

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/05/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HIDROXICLORETOS DE COBRE E MANGANÊS NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO, SAÚDE E
QUALIDADE ÓSSEA

PRISCILA MICHELIN GROFF URAYAMA

BOTUCATU – SP

Junho / 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HIDROXICLORETOS DE COBRE E MANGANÊS NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO, SAÚDE E
QUALIDADE ÓSSEA

PRISCILA MICHELIN GROFF URAYAMA
Médica veterinária, Mestra em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Sartori

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação
em Zootecnia da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU – SP

Junho / 2021

U72e

Urayama, Priscila Michelin Groff

Efeito da suplementação de hidroxicloretos de cobre e manganês na alimentação de frangos de corte sobre o desempenho, saúde e qualidade óssea / Priscila Michelin Groff Urayama. -- Botucatu, 2021
96 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: José Roberto Sartori

1. Frango de corte. 2. Cobre na nutrição animal. 3. Manganês na nutrição animal. 4. Biodisponibilidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

PRISCILA MICHELIN GROFF URAYAMA, filha de Ivete Michelin Groff e Orides Bavaresco Groff, nasceu em 02 de março de 1993, na cidade de Francisco Beltrão, Paraná - Brasil.

Em dezembro de 2015, concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná – UNICENTRO, Guarapuava/PR - Brasil.

Em fevereiro de 2018, concluiu o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de nutrição e produção de aves na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos/PR - Brasil.

Em março de 2018, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível de Doutorado, área de Melhoramento e Nutrição Animal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ / Botucatu/SP - Brasil.

Em outubro de 2020, ingressou na empresa COPACOL – Cooperativa Consolata, localizada na cidade de Cafelândia-PR, na área de assistência técnica de frangos de corte.

Dedico esta conquista a toda minha família, em especial meus pais, minhas irmãs e meu marido por servirem de exemplo e pelo incentivo ao longo da minha trajetória.

Com amor, dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as graças que tens feito em minha vida.

Aos meus pais Orides Bavaresco Groff e Ivete Michelin Groff e às minhas irmãs Daniela Groff Migliorini e Michele Michelin Groff, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e por sempre acreditarem no meu potencial. Minha família é meu porto seguro.

Ao meu marido Daniel H. Urayama, pelo amor, incentivo e por me fazer acreditar que sou capaz. Obrigada pelo companheirismo.

Ao meu orientador Dr. José Roberto Sartori, pela oportunidade e por todos os ensinamentos e conselhos. Também agradeço a confiança e ajuda em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em especial a Cláudia e Ellen por toda ajuda.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Botucatu.

À empresa Trouw Nutrition, pela parceria e financiamento da pesquisa, em especial à Karolina Von Zuben Augusto e Josiane Lage, por toda ajuda e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e integrantes do LabAves (Jéssica “pequi”, Cássio “cálcio”, Fernanda, Tatiane, Leonardo, Guilherme, Netto, Everton, Robert, Julianna, Armando, Érica, Giovana e Andrey), e aos estagiários que muito nos ajudaram (Paola, Gustavo, Laura, Juliana, Laís, Pedro, Amanda, Beatriz), sou muita grata pela amizade que criamos, pelo apoio e por toda ajuda.

Ao Wanderley Thiago da Silva, Técnico do LabAves.

Aos funcionários da Fábrica de Ração: Adriano, Adilson e Sandro.

Ao Prof. Dr. Adriano Wagner Ballarin, por ter disponibilizado o laboratório e ao técnico Ailton por ter me auxiliado.

Ao Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça por ceder o laboratório para realização das análises de qualidade de carne. Agradeço também a Carolina por toda ajuda.

À Prof.^a Dra. Margarida Maria Barros e ao Dr. Pedro Pucci por ceder o laboratório para realização das análises imunológicas e antioxidantes e pelo auxílio técnico, em especial ao Igor e William por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi por toda ajuda nas análises imunológicas.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla por ceder o laboratório para análise da expressão gênica, em especial agradeço ao Dr. Samir Moura Kadri pelo auxílio técnico sem sua ajuda não seria possível a realização dessa análise.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Lima Meirelles por ter contribuído com parte das análises bromatológicas, especialmente a Gisele Setznagl.

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha por ter contribuído com a realização das análises minerais. Agradeço especialmente ao Dr. José Cavalcante Souza Vieira pelo auxílio técnico e por toda ajuda.

Ao professor Dr. Celso Pezzato, obrigada pelos ensinamentos e pela parceria.

Aos meus companheiros de quatro patas, Teemo, Chokito e Biluzinho, não existe dia ruim quando você chega em casa e recebe o amor de um cachorro!

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre
nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes,
porém leais com o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os
pensamentos”. (**Paulo Beleki**)

RESUMO GERAL

As rações para frangos de corte geralmente são suplementadas com minerais da fonte sulfato. Essa fonte é conhecida por ter baixa biodisponibilidade, já que esses minerais podem se complexar com outros nutrientes da dieta tornando-se indisponíveis. Dessa maneira, tradicionalmente ocorre a suplementação mineral da dieta com valores acima do recomendado, a fim de se assegurar que a exigência seja atendida. Por esse motivo, além de aumentar o custo da ração, ocorre também poluição ambiental, por aumento da excreção desses micronutrientes. Além disso, fontes inorgânicas tem se tornado cada vez mais escassas, sendo importante que novas fontes sejam estudadas. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi testar os hidroxicloretos de cobre e manganês nas rações de frangos de corte e seus efeitos no desempenho, características de carcaça, ossos, carne, além dos parâmetros hematológicos e imunológicos. Foram alojados 1920 pintainhos, machos, Cobb 500®, com um dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizados com oito tratamentos, oito repetições totalizando 64 parcelas com 30 aves cada. Os tratamentos foram constituídos em arranjo fatorial $2 \times 3 + 2$ (dois níveis de cobre 15 e 150 ppm; três níveis de manganês 40, 80 e 120 pp, ambos na fonte hidroxicloreto (H); dois tratamentos adicionais: controle 1 (ração basal com suplementação de 15 ppm de sulfato de cobre e 80 ppm de sulfato de manganês) e controle 2 (ração basal com sulfato de cobre 150 ppm e 100 ppm de sulfato de manganês). Os dados foram submetidos à ANOVA, e quando significativos foram comparados pelos testes de Tukey e Dunnet a 5% de significância. Ao fornecer 150 ppm de CuH foi possível melhorar a conversão alimentar e diminuir as lesões nas patas. A suplementação de rações para frangos de corte com 150 ppm de CuH e 40 ou 80 ppm de MnH aumentou o rendimento do peito e melhorou a resistência da pele. Com a suplementação das rações com 150 ppm de CuH e 80 ppm de MnH é possível melhorar a qualidade óssea, aumentar a atividade hepática da enzima super óxido dismutase e a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Além disso, a fonte de hidroxicloreto demonstrou ser mais biodisponível do que a fonte de sulfato pelo aumento da concentração dos minerais no fígado, ossos e no plasma. Consequentemente, a fonte hidroxicloreto pareceu ser mais eficiente do que a fonte de sulfato para a qualidade óssea, resistência da pele e para os parâmetros do sistema imunológico. Sendo assim, é possível concluir que ao utilizar a fonte hidroxicloreto de cobre e manganês nos níveis 150 ppm e 80 ppm, respectivamente, é possível melhorar a saúde e a produtividade dos frangos de corte.

Palavras-chave: frango de corte, cobre na nutrição animal, manganês na nutrição animal, biodisponibilidade.

ABSTRACT

Broiler feed are usually supplemented with minerals from the sulphate source. This source is known to have low bioavailability. These minerals can complex with other nutrients in the diet and become unavailable. Thus, traditionally, mineral supplementation of the diet occurs with values above the recommended. This increasing the cost of feed, environmental pollution and increases excretion of micronutrients. In addition, inorganic sources have become increasingly scarce, and it is important that new sources are studied. Therefore, the objective of this research was to evaluate copper and manganese hydroxychlorides in broiler feed and their effects on performance, carcass characteristics, bones, meat, in addition to hematological and immunological parameters. 1920 one-day-old male Cobb 500® chicks were housed, distributed in a completely randomized design with eight treatments, eight replicates totaling 64 plots with 30 birds each. The treatments were constituted in a 2x3+2 factorial arrangement (two levels of copper 15 and 150 ppm; three levels of manganese 40, 80 and 120 pp, both in the hydroxychloride (H) source); two additional treatments: control 1 (basal diet with supplementation of 15 ppm of copper sulphate and 80 ppm of manganese sulphate) and control 2 (basal feed with 150 ppm of copper sulphate and 100 ppm of manganese sulphate). The data were submitted to ANOVA, and when significant were compared by the tests of Tukey and Dunnet at 5% significance. By providing 150 ppm of CuH it was possible to improve feed conversion and reduce foot damage. The supplementation of broiler rations with 150 ppm of CuH and 40 or 80 ppm of MnH increased breast performance and improved skin resistance. With the supplementation of feeds with 150 ppm of CuH and 80 ppm of MnH, it is possible to improve bone quality, increase the hepatic activity of the super oxide dismutase enzyme and the production of nitric oxide by macrophages . A in addition, the hydroxychloride source has been shown to be more bioavailable than the sulphate source by increasing the concentration of minerals in liver, bone and plasma. Consequently, the hydroxychloride source appeared to be more efficient than the sulfate source for bone quality, skin strength and immune system parameters. Thus, it is possible to conclude that by using the hydroxychloride source of copper and manganese at levels 150 ppm and 80 ppm, respectively, it is possible to improve the health and productivity of broilers.

Keywords: broiler chicken, copper in animal nutrition, manganese in animal nutrition, bioavailability,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ligações químicas das fontes de suplementação mineral.	20
Figura 2 Absorção, distribuição e metabolismo do cobre..	22
Figura 3 Produção mitocondrial e depuração do ânion superóxido pela SOD2 (SOD-Mn).	28
Figura 4 Representação das relações antagônicas entre os minerais.	30
Figure 5 iNOS (a) and SOD-2 (b) relative gene expression in liver of broiler chickens with 35 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn and challenged with <i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide. Tissue samples were collected of six birds per treatment and analysed using qRT-PCR normalized against β -actin (housekeeping gene) expression. Data are presented as fold changes compared to control 1 treatment (dotted line) (n = 6). *An asterisk indicates that the bars differ significantly from the control 1 treatment at $P < 0.05$ by Kruskal-Wallis test.....	83

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1. Ingredients (%) and calculated nutritional levels of the basal diet.	43
Table 2. Supplementary levels of trace minerals fed to broilers and analyzed levels of Copper and Manganese (ppm) in the diet by treatment and period.	44
Table 3. Growth performance of broilers supplemented with different sources and levels of copper and manganese at 1 to 21 and 1 to 42 days of age.	49
Table 4. Parameters of carcass and parts yield of broilers at 42 days of age supplemented with different sources and levels of copper and manganese.	50
Table 5. pH, lightness (L*), redness (a*), yellowness (b*), water-holding capacity (HWC), cooking loss, and shear force in chicken breasts at 42 days of age supplemented with different sources and levels of copper and manganese.	51
Table 6. Thigh skin quality, footpad (TFS) and litter (TLS) score and, litter dry matter (LDM) of broilers at 42 days of age supplemented with different sources and levels of copper and manganese.	52
Table 7. Mineral contents in liver and plasma and apparent ileal absorption (AIA) of Cu and Mn of broilers at 42 days of age supplemented with different sources and levels of copper and manganese.	53

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Table 1. Ingredients (%) and calculated nutritional levels of the basal diet.....	71
Table 2. Supplementary levels of trace minerals fed to broilers and analyzed levels of Copper and Manganese (ppm) in the diet by treatment and period.....	72
Table 3. Primer sequences for the target and reference genes.....	77
Table 4. Tibia bone quality of broilers with 42 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn.....	79
Table 5. Femoral degeneration, black bone syndrome and mineral content in tibia of broilers with 42 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn.....	80
Table 6. Production of hydrogen peroxide (H_2O_2 , $\text{nmol}/2 \times 10^6$ cells) and nitric oxide (NO , $\mu\text{mol}/^2 \times 10^6$ cells) by peritoneal macrophages and activity of superoxide dismutase (SOD, U.mg pt^{-1}) in the liver of broilers with 35 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn	81
Table 7. White blood cells parameters with broilers chicken challenged with <i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide of broilers with 35 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn.....	82

LISTA DE ABREVIACÕES

AF - Abdominal fat
AIA - Apparent ileal absorption
a* - Redness
BB - Black Bone
BBS – Bone breaking strength
b* - Yellowness
BW - Body weight
CL - Cooking loss
CSM - Copper sulfate monohydrate
CuH - Copper hydroxychloride
CY - Carcass yield
CV – coefficient of variation
DNA - Deoxyribonucleic acid
DL - Drip loss
FCR - Feed conversion ratio
FD – Femoral degeneration
FI - Feed intake
iNOS - Inducible nitric oxide synthase
H₂O₂ - hydrogen peroxide
LDM - Litter dry matter
LPS - lipopolysaccharide
L* - Lightness
ME - Metabolizable energy
MnH - Manganese hydroxychloride
MSM -Manganese sulfate monohydrate
NO - nitric oxide
ppm - Part per million
P-value – Probability
PCR – Polymerase chain reaction
RNA- Ribonucleic acid
RT-PCR - Reverse transcription polymerase
SF - Shear force
SI - Seedor index
SOD - Superoxide dismutase
TDM - Tibia dry matter
TFS - Total footpad score
TLS - total litter score
WG - weight gain
WHC - water-holding capacity

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
<i>Revisão bibliográfica.....</i>	15
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
1.1 Minerais na avicultura	17
1.1.1 Minerais inorgânicos.....	18
1.1.2 Minerais orgânicos.....	18
1.1.3 Hidroxicloreto	19
1.2 Cobre na avicultura	21
1.2.1 Absorção do cobre nas aves	21
1.2.2 Cobre: desempenho e desenvolvimento ósseo	23
1.2.3 Funções do cobre no sistema imunológico e antioxidante	23
1.2.4 Outras funções do cobre no metabolismo das aves	24
1.2.5 Toxidez e deficiência de cobre nas aves	25
1.3 Manganês na avicultura	25
1.3.1 Absorção do manganês nas aves	25
1.3.2 Atividades enzimáticas do manganês	26
1.3.3 Manganês: desempenho e desenvolvimento ósseo	26
1.3.4 Funções do manganês no sistema imunológico e antioxidante	27
1.3.5 Toxidez e deficiência do manganês nas aves	29
1.4 Interações entre os minerais	29
1.5 Expressão de genes relacionados à saúde de frangos de corte	30
1.5.1 Transcrição e tradução	30
1.5.2 Influência da nutrição na expressão gênica.....	31
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II	39
INTRODUCTION.....	41
MATERIAL AND METHODS	42
<i>Experimental design and diets.....</i>	42
<i>Feeding and management</i>	44
<i>Productive performance.....</i>	45
<i>Carcass and cuts yield.....</i>	45
<i>Meat quality.....</i>	45
<i>Skin resistance, footpad scoring and litter quality</i>	46
<i>Mineral content in plasma and liver</i>	47
<i>Apparent ileal mineral absorption (AIA)</i>	48

<i>Statistical analysis</i>	48
RESULTS	48
DISCUSSION	54
ACKNOWLEDGMENT	60
REFERECES	60
CAPÍTULO III	67
INTRODUCTION	69
MATERIAL AND METHODS	70
<i>Experimental design and diets</i>	70
<i>Feeding and management</i>	72
<i>Bone parameters</i>	73
<i>Copper and manganese content in tibia</i>	74
<i>Challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide</i>	75
<i>Respiratory burst assessment of macrophages: NO and H₂O₂ production</i>	75
<i>Enzymatic activity of superoxide dismutase</i>	76
<i>White blood cells parameters</i>	76
<i>RNA Extraction and Quantitative Real-time PCR Analysis</i>	76
<i>Statistical analysis</i>	78
RESULTS	78
DISCUSSION	83
ACKNOWLEDGMENT	89
REFERÊNCIAS	89
IMPLICAÇÕES	95

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Estima-se que a população mundial, atualmente em torno dos 7,7 bilhões de pessoas, irá alcançar 9,7 bilhões até 2050 (ONU, 2019). Com esse aumento populacional também haverá aumento da demanda por alimentos, incluindo a proteína animal. A avicultura de corte é um ramo do agronegócio com destaque nesse cenário, principalmente pelas características de alta produtividade em curto espaço de tempo. O Brasil se destaca nesse cenário ocupando o *ranking* de maior exportador e terceiro maior produtor mundial de frango (ABPA, 2020). Porém, mesmo com todo esse destaque, ainda há diversas oportunidades no setor avícola para otimizar a produção e a qualidade do produto final.

Com a evolução do melhoramento genético na avicultura foi possível obter animais precoces e altamente produtivos. Em 1930, os frangos de corte atingiam 1,50 kg aos 105 dias de idade, com conversão alimentar de 3,50. Atualmente é possível obter, aos 42 dias de idade, uma ave com aproximadamente 3,10 kg e conversão alimentar de 1,59 (COBB, 2018). Dessa forma, a nutrição deve acompanhar as mudanças genéticas que os frangos de corte vêm sofrendo nas últimas décadas, principalmente na adequação dos níveis de macro e micronutrientes ofertados, de modo a atender as exigências de crescimento e influenciar positivamente os sistemas imunológicos, locomotor e antioxidante.

Apesar de serem incluídos em menores quantidades nas rações, os microminerais são importantes nutrientes aos organismos. Os microminerais fazem parte, por exemplo, da modulação do sistema imune e antioxidante, reprodução e metabolismo de macromoléculas orgânicas (SWIĄTKIEWICZ; ARCZEWSKA-WŁOSEK; JÓZEFIAKA, 2014). A exemplo disso, a incorporação dos microminerais cobre e manganês nas rações, são essenciais para o crescimento e para a saúde de frangos de corte, devido seu envolvimento em diversos processos fisiológicos (RICHARDS et al., 2010).

A suplementação do cobre e manganês nas rações normalmente ocorre por fontes inorgânicas (sulfatos, carbonatos, cloretos e óxidos) e, menos comumente, por fontes orgânicas (íons metálicos ligados a moléculas orgânicas). A fonte inorgânica é conhecida pela menor biodisponibilidade devido a rápida dissociação dos elementos no trato gastrointestinal tornando-os livres para interagir com antagonistas (UPADHAYA; LEE; KIM, 2016). Enquanto isso, a fonte orgânica é conhecida por apresentar maior biodisponibilidade (SINGH; GHOSH; HALDAR, 2015), contudo, a literatura apresenta resultados conflitantes (RUTZ, 2005) e, ressalta, alto custo dos produtos.

Os hidroxicloretos surgiram na década de 90 como fonte alternativa de suplementação mineral. São substâncias de estrutura tridimensional cristalina que tem grande estabilidade no trato

gastrointestinal, principalmente pela maior força de ligação química (COHEN e STEWARD, 2012). Dessa maneira, os hidroxicloretos conseguem disponibilizar quantidades maiores de minerais do que minerais da fonte inorgânica contribuindo positivamente no desempenho, saúde e diminuição da poluição ambiental.

Dessa forma, justificou-se a elaboração desta pesquisa para testar a suplementação com hidroxicloretos de cobre e manganês, em relação a fonte inorgânica, na ração de frangos de corte, e seus efeitos sobre o desempenho, características de carcaça, qualidade óssea, qualidade da carne, além da avaliação de parâmetros do sistema imunológico (Burst respiratório, contagem diferencial de leucócitos, expressão gênica da enzima óxido nítrico sintetase) e antioxidantes (atividade da super óxido dismutase, expressão gênica da SOD-Mn).

1.1 Minerais na avicultura

Os minerais representam cerca de 4% do peso vivo das aves e, apesar de necessários em menores concentrações no organismo, os micronutrientes são de extrema importância devido seu envolvimento em diversos processos fisiológicos (RICHARDS et al., 2010). Os minerais compõem estruturas de biomoléculas e necessários para o crescimento e maturação dos tecidos além de serem cofatores de várias enzimas (SILVA; PASCOAL, 2014).

Os minerais são classificados em duas formas. Quando necessários em quantidades maiores de 100 mg/dia são classificados como macrominerais e os microminerais quando a quantidade exigida por dia for menor de 100 mg. De acordo com as necessidades das aves, os principais macrominerais são: cálcio, fósforo, potássio, cloro, sódio, enxofre e magnésio e os microminerais: ferro, zinco, flúor, molibdênio, cobre, iodo, manganês e selênio (SILVA; PASCOAL, 2014).

Com relação aos microminerais, muito estudos estão sendo realizados com esses nutrientes inorgânicos avaliando seu efeito funcional para as aves. Os alimentos ou ingredientes funcionais são aqueles que oferecem benefícios à saúde e ao bem-estar animal, além de fornecerem os nutrientes básicos. Por isso, pesquisas realizadas com nutrição de aves têm indicado que a suplementação de microminerais em níveis acima do recomendado podem determinar benefícios adicionais (WERMANN; BARAT; BHATHENA, 1995; PAIK et al., 1999; ZHAO et al., 2010; LI et al., 2011) e que níveis de suplementação ótimos ao desempenho produtivo podem ser insuficientes para manter o bom funcionamento do sistema imune de aves sob desafio (SANTIN; MORAES; SANCHES, 2017). Diante disso, é necessário estudar estratégias nutricionais eficientes para que sejam atendidas as exigências dos microminerais, melhorem os parâmetros de saúde, mas que não causem impactos negativos ao ambiente, pois o excesso de mineral excretado pelas aves pode ser contaminante aos solos.

Com base nessas observações pode-se concluir que com a suplementação das rações para frangos de corte com o nível 150 ppm de cobre e 80 ppm de manganês, da fonte hidroxicloreto, há melhora na qualidade óssea, aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos durante o *burst* respiratório e da atividade da SOD hepática. Além disso, a suplementação com a fonte hidroxicloreto apresenta ser uma fonte promissora para melhorar o desempenho e a saúde dos frangos de corte, podendo ser utilizada em substituição a fonte sulfato com grandes benefícios a saúde dos frangos.

ACKNOWLEDGMENT

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors would also like to thank Trouw Nutrition for their financial contribution.

REFERÊNCIAS

- Almeida Paz, I. C. L., Mendes, A. A., Balog, A., Almeida, I. C. L., Vulcano, L.C., Komiyama, C. M. 2007. Caracterização da degeneração femoral em frangos de corte por meio da densidade mineral óssea. Rev. Bras. Cienc. Avic. Accessed: nov. 2019. https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2007000100011.
- Almeida Paz, I. C. L., Mendes, A. A., Martins, M. R. F. B., Fernandes, B. C. S., Almeida, I. C. L., Milbradt, E. L., Balog, A. and Komiyama, C. M. 2009. Biochemical and physiological weaknesses associated with the pathogenesis of femoral bone degeneration in broiler chickens. Int. J. Morphol. 27:571-575.
- Babior, B. M. 1995. The respiratory burst oxidase. Curr. Opin. Hematol. 2:55-60.
- Baldo, G. A. A., Paz, I. C. L. A., Alves, M. C. F., Nääs, I. A., Garcia, R. G., Caldara, F. R., Gavilan, C. W. S. 2013. Black bone syndrome in chicken meat. Braz. J. Poult. Sci, 15:317-322.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44, 276–287.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Cohen, J., and Steward, F. A. 2012. Hidroxy minerals - the newest development in mineral nutrition. Accessed: nov. 2019. <http://www.feedinfo.com/console/PageViewer.aspx?page=3090428>.
- Cozzolino, S. M. F. 1997. Biodisponibilidade de minerais. Rev. Nutr. 10:87-98.
- Dibner, J. J., Richards, J. D., Kitchell M. L. Quiroz, M. A. 2007. Metabolic challenges and early bone development. J. Appl. Poultry. Res. 16:126-137.

- Gajula, S. S., Chelasani, V. K., Panda, A. K., Raju Mantena, V. L. N., Savaram, R. R. 2011. Effect of Supplemental inorganic Zn and Mn and their interactions on the performance of broiler chicken, mineral bioavailability, and immune response. *Biol. Trace. Elem. Res.* 139:177-187.
- Gengelbach, G. P., Ward, J. D., Spears, J. W., Brown Jr., T. T. 1997. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. *J. Anim. Sci.* 75:1112–1118.
- Goel, A., Bhanja, S. K., Mehra, M., Majumdar, S., Pande, V. 2013. Effect of in ovo copper and iron feeding on post-hatch growth and differential expression of growth or immunity related genes in broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 48:279-285.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
- Huff, G. R., Huff, W. E., Farnell, M. B., Rath, N. C., Solis de los Santos, F. and Donoghue, A. M. 2010. Bacterial clearance, heterophil function, and hematological parameters of transport-stressed turkey poult supplemented with dietary yeast extract. *Poult. Sci.* 89:447-456.
- Jones, D. G., Suttle, N. F. 1981. Some effects of copper deficiency on leukocyte function in sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* 31:151–156.
- Korver, D. 2010. Reducing the incidence of black bone. *Poult. World.* 26:36-38.
- Li, S. F., Luo, X. G., Liu, B., Crenshaw, T. D., Kuang, X., Shao, G. Z., Yu, S. X. 2004. Use of chemical characteristics to predict the relative bioavailability of supplemental organic manganese sources for broilers. *J. Anim. Sci.* 82:2352-2363.
- Li, S., Lu, L., Hao, S., Wang, Y., Zhang, L., Liu, S., Liu, B., Li, K., Luo, X. 2011. Dietary manganese modulates expression of the manganese-containing superoxide dismutase gene in chickens. *J. Nutr.* 141:189-194.
- Liu, R., Jin, C., Wang, Z., Wang, Z., Wang, J., Wang, L. 2015. Effects of manganese deficiency on the microstructure of proximal tibia and OPG/RANKL gene expression in chicks. *Vet. Res. Commun.* 39:31-37.
- Lu, L., Wang, R. L., Zhang, Z. J., Steward, F. A., Luo, X., Liu, B. 2010. Effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on the growth performance, liver copper concentrations of broilers fed in floor pens, and stabilities of vitamin E and phytase in feeds. *Biol. Trace Elem. Res.* 138:181-189.
- Luo, X. G., Ji, F., Lin, Y. X., Steward, F. A., Lu, L., Liu, B., Yu, S. X. 2005. Effects of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and oxidation stability of vitamin E in feed. *Poult. Sci.* 84:888-893.

- Macari, M., Furlan, R. R., and Gonzales, E. 2002. Fisiologia aviaria aplicada a frangos de corte. 2nd ed. Funep, São Paulo, SP.
- Martínez Cummer, M. A., Heck, R., Leeson, L. 2006. Use of axial X-ray microcomputed tomography to assess three-dimensional trabecular microarchitecture and bone mineral density in single Comb White Leghorn hens. *Poult. Sci.* 85:706-711.
- McDowell, L. R. 2003. Minerals in animal and human nutrition. 2nd ed. Acad. Press Inc., San Diego, CA.
- Miles, R. D., O'Keefe, S. F., Henry, P. R., Ammerman, C. B., Luo, X. G. 1998. The effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and dietary prooxidant activity. *Poult. Sci.* 77:416-425.
- Mota, M. M., Hermes, R. G., Araújo, C. S. S., Pereira, A. S. C., Ultimi, N. B. P., Leite, B. G. S., Araújo, L. F. 2019. Effects on meat quality and black bone incidence of elevated dietary vitamin levels in broiler diets challenged with aflatoxin. *Animal*, 13: 2932-2938.
- M'Sadeq, S. A., Wu, S., Choct, M., and Swick, R. A. 2018. Influence of trace mineral sources on broiler performance, lymphoid organ weights, apparent digestibility, and bone mineralization. *Poult. Sci.* 97:3176-3182.
- National Research Council, NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Neves, R. C. F., Moraes, P. M., Saleh, M. A. D., Loureiro, V. R., Silva, F. A., Barros, M. M., Padilha, C. C. F., Jorge, S. M. A., Padilha, P. M. 2009. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chem.* 113:679- 683.
- Olkowski¹, A. A., Laarveld, B., Wojnarowicz, C., Chirino-Trejo, M., Chapman, D., Wysokinski, T. W., and Quaroni, L. 2011. Biochemical and physiological weaknesses associated with the pathogenesis of femoral bone degeneration in broiler chickens. *Avian Pathol.* 40:639-650.
- Olukosi, O. A., Kuijk, S. V., and Han, Y. 2018. Copper and zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens. *Poult. Sci.*, 97:3891-3898.
- Paik, I. K., Seo, S. H., Um, J. S., Chang, M. B., Lee, B. H. 1999. Effects of supplementary copper-chelate on the performance and cholesterol level in plasma and breast muscle of broiler chickens. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 12:794-798.
- Perez, V., Shanmugasundaram, R., Sifri, M., Parr, T. M., Selvaraj, R. K. 2017. Effects of hydroxychloride and sulfate form of zinc and manganese supplementation on superoxide dismutase activity and immune responses post lipopolysaccharide challenge in poultry fed marginally lower doses of zinc and manganese. *Poult. Sci.* 96:4200-4207.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic. Acids. Res.* 9:29-45.

Pick, E., and Mizel, D. 1981. Rapid microassay for measurement of superoxide and hydrogen Peroxide produced by macrophages in culture using an automatic enzyme Immunoassay reader. *J. Immunol. Methods.* 46:211-226.

Prabhakar, S. S., Zeballos, G. A., Montoya-Zavala, M., Leonard, C. 1997. Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *Am. J. Physiol.* 273:882–1888.

Prohaska, J. R., and Failla, M. L. 1993. Copper and immunity. In: Klurfeld, D.M. (Ed.), *Human Nutrition: A Comprehensive Treatise*, v. 8, Plenum Publishing, New York, p. 309–332.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., Euclides, R. F. 2011. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos*. 3rd ed., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, SP.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M. I., Donzele, J. L., Sakomura, N. K., Perazzo, F. G., Saraiva, A., Teixeira, M. L.; Rodrigues, P. B.; Oliveira, R. F.; Barreto, S. L. T.; Brito, C. O. 2017. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. Universidade Federal de Viçosa, 4th ed., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, SP.

Quereshi, M. A., Dietert, R. R., Bacon, L. D. 1986. Genetic Variation in the Recruitment and Activation of Chicken Peritoneal Macrophages. *Exp. Biol. Med.* 181:560-568.

Richards, J. D., Zhao, J., Harell, R. J., Atwell, C. A., Dibner, J. J. 2010. Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 23:1527-1534.

Rosa, C. R., Moraes, M., Neto, J. A. G., Nóbrega, J. A., Nogueira, A. R. A. 2002. Effect of modifiers on thermal behavior of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 79:517-523.

Rucker, R. B. T., Kosonen, M. S., Clegg, A. E., Mitchell, B. R., Rucker, J. Y., Keen. C. L. 1998. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:996-1002.

Russo, M., Teixeira, H. C., and Marcondes, M. C. 1989. Superoxide-independent Hydrogen peroxide release by macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22:1271-1273.

Salvemini, D., Wang, Z. Q., Wyatt, P. S., Bourdon, D. M., Marino, M. H.; Manning, P. T., Currie, M. G. 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118:829-838.

Santin, E., Moraes, M. L., Sanches, A. W. D. 2017. *Imunologia aplicada*. In: Macari, M.; Maiorka, A. (eds). *Fisiologia das aves comerciais*. 1st ed. Funep, Jaboticabal, SP.

Schat, K. A., Kaspers, B., and Kaiser, P. 2014. *Avian Immunology*. 2nd ed. Academic Press, London, AFI.

Seedor, J. G., Quarruccio, H. A., and Thompson, D. D. 1991. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J. Bone Miner Res.* 6:339-346.

Silva, J. H. V., and Pascoal, L. A. F. 2014. Exigências de aminoácidos para aves. In: Sakomura, N. K., da Silva, J. H. V., Costa, F. G. P., Fernandes, J. B. K., Hauschild, L. (eds). *Nutrição de Não Ruminantes*. 1st ed. Funep, Jaboticabal, SP.

Smith, D. P., and Northcutt, J. K. 2003. Induced red discoloration of broiler breast meat: effect of cook temperature and freezing. *Int. J. Poult. Sci.* 3:253-258.

Sung, Y. J., Hotchkiss, J. H., Austic, R. E., Dietert, R. R. 1991. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J. Leukoc. Biol.* 50:49-56.

Suttle, N. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock*. 4 ed. CABI Publishing, Cambridge, MA.

Stabel, J. R., Spears, J. W. 1990. Effect of copper on immune function and disease resistance. In: Kies, C. (Ed.), *Cu Bioavailability and Metabolism*. Plenum Publishing, New York, p. 243–252.

Swiatkiewicz, S., and Koreleski, J. 2008. The effect of zinc and manganese source in the diet of laying hens on eggshell and bones quality. *Vet. Med.* 53:555-563.

Underwood, E. J., and Suttle, N. F. 1999. *The mineral nutrition of livestock*. 3 ed. CABI Publishing, New York, NY.

Upadhaya, S. D., Lee, B. R., and Kim, I. H. 2016. Effects of ionized or chelated water-soluble mineral mixture supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and intestinal microbiota in broilers. *Br. Poult. Sci.* 57:251-256.

Ward, J. D., Spears, J. W., Kegley, E. B. 1996. Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulfate in cattle. *J. Dairy Sci.* 79:127-132.

Weiss, D. J. and Wardrop, J. K. 2010. *Schalm's veterinary hematology*, 6th ed. Blackwell Publishing Ltd:Ames, IA.

Werman, M. J., Barat, E., and Bhathena, S. J. 1995. Gender, dietary copper and carbohydrate source influence cardiac collagen and lysil oxidase in weanling rats. *J. Nutr.* 125:857-863.

Zhao, J., Shirley, R. B., Vazquez-Añon, M., and Dibner, J. J. 2010. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield, and footpad health in commercial meat broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 19:365-372.

Zhao, F. Q., Zhang, Z. W., Wang, C., Zhang, B. Yao, H. D., Li, S., Xu, S. W. 2013. The role of heat shock proteins in inflammatory injury induced by cold stress in chicken hearts. *Cell Stress Chaperon.* 18:773–783.

Zhang, H., Pan, S., Zhang, K., Michiels, J., Zeng, Q., Ding, X., Wang, J., Peng, H., Bai, J., Xuan, Y., Su, Z., Bai, S. 2020. Impact of Dietary Manganese on Intestinal Barrier and Inflammatory Response in Broilers Challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms*, 8:757-777.

Zheng, P., Pu, B., Yu, B., He, J., Yu, J., Mao, X., Luo, Y., Luo, J., Huang, Z., Luo, C., Wang, S., Chen, D. 2018. The differences between copper sulfate and tribasic copper chloride on growth performance, redox status, deposition in tissues of pigs, and excretion in feces. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 31:873-880.

IMPLICAÇÕES

Apesar das fontes inorgânicas de suplementação mineral serem as mais utilizadas na alimentação de frangos de corte ela são menos biodisponível e com isso há aumento do impacto ambiental, já que os minerais nas excretas não são degradáveis.

Sabemos que na produção de frangos há desafios gerados pelo sistema intensivo de criação e isso faz com que haja mudança na exigência nutricional dos animais. A definição de níveis adequados às aves principalmente em momentos de desafio é de extrema importância.

Para contornar esses problemas, a fonte hidroxícloreto surgiu como alternativa já que possui alta biodisponibilidade. Entretanto, por ser uma fonte mais recente produzida, níveis ideais de suplementação mineral devem ser estudados para garantir alta produtividade e manutenção da saúde dos frangos.

No presente estudo, para avaliar a biodisponibilidade das diferentes fontes de suplementação mineral foi adotado o método da absorção mineral aparente do conteúdo ileal das aves, através de um marcador de digestibilidade. Para obtenção de resultados mais precisos, o ideal era utilizar gaiolas metabólicas de plástico ou livres de metais para evitar contaminação mineral das amostras. Devido à ausência dessa estrutura nas instalações, o método de absorção mineral aparente foi empregado.

Na literatura é relatada que a suplementação com valores acima de 125 ppm de cobre tem efeito promotor de crescimento nas aves. Isso acontece principalmente pela ação bactericida do cobre. Entretanto, a ausência de desafios pode diluir esse efeito. No presente estudo, na avaliação do desempenho produtivo não houve desafio sanitário e possivelmente, por esse motivo, só foi encontrado diferença estatística na conversão alimentar (CA). Mesmo assim, níveis elevados de cobre obtiveram melhores valores de CA do que o baixo nível. Apesar da ausência de efeito para ganho de peso dos frangos, foi visível maior rendimento de peito das aves com níveis elevados de cobre.

Para a suplementação de manganês esperava-se que níveis acima da exigência fosse capaz de melhorar a qualidade óssea dos frangos de corte. Entretanto, o nível 80 ppm que é o nível mais próximo do indicado nas tabelas de Rostagno (2017) foi ideal para essa avaliação e demais parâmetros mensurados.

Para o desempenho, o melhor nível de suplementação para os frangos de corte é de 150 ppm de Cobre hidroxícloreto (CuH) com 40 ou 80 ppm de Mn Hidroxícloreto (MnH). Entretanto, avaliando os demais parâmetros (ósseos e de saúde) a recomendação de suplementação mineral para obter melhores resultados é utilizando o nível 150 CuH + 80 ppm MnH.

A fonte hidroxiclreto demonstrou ser mais interessante como fonte de suplementação mineral para frangos de corte. De maneira geral, os mesmos níveis de suplementação mineral da fonte sulfato não foram capazes de trazer benefícios a saúde e características ósseas quando comparado com os mesmos níveis da fonte hidroxiclreto.

A avaliação da microbiota intestinal é uma avaliação interessante para ser utilizada em trabalhos futuros utilizando níveis diferentes fontes e níveis de cobre, já que esse mineral demonstrou ter uma relação na modulação da microbiota intestinal.