Perry et al., 2021). However, although the increase confirms adequate absorption and mobilization of the mineral, this effect did not translate into improvements in the productive or reproductive indicators evaluated in the present study.

Conversely, plasma Cu concentrations were numerically lower in the Hydroxy group. Although no significant difference was detected, this pattern does not align with the literature, which generally reports greater availability of hydroxy Cu due to its ruminal stability and reduced interaction with antagonists such as sulfur, molybdenum, and iron—characteristics that typically enhance bioavailability (Spears; Kegley; Mullis, 2004). The lower plasma concentration observed here may reflect greater hepatic deposition, considering that the liver is the primary storage site for this mineral and that plasma Cu does not always reflect total mineral status in well-supplied animals (Spears; Brandao; Heldt, 2022). Thus, the reduced plasma concentration does not indicate functional deficiency but suggests physiological adjustments in Cu metabolism in response to the supplemented source.

The absence of differences in body weight, body condition score, average daily gain, and supplement intake reinforces that both treatment groups were maintained under similar nutritional conditions. These results agree with (Springman; Drewnoski; Funston, 2021), who also reported no productive or reproductive effects when comparing hydroxy and sulfate sources of Cu and Zn in Angus heifers. Therefore, mineral status was not a limiting factor for productive performance, helping explain the lack of expressive reproductive effects.

Regarding reproductive physiology, parameters such as ovulatory follicle diameter, corpus luteum diameter, progesterone concentration, and estrus expression did not differ between mineral sources. Under adequate management, body condition, and

baseline nutrition, supplementation with trace minerals in different chemical forms is expected to exert limited influence on reproductive efficiency (Jalali et al., 2020; Perry et al., 2021). This reinforces the concept that the effects of trace minerals are more pronounced when pre-existing deficiencies or energy imbalances are present.

Although pregnancy rate was numerically higher in the Hydroxy treatment (33% vs. 18%), this difference was not statistically significant. This outcome may have been influenced by the limited number of available recipients or by the homogeneity of the animals' initial mineral status. As highlighted by (Perry et al., 2021), positive reproductive responses to mineral supplementation tend to occur under conditions of moderate or severe deficiency, which was not the case in this study.

The logistic regression analysis and Principal Component Analysis (PCA) further demonstrated that variations in serum minerals and body parameters were not direct determinants of pregnancy probability. These findings reinforce that simply increasing the bioavailability of Cu and Zn does not necessarily lead to improved reproductive efficiency when animals are already in adequate nutritional condition (Ahola et al., 2004).

From a practical standpoint, supplementation with hydroxy trace minerals may offer advantages due to their greater ruminal stability and lower reactivity with antagonists, characteristics that enhance absorption consistency (Spears; Kegley; Mullis, 2004). However, appropriate balancing between Cu and Zn is essential to prevent mineral antagonisms and ensure metabolic homeostasis. Thus, although hydroxy trace minerals did not promote reproductive improvements in this study, they remain relevant nutritional alternatives in systems where mineral challenges are more pronounced.

15 Conclusion

Supplementation with Cu and Zn in the form of hydroxy trace minerals altered mineral status (increasing Zn and reducing Cu), but it did not result in significant improvements in reproductive or body performance of the recipients during the 90-day experimental period.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) for financial support.

16 References

- AHOLA, J. K. *et al.* Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *Journal of Animal Science*, v. 82, n. 8, p. 2375–2383, 1 ago. 2004.
- DUFFY, R.; YIN, M.; REDDING, L. E. A review of the impact of dietary zinc on livestock health. *Journal of Trace Elements and Minerals*, v. 5, p. 100085, set. 2023.
- ELER, J. P. *et al.* Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. *Journal of Animal Science*, v. 80, n. 4, p. 951–954, 1 abr. 2002.
- FERRAZ, M. V. C. *et al.* A combination of nutrition and genetics is able to reduce age at puberty in Nelore heifers to below 18 months. *Animal*, v. 12, n. 3, p. 569–574, 2018.
- FERREIRA, E. M. *et al.* SIMPRUPASTO: o uso da ciência e de tecnologias para a mudança de paradigmas. EDFMA ed. Maranhão: [S.n.]. v. 1
- FORMIGONI, A. *et al.* Effects of an organic source of copper, manganese and zinc on dairy cattle productive performance, health status and fertility. *Animal Feed Science and Technology*, v. 164, n. 3–4, p. 191–198, mar. 2011.
- GUNSKI, R. J. *et al.* Idade ao primeiro parto, período de gestação e peso ao nascimento na raça nelore. *Ciência Agronômica*, v. 32, p. 46–52, 2001.
- HOSTETLER, C. E.; KINCAID, R. L.; MIRANDO, M. A. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *The Veterinary Journal*, v. 166, n. 2, p. 125–139, set. 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas agropecuárias do Brasil – 2024. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br> Acesso em: 20 de outubro de 2025.
- JALALI, S. *et al.* Influence of supplemental copper, manganese, and zinc source on reproduction, mineral status, and performance in a grazing beef cow-calf herd over a 2-year period. *Applied Animal Science*, v. 36, n. 5, p. 745–753, out. 2020.
- KAUFFOLD, J. *et al.* The Developmental Competence of Oocytes from Juvenile Calves is Related to Follicular Diameter. *Journal of Reproduction and Development*, v. 51, n. 3, p. 325–332, 2005.
- LANDRY, D. A. *et al.* Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. *Theriogenology*, v. 86, n. 5, p. 1240–1246, 15 set. 2016.
- LANDRY, D. A. *et al.* Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. *Reproduction*, v. 156, n. 3, p. 239–248, set. 2018.
- NÚÑEZ-DOMINGUEZ, R. *et al.* Lifetime production of beef heifers calving first at two vs three years of age. *Journal of animal science*, v. 69, n. 9, p. 3467–3479, 1991.

PERRY, G. A. *et al.* Impact of trace mineral source on beef replacement heifer growth, reproductive development, and biomarkers of maternal recognition of pregnancy and embryo survival. *Journal of Animal Science*, v. 99, n. 7, 1 jul. 2021.

POGGE, D. J.; HANSEN, S. L. Supplemental vitamin C improves marbling in feedlot cattle consuming high sulfur diets. *Journal of Animal Science*, v. 91, n. 9, p. 4303–4314, 1 set. 2013.

SERENO, J. R. B. *et al.* Estimativa de la edad y peso a la primera monta de novillas en el Pantanal brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 12, p. 1561–1565, dez. 2001.

SPEARS, J. W.; BRANDAO, V. L. N.; HELDT, J. Invited Review: Assessing trace mineral status in ruminants, and factors that affect measurements of trace mineral status. *Applied Animal Science*, v. 38, n. 3, p. 252–267, jun. 2022.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B.; MULLIS, L. A. Bioavailability of copper from tribasic copper chloride and copper sulfate in growing cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v. 116, n. 1–2, p. 1–13, set. 2004.

SPRINGMAN, S. A.; DREWNOSKI, M. E.; FUNSTON, R. N. Effects of hydroxy trace mineral supplementation on gain and reproductive performance in beef heifers. *Livestock Science*, v. 245, p. 104425, mar. 2021.

VANVALIN, K. R. *et al.* Influence of dietary zinc concentration and supplemental zinc source on nutrient digestibility, zinc absorption, and retention in sheep. *Journal of animal science*, v. 96, n. 12, p. 5336–5344, 3 dez. 2018.

VANVALIN, K. R. *et al.* Relative bioavailability of organic and hydroxy copper sources in growing steers fed a high antagonist diet1. *Journal of Animal Science*, v. 97, n. 3, p. 1375–1383, 1 mar. 2019.

17 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese buscou compreender, os efeitos da suplementação com hidroximinerais de cobre e zinco, sobre a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas submetidas a diferentes estratégias reprodutivas, incluindo a indução precoce da puberdade e o uso de biotecnologias como a produção *in vitro* e a transferência de embriões. De maneira geral, os resultados dos capítulos II e III demonstraram que, embora a suplementação com hidroximineral altere o status mineral dos animais, seus efeitos sobre os parâmetros reprodutivos são limitados quando as exigências nutricionais são atendidas.

Observou-se que a precocidade das doadoras foi o principal fator determinante da eficiência reprodutiva, com novilhas de maturidade sexual mais tardia apresentando

maior taxa de prenhez, o que reflete a importância da maturidade fisiológica na competência embrionária. Por outro lado, a suplementação mineral apresentou efeito mais evidentes sobre os parâmetros metabólicos, como a concentração sérica de zinco, sem reflexos consistentes sobre o desempenho reprodutivo.

Do ponto de vista científico, os achados reforçam que estratégias de manejo reprodutivo, especialmente aquelas relacionadas à seleção e ao momento da indução da puberdade, são mais determinantes para o sucesso de programas de transferências de embriões do que alterações na forma de suplementação mineral isoladamente. Como limitação, destaca-se que os estudos foram conduzidos em condições específicas de manejo e com animais sem deficiência de mineral aparente, o que pode ter reduzido a magnitude das respostas observadas.

Dessa forma, recomenda-se que estudos futuros explorem diferentes níveis nutricionais, períodos mais longos de avaliação e condições experimentais distintas, a fim de melhor compreender o papel dos hidroximinerais em contextos onde a nutrição mineral possa ser fator limitante da eficiência reprodutiva.