

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 Escherichia coli 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.

Além disso, os minerais catiônicos como o manganês, zinco, ferro e cobre podem formar complexos insolúveis com fósforo, ácido fítico e outros componentes da digesta (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Por isso é importante estudar novas fontes de suplementação mineral na alimentação dos animais, para que essas interações negativas sejam reduzidas e os nutrientes sejam realmente absorvidos.

1.1.1 Minerais inorgânicos

As principais fontes de suplementação mineral para frangos de corte são a inorgânica, orgânica e, mais recente, a fonte hidroximineral ou também chamada de hidroxicloreto.

Na forma inorgânica o Cu é encontrado comercialmente de várias formas, as mais comuns são: óxido de cobre (CuO); o carbonato de cobre ($\text{CuCO}_3(\text{OH})_2$); sulfato de cobre monohidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Enquanto isso, o manganês é encontrado principalmente nas formas de sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e óxido de manganês (MnO).

Os sulfatos são considerados como a fonte inorgânica mais comum de suplementação mineral. Mesmo assim, essa fonte é conhecida por não ser suficientemente absorvida pelas aves (UPADHAYA; LEE; KIM, 2016). Isso acontece, principalmente porque os sais inorgânicos dos sulfatos são ligados quimicamente por ligações iônicas e, por serem ligações fracas, são rapidamente dissociados no trato gastrointestinal, tornando-se livres para interagir com antagonistas (WARD; SPEARS; KEGLEY 1996; UPADHAYA; LEE; KIM, 2016). Por esse motivo, tradicionalmente ocorre a suplementação mineral com valores acima da exigência para assegurar que os minerais sejam absorvidos, mas com isso aumenta-se o custo e a poluição ambiental já que os minerais nas excretas não são degradáveis.

Miles et al. (1998), Lu et al. (2010) e M'Sadeq et al. (2018) analisaram a fonte sulfato em relação a fonte hidroxicloreto e concluíram que os hidroxicloretos podem possuir maior biodisponibilidade dos minerais para frangos de corte do que a fonte inorgânica.

1.1.2 Minerais orgânicos

Os minerais orgânicos são compostos formados por meio da ligação química entre um mineral com um carreador orgânico, sendo este composto caracterizado por ter alta estabilidade e biodisponibilidade. Segundo Massuquetto; Maiorka; Macari (2017), as ligações com íons metálicos com uma molécula orgânica acontecem naturalmente no organismo animal, como a ligação do ferro com a hemoglobina ou do cobalto na vitamina B_{12} .

A maioria das fontes orgânicas de suplementação de manganês e cobre estão ligadas a aminoácidos, que possuem maior disponibilidade devido à redução das formações de complexos com

o fitato, cálcio, fósforo ou fibra durante o processo de digestão (BROOKS et al., 2012; TUFARELLI e LAUDADIO, 2017) por utilizarem vias das moléculas orgânicas para absorção os minerais não competem com sítios de ligações com os demais minerais (MASSUQUETTO; MAIORKA; MACARI, 2017). Alguns exemplos de minerais orgânicos são o Cu-lisina e Cu-metionina.

Brooks et al. (2012) verificaram que a fonte orgânica de manganês possui maior biodisponibilidade do que a fonte inorgânica quando há aumento de cálcio e fósforo na ração, confirmando a presença de interações indesejáveis dos minerais inorgânicos com nutrientes da dieta. Porém, o aumento da biodisponibilidade dos minerais orgânicos pode gerar controvérsias na literatura (RUTZ, 2005; LI et al., 2008, YILDIZ; CUFADAR; OLGUN, 2011) além de ser fonte de alto custo para ser produzida e, conseqüentemente, comercializada.

1.1.3 Hidroxicloreto

Os hidroxicloreto surgiram na década de 90 como fonte alternativa de suplementação mineral e são conhecidos pela maior força de ligação química (COHEN; STEWARD, 2012). Essa fonte é produzida por meio da reação do mineral desejado de alta pureza com água e ácido clorídrico e, nesse processo, formam-se cristais de hidroxicloreto que contêm o mineral ligado covalentemente ao grupo hidroxila e ao cloreto (CEMIN et al., 2017). Sua estrutura tridimensional cristalina, possui maior estabilidade no trato gastrointestinal, além de lenta liberação nas seções posteriores do intestino onde ocorre a maioria dos desafios com patógenos (COHEN; STEWARD, 2012).

As ligações covalentes dos hidroxicloreto são mais fortes que as ligações iônicas dos sulfatos (Figura 1), por isso, melhoram a estabilidade dos componentes das rações e a biodisponibilidade dos minerais. Desta forma, essa fonte de suplementação mineral pode oferecer vantagens como a redução do custo de fabricação e do impacto ambiental devido a menor excreção dos minerais não absorvidos pelas aves (COHEN; STEWARD, 2012). Além disso, não proporciona a oxidação em suplementos minerais ou rações e apresentam menor reatividade comparando-se aos minerais orgânicos, mantendo as ações de enzimas comerciais exógenas preservando assim a lucratividade do produtor (COHEN; STEWARD, 2012).

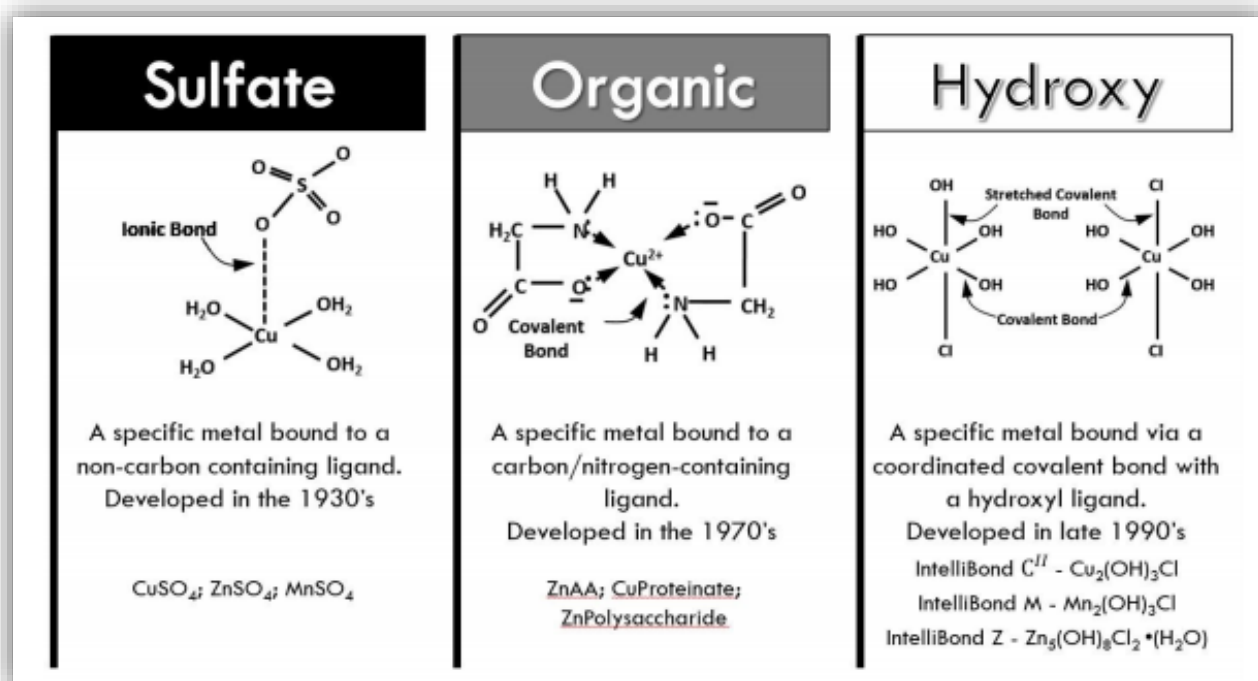


Figura 1 Ligações químicas das fontes de suplementação mineral.

Fonte: Adaptado de Kvidera (2019).

Miles et al. (1998) e Lu et al. (2010) verificaram que os hidroxicloretos foram menos reativos na ração e mais biodisponíveis do que outras formas inorgânicas. Nesse sentido, Olukosi; Kuijk; Han (2018) ao avaliarem o efeito da suplementação da ração com hidroxiclreto de cobre e zinco em comparação com a fonte sulfato para frangos de corte, determinaram maior concentração de Cu no fígado das aves que receberam a fonte hidroxiclreto. Luo et al. (2005) também determinaram maior deposição de cobre hepático nos frangos que foram alimentados com rações suplementadas com hidroxiclreto do que com sulfato. Perez et al. (2017) verificaram que, quando aumentou o teor de zinco e manganês de fonte hidroximineral, aumentou a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase no fígado de frangos de corte desafiados com lipopolissacarídeos, em comparação aos animais que receberam minerais de fonte inorgânica.

Nguyen et al. (2020) determinaram que a fonte hidroxiclreto proporcionou melhor desempenho em frangos de corte quando comparado com a fonte sulfato.

1.2 Cobre na avicultura

O cobre (Cu) é um microelemento de número atômico 29 e peso atômico de 63,5. Esse elemento é encontrado quase que exclusivamente nos estados de valência +2 e + 1, com predomínio de +2. Quando o Cu está em meio aquoso e em pH neutro formam-se hidróxidos que se precipitam na solução, a menos que estejam quelatados com moléculas orgânicas (LINDER, 1996).

Por volta de 1928, observou-se a importância desse mineral na nutrição animal e, depois disso, várias doenças foram associadas à sua deficiência, como anemia, redução da pigmentação das penas e fragilidade óssea. A atuação desse elemento está envolvida a outros elementos da dieta como o molibdênio, o manganês, o zinco, o ferro, as proteínas e outros microelementos (CARLTON; HENDERSON, 1962).

1.2.1 Absorção do cobre nas aves

O cobre possui dois mecanismos de absorção, conforme a sua concentração na dieta. Baixas concentrações de Cu na dieta favorecem a absorção por transporte ativo, estabelecido por ATPases. Elevadas concentrações de Cu favorecem a absorção por difusão simples pela presença de um transportador de alta afinidade CTR1 na membrana basolateral dos enterócitos (MAIORKA; MACARI, 2002; SUTTLE, 2010; DÍAZ et al., 2015).

Há evidências de que a absorção intestinal de Cu é regulada pela necessidade do organismo e que a metalotioneína nas células epiteliais do intestino pode desempenhar papel fundamental nessa regulação (LINDER, 1996). Ao se ligar a metalotioneína, o Cu é impedido de ser transferido para serosa (McDOWELL, 2003). Por esse motivo, altas concentrações de metalotioneína no intestino oferecem proteção contra sobrecarga acidental de Cu e, portanto, protegem o organismo contra a toxicidade de Cu.

Depois de absorvido pelas células da mucosa intestinal, o Cu se liga a metalotioneína, proteína produzida pelos próprios enterócitos, que regula a absorção do cobre (DÍAZ et al., 2015). O metal é então transportado pela proteína transcupreína ou pela albumina através da circulação porta hepática até o fígado (DELGADINHO, 2014). Ao atingir esse órgão o cobre será transportado para o complexo de Golgi pela ATPase para ser ligado a ceruloplasmina (ROSA e MATTIOLI, 2002). A ceruloplasmina é uma globulina que retém 6 a 8 moléculas de cobre na sua estrutura e é responsável pelo transporte do cobre no sangue até órgãos-alvo (LINDER, 1996; UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Ainda no fígado, o cobre liga-se à metalotioneína e depois à glutatona e o Cu será particionado entre a secreção biliar, o armazenamento e a ligação com a superóxido dismutase (SUTTLE, 2010) (FIGURA 2).

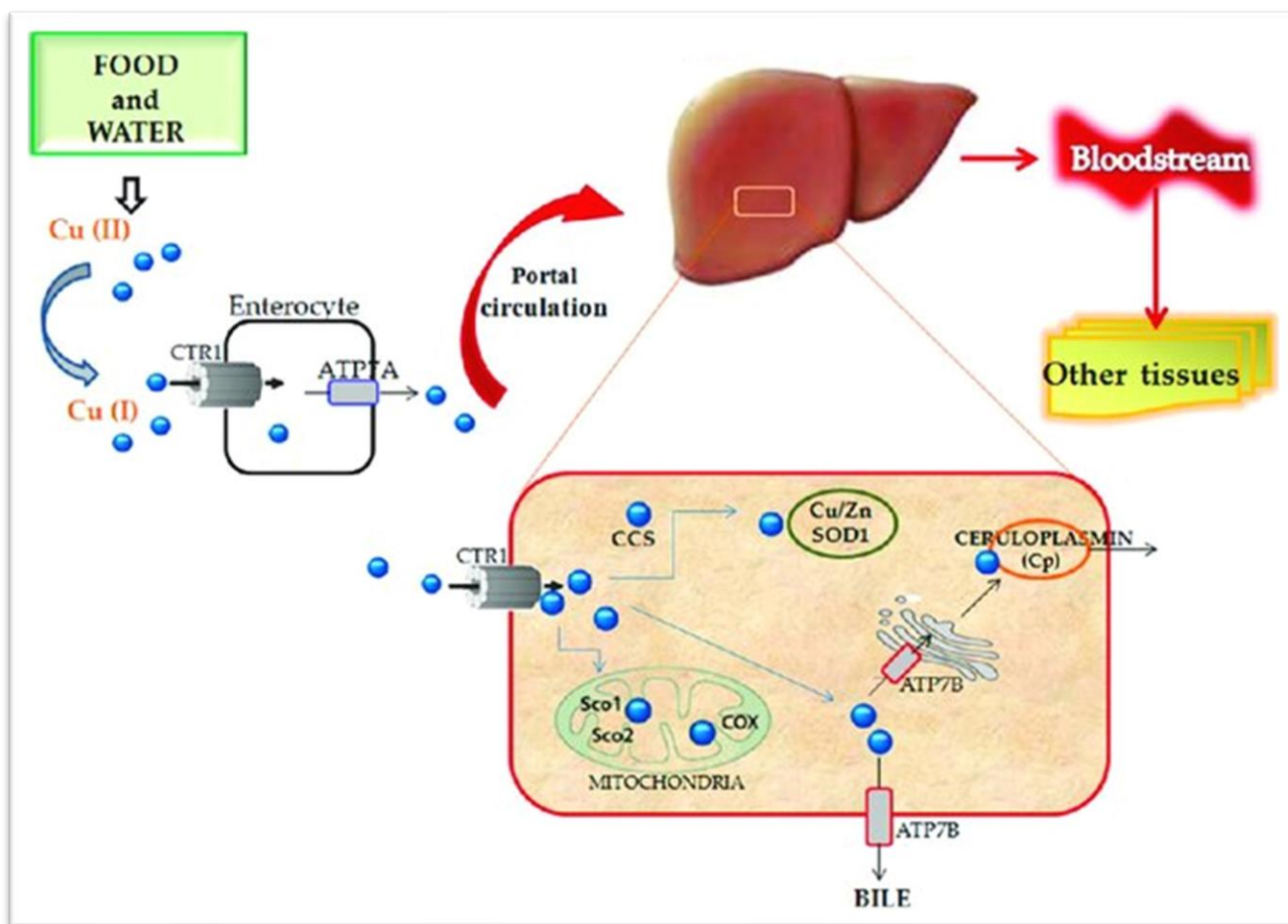


Figura 2 Absorção, distribuição e metabolismo do cobre. O cobre entra nos enterócitos através do transportador CTR1 e flui na circulação portal pelo ATP7A. No fígado, o Cu tem papel fundamental na defesa contra ROS (liga-se à SOD) e na respiração mitocondrial. Ligado a CP, o cobre levado na corrente sanguínea para ser transportado para outros tecidos e órgãos. ATP7B garante o transporte de cobre através das membranas das organelas celulares ou permite que o cobre em excesso seja excretado na bile. CTR1= Proteína transportadora de cobre; CCS= Chaperona de cobre para superóxido dismutase (do inglês, “copper chaperone of superoxide dismutase”); COX= Citocromo-C oxidase; Sco1, Sco2= Componentes citocromo-C oxidase; Cu/Zn SOD= enzima superóxido dismutase dependente de Cobre/Zinco; ATP7A/B= ATPase transportador de cobre. Fonte: ANTONUCCI et al. (2017).

Apesar da absorção do cobre ocorrer em todo o trato gastrointestinal, o intestino delgado destaca-se como sendo o principal sítio de absorção (McDOWELL, 2003). O cobre, quando não absorvido, é liberado no intestino por meio da bile, possibilitando breve reabsorção seguida da excreção do restante nas excretas (DELGADINHO, 2014).

1.2.2 Cobre: desempenho e desenvolvimento ósseo

Sabe-se que a suplementação entre 125 e 250 mg Cu.kg⁻¹ pode resultar em melhor ganho de peso (PAIK et al., 1999; MORAIS et al., 2001). Isso ocorre pois, além de sua participação na fase inicial do desenvolvimento ósseo, o metabolismo do cobre afeta as células T e B, neutrófilos e macrófagos (McDOWELL, 2003). Além disso, o Cu possui efeito melhorador de crescimento visto seu efeito bacteriostático favorecendo os microrganismos benéficos do trato gastrointestinal dos animais (PESTI e BAKALLI, 1996).

O cobre é o principal cofator da lisil-oxidase, enzima importante na formação das subunidades de colágeno e elastina (RUCKER et al., 1998). A lisil-oxidase atua na formação das ligações cruzadas de colágeno e elastina ao adicionar um grupo hidroxila aos resíduos de lisina, conferindo rigidez e elasticidade das proteínas do tecido conjuntivo (RUCKER et al., 1998; RICHARDS et al., 2010). Essa enzima é encontrada principalmente no tecido conjuntivo do sistema cardiovascular, intestinos, pele e em outros tecidos que mudam de tamanho como consequência do preenchimento (RICHARDS et al., 2010). Dessa forma, indiretamente o cobre promove a resistência da pele, ossos, tendões e intestinos. Altos níveis do cobre estão associados com a maior ativação e ação desta enzima e por isso, conferem maior elasticidade aos tecidos (WERMAN; BARAT; BHATHENA, 1995; ZHAO et al., 2010). Segundo Richards et al. (2010) e Zhao et al. (2010), houve redução da incidência de lesões nas patas de frangos de corte quando foram utilizados maiores valores de Zn e Cu, pois esses minerais desempenham papel fundamental na remodelação tecidual, tanto fisiológica como patológica.

1.2.3 Funções do cobre no sistema imunológico e antioxidante

O cobre afeta a produção de células T e B (McDOWELL, 2003). Segundo Harris (1997), com a deficiência de cobre há diminuição dos níveis de linfócitos T e B. Além disso, o cobre é componente estrutural da enzima monoamina oxidase e além da degradação de monoaminas essa enzima atua como sinalizador celular para a migração de leucócitos do sangue para o local alvo (SUTTLE, 2010).

O cobre possui funções antioxidantes por ser componente da enzima superóxido dismutase (SOD) que está presente em duas diferentes formas no organismo animal, a primeira dependente de cobre e zinco e a segunda dependente de manganês (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). A SOD é uma defesa de primeira linha do sistema antioxidante já que converte os radicais de oxigênio em peróxido de hidrogênio, molécula menos tóxica e que é convertida em água através da ação da glutathione peroxidase, enzima dependente do selênio (RICHARDS et al., 2010). Por isso, a relação do cobre com o sistema imunológico também ocorre por meio da superóxido dismutase, que age na remoção de radicais livres gerados durante o *burst* respiratório. Em resposta a fagocitose de microrganismos

patogênicos, os heterófilos e macrófagos realizam a explosão respiratória (*Burst* respiratório), que aumenta o consumo de O_2 , com geração de NADPH e espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que agem como substâncias antimicrobianas (SCHAT; KASPERS; KAISER, 2014).

1.2.4 Outras funções do cobre no metabolismo das aves

O cobre é essencial para diversas funções relacionadas à saúde e ao desempenho das aves, dentre as quais se destacam as funções de componente estrutural de macromoléculas e cofator comum para várias oxidases e monooxidases (cuproenzimas) essenciais (KANEKO et al., 2008). São mais de 14 enzimas contendo o Cu e esse micromineral somente é superado pelo Zn no número de enzimas que ativa (LINDER, 1996).

O cobre age no metabolismo lipídico, sendo que alta concentração sérica de cobre pode diminuir o teor plasmático de colesterol e triglicerídeos (BAKALLI et al., 1995; PESTI e BAKALLI, 1996).

No ciclo de Krebs, o cobre desempenha papel de cofator da citocromo-C oxidase (complexo IV) que é a última proteína da cadeia respiratória e responsável pela transferência de elétrons, gerando energia para todos os tecidos (SUTTLE, 2010).

Sabe-se, que cerca de 90% do Cu está ligado a ceruloplasmina, sendo essa globulina capaz de reter seis moléculas de cobre na sua estrutura (LINDER, 1996; UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). A ceruloplasmina oxida o íon ferroso (Fe^{2+}) em íon férrico (Fe^{3+}), assim o ferro consegue se ligar à transferrina, para ser transportado no sangue (DÍAZ et al., 2015). Como grande parte do Fe no organismo está associado à hemoglobina (Hb), a fagocitose de hemácias senescentes é importante forma de reciclar o Fe no organismo. Essa reciclagem é feita pelos macrófagos das aves, principalmente no baço, mas também na medula óssea que identificam modificações bioquímicas e anatômicas na membrana citoplasmática das hemácias. Os macrófagos fagocitam as hemácias senescentes liberando a hemoglobina e o ferro para reaproveitamento. O Fe^{2+} pode ser estocado no próprio macrófago como ferritina ou ser oxidado pela ceruloplasmina em íon Fe^{3+} para poder ser transportado pela transferrina até os locais onde será reutilizado (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Outro fato importante é que a deficiência de ceruloplasmina é acompanhada pelo acúmulo de ferro no fígado (SUTTLE, 2010).

1.2.5 Toxidez e deficiência de cobre nas aves

Quando há desequilíbrio no fluxo de cobre no corpo, pode-se ocorrer um acúmulo de Cu no fígado e, posteriormente, liberação no sistema sanguíneo por incapacidade de armazenamento (DÍAZ et al., 2015). Esse excesso pode acarretar em intoxicação aguda, caracterizada por gastroenterite severa, crise hemolítica e morte. Em casos crônicos há acúmulo de Cu nos tecidos seguido de necrose hepática, crise hemolítica e posterior morte súbita (SUTTLE, 2010). O fígado é considerado o órgão alvo do cobre que, quando em excesso, acumula-se principalmente nos lisossomos e no citoplasma dos hepatócitos (YANG et al., 2017). Segundo esses autores, altos níveis de cobre na dieta, principalmente acima de 220 ppm, podem gerar defeito específico no complexo IV das mitocôndrias hepáticas e, assim, prejudicar a função mitocondrial das células do fígado dos frangos de corte.

Quando a dieta é deficiente em Cu, estudos indicam que três proteínas são as mais afetadas imediatamente: a ceruloplasmina, a superóxido dismutase citosólica e a citocromo C oxidase (LINDER, 1996). Por isso, quando em deficiência, pode ocasionar perda de apetite, anemia, diarreia, hemorragia, distúrbios ósseos, falhas na reticulação do colágeno, falhas reprodutivas, distúrbios nervosos, distúrbios cardiovasculares e óbito (GATTÁS; BARBOSA, 2004).

1.3 Manganês na avicultura

O número atômico do Mn é 25 e seu peso atômico é 54,938. É o décimo segundo elemento mais abundante, constituindo 0,10% da crosta terrestre. Em propriedades químicas, seus dois estados de valência mais importantes em sistemas biológicos são +2 e +3. No entanto, o Mn pode existir em estados de oxidação II de -3 a +7 (McDOWELL, 2003). A maior parte do Mn no organismo animal é encontrado nas mitocôndrias das células e desde 1930 mostrou ser importante para o crescimento e a fertilidade dos animais em estudos com ratos (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). A importância do manganês na nutrição e alimentação de aves ocorre devido a sua função no desenvolvimento dos ossos e da casca dos ovos, por ser cofator de metaloenzimas e por atuar no metabolismo dos nutrientes (TUFARELLI e LAUDADIO, 2017). Esse mineral está presente em todos os tecidos, contudo nos ossos, fígado, pâncreas e na hipófise apresenta-se em maior concentração (COSTA et al., 2014).

1.3.1 Absorção do manganês nas aves

A literatura demonstra que o manganês é absorvido no estado de valência +2 e compete pelos locais de absorção no intestino delgado principalmente com o iodo e cobalto, por também serem minerais bivalentes (GALÁN; DRAGO, 2014). Segundo McDowell (2003), a absorção do manganês ocorre em um processo de duas etapas, primeiramente a captação no lúmen do intestino delgado, sendo

o Mn absorvido pelo transportador apical não específico DMT1 e, em seguida, transferência através das células da mucosa para circulação via porta hepática para atingir o fígado. O mesmo autor relata que quando a concentração dietética do manganês é alta há redução da absorção e em quantidades dietéticas baixas a absorção aumenta. Quando as aves são jovens a absorção ocorre em maior quantidade no íleo (TUFARELLI; LAUDADIO, 2017).

Após chegar no fígado o Mn pode permanecer livre ou ligar-se α_2 -macroglobulina para ser removido ou entrar na circulação sistêmica quando irá se ligar à transferrina (McDOWELL, 2003). A transferrina é a principal proteína carreadora do Mn no plasma (DAVIDSSON et al., 1989). Por esse motivo, além do manganês e do ferro serem transportados no plasma pela transferrina eles também competem pelo mesmo transportador (DMT1), sendo assim, o ferro pode interferir na absorção do Mn (SUTTLE, 2010).

1.3.2 Atividades enzimáticas do manganês

Como outros micronutrientes essenciais, o Mn pode funcionar como ativador enzimático ou como componente de metaloenzimas. As metaloenzimas contendo manganês incluem a arginase, glutamina sintetase, a piruvato carboxilase, e manganês-superóxido dismutase (McDOWELL, 2003; TUFARELLI e LAUDADIO, 2017). A arginase faz a conversão do aminoácido arginina para ureia e ornitina. A glutamina sintetase catalisa a condensação do glutamato amônia para formar glutamina. Enquanto isso, a piruvato carboxilase é uma das metaloenzimas mais conhecidas pela relação com o Mn, a qual catalisa a formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO_2 , com gasto de ATP (SCRUTTON; UTTER; MILDVAN, 1966).

Apesar do número de metaloenzimas composta pelo Mn ser limitado, as enzimas que podem ser ativadas por esse mineral são numerosas, tais como as liases, oxirredutases, transferases, isomerases e hidrolases (McDOWELL, 2003).

O Mn participa de vários sistemas tendo a ativação do ciclo de Krebs com umas das principais funções devido sua ação com a piruvato carboxilase (COSTA et al., 2014). O manganês também está envolvido na formação da protrombina, glicoproteína formada pela ação das glicosiltransferases que depende do Mn (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Assim, juntamente com a vitamina K, auxiliam na hemostasia e coagulação do sangue (TUFARELLI e LAUDADIO, 2017).

1.3.3 Manganês: desempenho e desenvolvimento ósseo

No processo de desenvolvimento ósseo é necessário a síntese de mucopolissacarídeos para a formação da cartilagem óssea, assim como da proteoglicana que é a matriz orgânica óssea onde o

colágeno e a elastina se acoplam para a formação óssea. Para ocorrer a glicosilação de sua molécula principal de proteína é necessário a presença do Mn (RICHARDS et al., 2010). Segundo Hurley e Keen (1989), o Mn é cofator para a ativação de enzimas glicosiltransferases, em especial a galactosiltransferase, enzima necessária para a síntese de mucopolissacarídeos que irão atuar na formação da matriz cartilaginosa dos ossos. Por isso, a deficiência de Mn nas aves pode resultar em achatamento tíbio-tarsal com saída do tendão do calcâneo do seu lugar anatômico, sendo essa condição denominada de perose (SUTTLE, 2010; COSTA et al., 2014).

Além disso, a diminuição da densidade óssea devido a mineralização deficiente, associada a frangos de corte com rápida taxa de crescimento também são fatores que favorecem o aparecimento de anomalias com a síndrome do osso negro e degeneração femoral (KORVER, 2010).

A alteração dos mucopolissacarídeos dos ossos que determinam a perose nos frangos é atribuída principalmente à deficiência de manganês (HURLEY; KEEN, 1989). Segundo Liu et al. (1994), frangos de corte privados de manganês têm menos proteoglicanos na cartilagem da placa de crescimento tibial do que aves que receberam ração suplementada com Mn.

1.3.4 Funções do manganês no sistema imunológico e antioxidante

Devido sua interação com a enzima SOD, o Mn pode influenciar positivamente nos mecanismos de defesa contra radicais livres dentro das mitocôndrias, podendo promover aumento no prazo de validade da carne, devido ao seu alto potencial antioxidante (Li et al., 2011). A própria respiração celular do organismo produz radicais livres ($O_2\bullet^-$) e a SOD2 (enzima ligada ao manganês) é importante para auxiliar na eliminação desses agentes nocivos dentro na matriz das mitocôndrias (Figura 3).

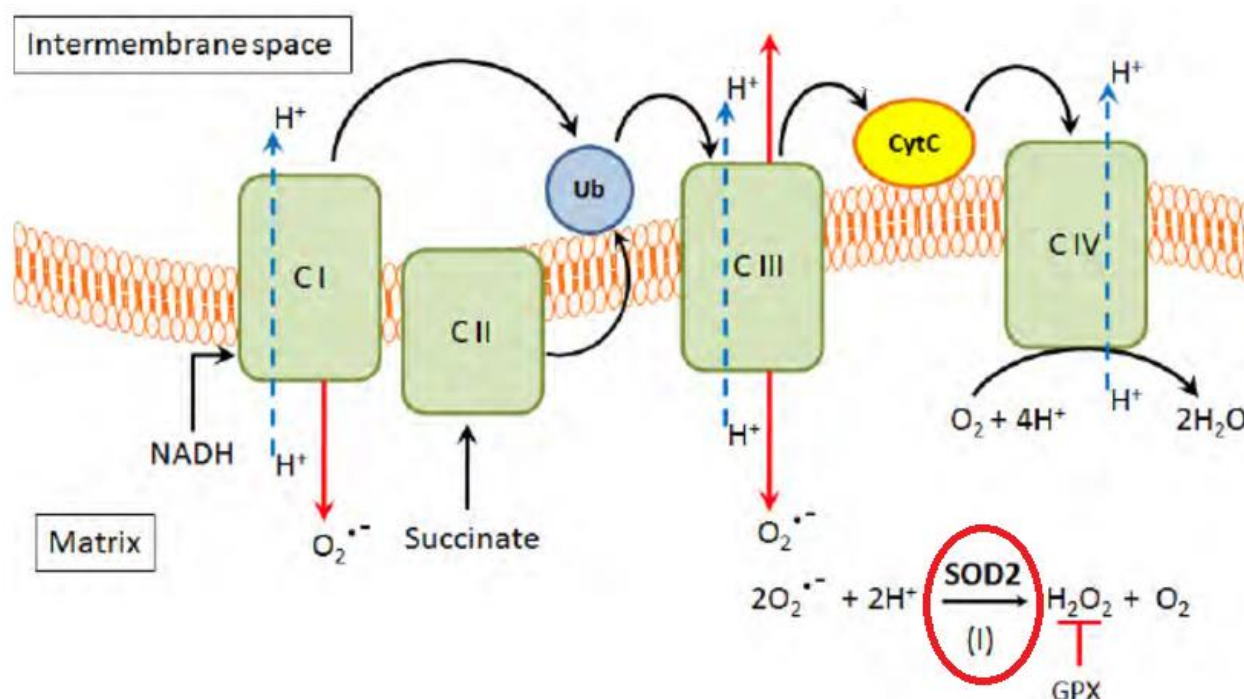


Figura 3 Produção mitocondrial e depuração do ânion superóxido pela SOD2 (SOD-Mn).

Fonte: Adaptado de Koistinaho; Goldsteins (2012).

Zhang et al. (2020) trabalharam com níveis de suplementação de Mn deficientes, adequados e acima da exigência recomendada pelo NRC (1994) para frangos desafiados com *Salmonella*. Os autores observaram que a suplementação dietética de Mn com níveis recomendados ou acima melhorou a resposta imunológica, pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio, a atividade da SOD, o nível de mRNA de NF-κB (factor nuclear kappa B) e pela integridade da barreira intestinal demonstrando sua importância na saúde dos frangos.

Entretanto, quando em excesso, o Mn é excretado via suco biliar e pancreático, também podendo ser armazenado no interior das mitocôndrias. Esse sequestro de Mn, quando em níveis elevados, interfere na respiração celular e causa a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TUFARELLI e LAUDADIO, 2017). Por isso, é necessário equilíbrio para favorecer positivamente as aves.

A metaloenzima arginase dependente de manganês converte a arginina (Arg) em ornitina e ureia. Enquanto isso, a enzima óxido nítrico sintetase (NOS) oxida a Arg para formar óxido nítrico (NO) e citrulina. Dessa forma, há competição entre a arginase e a NOS, pois o substrato de ambas é comum, Arg. Sendo assim, a degradação, excessiva da Arg, em ornitina e ureia, pode comprometer a síntese de NO e como o manganês está relacionado com a ativação da arginase, o nível de Mn pode ser fator limitante na produção do NO (PRABHAKAR et al., 1997).

O óxido nítrico é um gás com potencial vasodilatador, produzido naturalmente pelo organismo. Seu envolvimento na resposta inflamatória é relatado pela sua capacidade em aumentar a permeabilidade vascular e aumentar a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (SALVEMINI et al., 1996).

1.3.5 Toxidez e deficiência do manganês nas aves

Quando há excesso de manganês, ocorre sequestro do mineral para dentro da mitocôndria em níveis acima do normal e isso interfere na respiração celular ocorrendo a liberação de radicais livres (TUFARELLI e LAUDADIO, 2017).

Como já citado, o Mn é importante para a síntese de mucopolissacarídeos e sua deficiência nas aves pode resultar em perose, produção de ovos anormais com má formação da casca (SUTTLE, 2010).

Frangos de corte, quando alimentados com dietas que apresentam baixos níveis de Mn, têm apresentado grande incidência de problemas no desenvolvimento ósseo, como por exemplo a perose e a condrodistrofia (RICHARDS et al., 2010; BROOKS et al., 2012; LEESON; SUMMERS, 2008; SINGH; GHOSH; HALDAR, 2015). Além disso são relatadas diminuição da fertilidade, tolerância atípica à glicose e problemas no metabolismo de carboidratos e lipídios. Em aves de postura, pode-se acrescentar ainda, redução da eclodibilidade e da produção dos ovos, afinamento e aparecimento de áreas translúcidas na casca e anomalias em sua estrutura (BROOKS et al., 2012; TUFARELLI; LAUDADIO, 2017).

1.4 Interações entre os minerais

Muitos fatores são capazes de interferir com a absorção de microminerais. A absorção de minerais bivalentes é influenciada pela competição ou interação desses íons, incluindo Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, entre outros, no trato gastrointestinal (COZZOLINO et al., 1997). Segundo Couzy et al. (1993) há dois tipos principais de interações dos microminerais: a interação direta, quando estes minerais competem pelo mesmo sítio de absorção e o excesso de um prejudicará o outro e a interação indireta, quando o mineral depende de outro para ser transformado para sua forma ativa e ser absorvido (COUZY et al., 1993). Quando os minerais possuem propriedades semelhantes além da interação no lúmen intestinal pode haver interações dentro dos enterócitos na absorção ou no transporte pelo sangue para os tecidos (COZZOLINO et al., 1997). Também há reações sinérgicas entre os minerais, em que dois minerais cumprem a mesma função no organismo, a exemplo disso, pode-se citar o Cu e o Fe na formação da hemoglobina, ou do Mn com o Zn na formação do DNA (SILVA; PASCOAL, 2014).

O cobre e o manganês são íons com carga semelhantes, por isso, na absorção passiva sofrem reações antagônicas por competirem por sítios semelhantes de absorção (SILVA; PASCOAL, 2014). Apesar disso, essa competição antagônica do cobre com o manganês não é tão expressiva quanto a interação do Cu com o P, Zn, Fe e Mo ou do Mn com o Fe, Ca, P, Mg (SILVA; PASCOAL, 2014). Na Figura 4 estão representadas as principais inter-relações antagônicas entre os minerais.

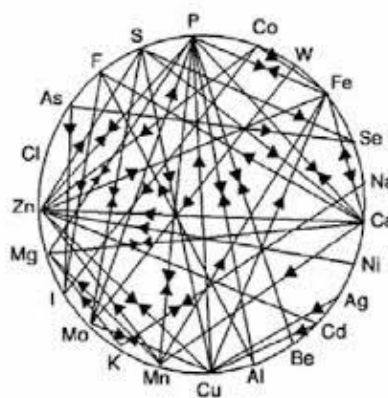


Figura 4 Representação das relações antagônicas entre os minerais.

Fonte: Ashmead; Zunino (1993).

1.5 Expressão de genes relacionados à saúde de frangos de corte

A expressão de um gene é a síntese de uma molécula de mRNA (RNA mensageiro), a partir de uma sequência de bases no DNA, até à síntese de uma proteína. Quando a informação contida na sequência no DNA é utilizada para sintetizar uma molécula de mRNA, esse processo é denominado de transcrição. Após isso, a mensagem contida no mRNA será utilizada na síntese de proteínas, por um processo denominado de tradução.

1.5.1 Transcrição e tradução

A transcrição se inicia com a síntese de RNA mensageiro (mRNA) pela enzima RNA polimerase. A RNA polimerase se liga aos promotores e iniciadores e copia a sequência do DNA, utilizando como molde uma de suas fitas. A replicação ocorre em ambos os lados e em uma das fitas, a replicação é descontínua (GRIFFITHS et al., 2006; RIBEIRO, 2009).

Na tradução a informação contida na sequência de nucleotídeos do mRNA é traduzida em sequência de aminoácidos. O mRNA sintetizado se liga na subunidade menor dos ribossomos. Essa pequena subunidade do ribossomo migra pela fita de mRNA até encontrar o códon de iniciação (AUG) (GRIFFITHS et al., 2006). Nesse momento o fator de iniciação IF2 é ativado e conduz o primeiro tRNA (RNA transportador). Esse primeiro tRNA possui o aminoácido N-formilmetionina, uma

modificação da metionina que bloqueia o grupo amino e, desta forma, a ligação peptídica só pode ocorrer em direção ao grupo carboxil (GRIFFITHS et al., 2006; RIBEIRO, 2009).

São utilizadas sequências de três nucleotídeos para codificar cada aminoácido, sendo possível a partir dos quatro nucleotídeos 64 combinações diferentes. As trincas contidas no RNAm são denominadas de códons e são utilizados 20 aminoácidos para síntese de proteínas. Como citado, há um códon específico para o início da síntese, que codifica a metionina, e três códons que não codificam nenhum aminoácido que sinaliza o término da tradução. As trincas específicas contidas no tRNA são denominados anticódons. Enquanto isso, o RNA ribossômico (rRNA) é o responsável por transportar os aminoácidos que serão utilizados na formação das proteínas até os ribossomos (GRIFFITHS et al., 2006; RIBEIRO, 2009).

1.5.2 Influência da nutrição na expressão gênica

Os nutrientes na dieta podem afetar a expressão dos genes (estimulando ou inibindo), e inúmeros estudos envolvendo animais têm demonstrado que micronutrientes, como os micronutrientes, são capazes de regular a expressão gênica de muitas formas.

A exemplo disso, a expressão gênica da SOD 1, presente no citoplasma e da SOD 3, presente no líquido extracelular são avaliadas nos casos de estudos com os minerais cobre e zinco, já que essas enzimas possuem esses minerais na sua constituição. Enquanto isso, a SOD 2 encontra-se no interior das mitocôndrias e é dependente do manganês (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Por conta da reação de dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, realizado pela superóxido dismutase, essa enzima importante na defesa antioxidante das células.

Estudo avaliando a expressão do gene SOD 2 em frangos determinou que com o aumento da suplementação de Mn há aumento da expressão relativa desse gene em células cardíacas dos frangos de corte (LI et al., 2004), mostrando ser um parâmetro interessante para avaliar a saúde de frangos.

Como critério para ensaios de biodisponibilidade para frangos de corte, utilizando diferentes fontes e níveis de manganês, a avaliação da expressão gênica da SOD 2 é considerada mais sensível do que a mensuração da atividade dessa mesma enzima (LI et al., 2004). Sendo assim, o nível de expressão de mRNA é considerado indicador mais adequado e confiável do que a atividade de MnSOD (LU et al., 2016).

A mensuração da expressão relativa do gene óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) também é realizada nos frangos de corte devido sua importante ação no sistema imune. A iNOS é ativada em macrófagos para produzir grande quantidade de óxido nítrico (NO), um dos principais mediadores de

respostas inflamatórias. A iNOS degrada NAD e L-Arg para produzir o NO e L-citrulina (ALDERTON et al., 2001).

Goel et al. (2013) verificaram resposta imunológica superior em pintainhos que foram submetidos à nutrição *in ovo* com cobre, sendo observado maior expressão relativa dos genes IL-12 e iNOS. Dessa forma, a expressão gênica é uma ferramenta importante na nutrição animal para mensurar repostas frente a diferentes nutrientes suplementados.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

As fontes inorgânicas possuem baixa biodisponibilidade para as aves e por isso, tradicionalmente ocorre a suplementação acima da exigência aumentando o custo e a poluição ambiental. Além do mais, as fontes inorgânicas tendem a se esgotar, já que são fontes não renováveis e, portanto, é de suma importância estudar novos conceitos e fontes de suplementação mineral. Os hidroxicloretos surgiram como alternativa aos problemas relacionados com a fonte inorgânica, já que esta fonte possui alta biodisponibilidade. Nesse contexto, ainda não há estudos publicados da associação do hidroxicloreto de Cu com o hidroxicloreto de Mn no desempenho produtivo, características de carcaça e da carne ou nas repostas relacionadas a saúde de frangos de corte. Assim, justifica-se a elaboração desta pesquisa para testar a suplementação com hidroximineral de cobre e manganês em relação a fonte inorgânica na ração de frangos de corte, sobre as características de carcaça, ossos, carne, órgãos além do desempenho, parâmetros imunológicos e antioxidantes.

2.1 Objetivo geral

Objetivou-se testar o efeito da fonte hidroxicloreto em comparação à fonte sulfato com diferentes níveis de cobre e manganês nas dietas para frangos de corte.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o desempenho produtivo: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e peso final; rendimento de carcaça e de cortes; qualidade óssea: índice de Seedor, densitometria óssea, teor de cinzas, matéria seca; qualidade de carne: pH, cor, capacidade de retenção de água, força de cisalhamento e perda de água pós cocção; parâmetros hematológicos e imunológicos: burst respiratório, contagem diferencial de leucócitos, atividade da enzima superóxido dismutase, expressão gênica dos genes óxido nítrico sintetase induzível e superóxido dismutase 2; concentração de minerais no fígado, plasma e nos ossos; absorção mineral aparente ileal de Cu e Mn; resistência de pele e

incidência de pododermatite; qualidade da cama de frangos de corte submetidos a suplementação com duas fontes e diferentes níveis de cobre e manganês.

REFERÊNCIAS

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, p. 593–615, 2001.

ASHMEAD, H.D.; ZUNINO, H. Factors which affect the intestinal absorption of minerals. In: ASHMEAD, H.D. **The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition**. New Jersey: Noyes Publications; p. 21-46. 1993.

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). **Estatística da produção de frangos de corte. Boletim Estatístico**, 2020. Disponível em: <[http:// http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial](http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial)> Acesso em: 10 de set. de 2020.

BAKALLI, R.I.; PESTI, G.M.; RAGLAND, W.L.; KONJUFCA, V. Dietary copper in excess of nutritional requirement reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. **Poultry Science**, v.74, p.360-365, 1995.

BROOKS, M.A.; GRIMES, J.L.; LLOYD, K.E.; VALDEZ, F.; SPEARS, J.W. Relative bioavailability in chicks of manganese from manganese propionate. **Journal of Applied Poultry Research**, v.21, p.126-130, 2012.

CARLTON, W.W.; HENDERSON, W. Histopathological lesions observed in the long bones of chickens fed a copper-deficient diet. **Poultry Science**, v.41, p. 1634, 1962.

CEMIN, H.S.; WOODWORTH, J.C.; TOKACH, M.D.; DRITZ, S.S.; DEROUCHÉY, J.M.; GOODBAND, R.D. Effect of zinc oxide, zinc hydroxychloride, and tri-basic copper chloride on nursery pig performance. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, v.3, n.7, p.1-9, 2017.

Cobb Vantress. **Suplemento de nutrição e desempenho do frango de corte**, 2018. Disponível em: <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/99b0cf062c/61bd2490-56d1-11e9-bfbd-7963ec6b06e5.pdf>>. Acesso em: 26 de out. de 2020.

COHEN, J.; STEWARD, F.A. **Hidroxy Minerals - The Newest Development in Mineral Nutrition** 2012. Disponível em: <<http://www.feedinfo.com/console/PageViewer.aspx?page=3090428>>. Acesso em: 25 nov. de 2018.

COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.; GOULART, C.C.; NOGUEIRA, E.T.; SÁ, L.M. Exigências de aminoácidos para aves. In: SAKOMURA, N. K., da SILVA, J. H. V., COSTA, F. G. P., FERNANDES, J. B. K., HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, p.240-261, 2014.

COUZY, F.; KEEN, C.; GERSHWIN, M.E.; MARESCHI, J.P. Nutritional implications of the interactions between minerals. **Progress in Food and Nutrition Science**, v.17, p.65-87, 1993.

COZZOLINO, S.M.F. Mineral bioavailability. **Revista de nutrição**. v. 10, p. 87-98, 1997.

DAVIDSSON, L.; LONNERDAL, B.; SANDSTROM, B.; KUNZ, C.; KEEN, C.L. Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat. **Journal of Nutrition**. v.119, p.1461-1464, 1989.

DELGADINHO, M.J.C. **Distúrbios do metabolismo do cobre, ferro e zinco**. Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2014.

DÍAZ, T.G.; TEODORO, A.L.; ROJAS, I.C.O.; CHITIVA, A.F.P.; GUZMAN, J.A.P. Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão. **PubVet**, v.9, p.279-286, 2015.

GALÁN, M.G.; DRAGO, S.R. Food matrix and cooking process affect mineral bioaccessibility of enteral nutrition formulas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p.515-521, 2014.

GATTÁS, G.; BARBOSA, F.F. Cobre na nutrição de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n. 3, p. 117 -133, 2004.

GOEL, A.; BHANJA, S.K.; MEHRA, M.; MAJUMDAR, S.; PANDE, V. Effect of in ovo copper and iron feeding on post-hatch growth and differential expression of growth or immunity related genes in broiler chickens. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 48, n. 3, p. 279-285, 2013.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à Genética**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

HARRIS, E.D. Copper. In: O'DELL, L.; SUNDE, R.A. (eds.) **Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements**. 1ª ed. New York: Marcel Dekker, 1997.

HURLEY, L.S.; KEEN, C.L. Manganese. In: Mertz, W. (eds) **Trace element in human and animal nutrition**, 5ª ed. Academic: San Diego, p.185–221, 1989.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic animals**. 6ª ed. New York: Academic Press, 2008.

KOISTINAHO, J.; GUNDARS, G. Mutant Cu/Zn-Superoxide Dismutase Induced Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: MAURER, M.H. (eds.). **Amyotrophic Lateral Sclerosis**. 1ª ed. InTech: Rijeka, 2012.

KORVER, D. Reducing the incidence of black bone. **World Poultry**. v.26, p.36-38, 2010.

KVIDERA, S.K. Could Your Trace Mineral Program Be Doing More Harm Than Good? In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 81. 2019. New York. *Abstract...* New York: Cornell University Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Sciences, 2019. p.271.

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Commercial Poultry Nutrition**. 3ª ed. Guelph: University Books, 2008.

LI, S.F.; LUO, X.G.; LIU, B.; CRENSHAW, T.D.; KUANG, X.; SHAO, G.Z.; YU, S.X. Use of chemical characteristics to predict the relative bioavailability of supplemental organic manganese sources for broilers. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 2352-2363, 2004

LI, S.F.; LUO, X.G.; LU, L.; LIU, B.; KUANG, X.; SHAO, G.Z.; YU, S.X. Effect of intravenously injected manganese on the gene expression of manganese-containing superoxide dismutase in broilers. **Poultry Science**, v.87, p.2259–2265, 2008.

LI, S.; LU, L.; HAO, S.; WANG, Y.; ZHANG, L.; LIU, S.; LIU, B.; LI, K.; LUO, X. Dietary manganese modulates expression of the manganese-containing superoxide dismutase gene in chickens. **The Journal of Nutrition**, v.141, p.189-194, 2011.

LINDER, M.C. Copper. In ZIEGLER, E.E.; FILER, L.J. (eds). **Present Knowledge in Nutrition**, 7ª ed. Washington: ILSI Press, p.307, 1996.

LIU, A.C.H.; HEINRICHS, B.S.; LEACH, R.M. Jr. Influence of manganese deficiency on the characteristics of proteoglycans of avian epiphyseal growth plate cartilage. **Poultry Science**, v.73, p.663-669. 1994.

LU, L.; WANG, R.L.; ZHANG, Z.J.; STEWARD, F.A.; LUO, X.; LIU, B. 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 vita-min E and phytase in feeds. **Biological Trace Element Research**, v.138, p.181-189, 2010.

LU, LI.; CHANG, B.; LIAO, X.; WANG, R.; ZHANG, L.; LUO, X. Use of molecular biomarkers to estimate manganese requirements for broiler chickens from 22 to 42 d of age. **British Journal of Nutrition**, v. 116, p. 1512-1518, 2016.

LUO, X.G.; JI, F.; LIN, Y.X.; STEWARD, F.A.; LU, L.; LIU, B.; YU, S.X. 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. **Poultry Science**, v.84, p.888-893, 2005.

MAIORKA, A; MACARI, M. Absorção de minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. ed. 2. Jaboticabal: UNESP; FUNEP, p. 167-173, 2002.

MASSUQUETTO, A.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de minerais. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. (eds). **Fisiologia das aves comerciais**. 1ª ed. Jaboticabal: Funep, p. 322-336, 2017.

McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2^a ed. San Diego: Academic Press, 2003.

MILES, R.D.; O'KEEFE, S.F.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B.; LUO, X.G. The effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and dietary prooxidant activity. **Poultry Science**, v.77, p.416-425, 1998.

MORAIS, S.C.D.; MENTEN, J.F.M.; BRAINER, M.M.A.; VALE, M. Altos níveis dietéticos de cobre no desempenho e no colesterol sérico e muscular de frangos de corte. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.1-5, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC. **Nutrient Requirements of Poultry**. 2^a ed. Natl. Washington: Academic Press, 1994.

NGUYEN, H.T.T.; MORGAN, N.; ROBERTS, R.; SWICK, R.A; TOGHYANI, M. Copper hydroxychloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels. **Poultry Science**, v.99, p.6964–6973, 2020.

OLUKOSI, O.A.; KUIJK, S.V.; HAN, Y. Copper and zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 97, p.3891-3898, 2018.

ONU (Organização das Nações Unidas). **World Population Prospects 2019: Highlights**. 2019. Disponível em: < <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html> >. Acesso em: 07 ago. 2020.

PAIK, I.K.; SEO, S.H.; UM, J.S; Chang, M.B.; Lee, B.H. Effects of supplementary copper-chelate on the performance and cholesterol level in plasma and breast muscle of broiler chickens. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 12, p. 794-798, 1999.

PEREZ, V.; SHANMUGASUNDARAM, R.; SIFRI, M.; PARR, T.M.; SELVARAJ, R.K. 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. **Poultry Science**, v.96, n.12, p.4200-4207, 2017.

PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. **Poultry Science**, v.75, p.1086-1091, 1996.

PRABHAKAR, S.S.; ZEBALLOS, G.A.; MONTROYA-ZAVALA, M.; LEONARD, C. Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. **American Journal of Physiology**, v.273, p.882–1888, 1997.

RIBEIRO, M.C.M. **Genética molecular**. Florianópolis: Biologia/Ead/Ufsc, 2009.

RICHARDS, J.D.; ZHAO, J.; HARELL, J.R.; ATWELL, C.A., DIBNER, J.J. Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, n. 11, p.1527-1534, 2010.

ROSA, D.E.; MATTIOLI, G.A. Metabolismo y deficiencia de Cu en bovinos. **Analecta Veterinária**, v.22, p.7-16, 2002.

RUCKER, R.B.; KOSONEN, T.; CLEGG, M.S.; MITCHELL, A.E.; RUCKER, B.R.; URIUHARE, J.Y.; KEEN C. L. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. **Animal Journal Clinical and Nutrition**, v. 67, p.996-1002, p.1998.

RUTZ, F. Impacto da utilização de minerais orgânicos sobre o metabolismo e desempenho das aves. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 2005, Santos. v. 1, Santos, p. 257-268.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.118, p.829-838, 1996.

SANTIN, E.; MORAES, M.L.; SANCHES, A.W.D. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. (eds). **Fisiologia das aves comerciais**. 1ª ed Jaboticabal: Funep, p. 466-486, 2017.

SCHAT, K.A.; KASPERS, B.; KAISER, P. **Avian Immunology**. 2ª ed. Academic Press: London, 2014.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5ª ed. São Paulo: Santos, 2002.

SCRUTTON, M.C.; UTTER, M.F.; MILDVAN, A.S. Pyruvate Carboxylase: The presence of tightly bound manganese. **Journal of Biological Chemistry**, v.241, p.3480-3487, 1966.

SILVA, J.H.V.; PASCOAL, L.A.F. Exigências de aminoácidos para aves. In: SAKOMURA, N.K., da SILVA, J.H.V., COSTA, F.G.P., FERNANDES, J.B.K., HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, p.129-141, 2014.

SINGH, A.K.; GHOSH, T.K.; HALDAR, S. Effects of methionine chelate- or yeast proteinate-based supplement of copper, iron, manganese and zinc on broiler growth performance, their distribution in the tibia and excretion into the environment. **Biological Trace Element Research**, v.164, n.4, p.253-260, 2015.

SUTTLE, N. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 4ª ed., Cambridge: CABI Publishing 2010.

SWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JOZEFIAK, D. The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. **World's Poultry Science Journal**, v.70, p.475-486, 2014.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO V. Manganese and its role in poultry nutrition: an overview. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.5, p.749-754, 2017.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3^a ed., New York: CABI Publishing, 1999.

UPADHAYA, S.D.; LEE, B.R.; KIM, I.H. Effects of ionized or chelated water-soluble mineral mixture supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and intestinal microbiota in broilers. **British Poultry Science**, v.57, p.251-256, 2016.

WARD, J.D.; SPEARS, J.W.; KEGLEY, E.B. Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulfate in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.127-132, 1996.

WERMAN, M.J.; BARAT, E.; BHATHENA, S.J. Gender, dietary copper and carbohydrate source influence cardiac collagen and lysyl oxidase in weanling rats. **Journal of Nutrition**, v.125, p.857-863. 1995.

YANG, F.; CAO, H.; SU, R.; GUO, J.; LI, C.; PAN, J.; TANG, Z. Liver mitochondrial dysfunction and electron transport chain defect induced by high dietary copper in broilers. **Poultry Science**, v.96, p.3298-3304, 2017.

YILDIZ, A.; CUFADAR, Y.; OLGUN, O. Effects of dietary organic and inorganic manganese supplementation on performance, egg quality and bone mineralization in laying hens. **Revue Medecine Veterinaire**, v.162, p.482-488, 2011.

ZHAO, J.; SHIRLEY, R.B.; VAZQUEZ-AÑON, M.; DIBNER, J.J. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield, and footpad health in commercial meat broilers. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p.365-372, 2010.

ZHANG, H., PAN, S., ZHANG, K., MICHELIS, J., ZENG, Q., DING, X., WANG, J., PENG, H., BAI, J., XUAN, Y., SU, Z., BAI, S. Impact of Dietary Manganese on Intestinal Barrier and Inflammatory Response in Broilers Challenged with Salmonella Typhimurium. **Microorganisms**. v.8, p.757-777, 2020.

O Capítulo II, intitulado “*Sources and levels of copper and manganese supplementation influence performance, carcass traits, meat quality, tissue mineral content and ileal absorption of broiler chickens*” foi submetido à publicação na revista *Poultry Science* (impact factor 2.659).

O Capítulo III, intitulado “*Effects of copper and manganese supplementation with hydroxychloride or sulfate source on bone quality, superoxide dismutase activity and immune responses for broilers chickens challenged with E. coli LPS*” será submetido à publicação na revista *Poultry Science*.

CAPÍTULO II

DIFFERENT SOURCES AND LEVELS OF COPPER AND MANGANESE FOR BROILERS

Sources and levels of copper and manganese supplementation influence performance, carcass traits, meat quality, tissue mineral content and ileal absorption of broiler chickens

ABSTRACT This study was conducted to evaluate the effects of different levels and sources of Cu and Mn (sulfate or hydroxychloride - H) on growth performance, carcass traits, meat and skin quality, footpad dermatitis severity, litter quality, liver and plasma mineral content, and ileal mineral absorption. A total of 1,920 one-day-old male Cobb 500 chicks were distributed in a completely randomized design with eight treatments and eight replicates of 30 birds each. The treatments were distributed in a 2x3+2 factorial arrangement: CuH (15 and 150 ppm) × MnH (40, 80, 120 ppm) + 15 ppm Cu Sulfate with 80 ppm Mn Sulfate (control 1) or 150 ppm Cu Sulfate with 120 ppm Mn sulfate (control 2). The productive performance was determined from 1-21 and from 1-42 days of age. At 42 d-old three birds per replicate were slaughtered for carcass yield and meat quality analyses. At 43 d-old, it was determined the apparent ileal absorption of minerals and the concentration of Cu and Mn in the liver and plasma. The resistance and elasticity of the skin, and footpad dermatitis severity were also evaluated. Data were analyzed with Minitab®18, and the means were compared by Tukey and Dunnett tests ($P < 0.05$). The level 150 ppm CuH improved the FCR compared to the 15 ppm CuH and compared to the 15 ppm Cu Sulfate level. Broilers fed diets containing 150 ppm CuH showed higher breast yield compared to those fed diets containing 15 ppm. Breast yield was positively influenced by the inclusion of 40 ppm MnH. There was an interaction between the CuH and the MnH for skin elasticity, and the highest elasticity was found when the supplementation levels were 150 ppm CuH and 40 ppm MnH. High levels of copper decreased the incidence of footpad dermatitis. The hydroxychloride source determined a higher mineral concentration in the liver and plasma and greater apparent ileal absorption of Cu and Mn. In conclusion, the results of this study indicate that dietary supplementation with 150 ppm CuH and 40 or 80 ppm MnH enhance breast yield and improves skin

resistance. By supplying 150 ppm CuH it is possible to improve the FCR and decrease leg injuries. Furthermore, the hydroxychloride source seems to be more bioavailable than the sulfate source.

Key words: Bioavailability, inorganic source, hydroxychloride, poultry nutrition, trace minerals.

INTRODUCTION

Trace minerals, such as copper and manganese, are particularly important for maintaining health and productivity of broilers chickens, due to their effects on several physiological processes (Richards et al., 2010). Copper (Cu) is a structural component of macromolecules and a cofactor for several essential oxydes and monooxidases (cuproenzymes) (McDowell, 2003; Kaneko et al., 2008). The lysyl oxidase, an enzyme that cross-links the collagen subunits in mature protein forms to increase its resistance, is copper-dependent (Rucker et al., 1998) and many other important functions in animal metabolism and health, as well as it is a growth promoter (Pesti and Bakalli, 1996; Paik et al., 1999; Morais et al., 2001). Manganese (Mn) is an important nutrient in poultry nutrition and feeding due to its role in the development of bones and eggshell, enzymes component and nutrient metabolism (Tufarelli and Laudadio, 2017). There are several manganese-dependent enzymes called metalloenzymes, including arginase, phosphoenolpyruvate decarboxylase, glutamine synthetase, as well as Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) (McDowell, 2003).

Mineral supplementation in chicken feed normally occurs from inorganic sources (sulfates, carbonates, chlorides and oxides) and fewer from organic sources (metal ions linked to organic molecules). The inorganic source is known to have low bioavailability while the organic source is controversial in the literature about its real bioavailability. To increase stability and bioavailability of these trace minerals, the industry is now focusing at the hydroxychlorides (Perez et al., 2017; Olukosi et al., 2018; Nguyen et al., 2020). The hydroxychlorides of copper and manganese in broiler nutrition (Intellibond® C - CuH and Intellibond® M - MnH, respectively) have emerged as an alternative source of mineral supplementation and are known for their great strength in chemical bonding resulting in

more stability in the diet and in gastrointestinal tract (Cohen and Steward, 2012).

Although studies have been carried out with hydroxychlorides, in isolation or the association of copper with zinc, to our knowledge there are no studies on the interaction of copper and manganese hydroxychloride for broilers chickens. Therefore, it is important to understand how these hydroxychloride minerals acting in comparing to the traditional inorganic sources, and if the use of different levels of Cu and Mn influences chicken growth performance. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of different sources and levels of copper and manganese (sulfate and hydroxychloride) on growth performance, carcass characteristics, meat quality, footpad and litter condition, skin resistance, liver and plasma mineral content, and apparent ileal absorption of Cu and Mn.

MATERIAL AND METHODS

All procedures described below were previously approved by Ethics Committee on Animal Use from the São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, under protocol number 0191/2018.

Experimental design and diets

The experiment was conducted in the poultry laboratory at São Paulo State University (Unesp), College of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu. A total of 1,920 1-d-old male Cobb chicks were allocated to 8 dietary treatments in a 2x3+2 factorial arrangement. The factors were 2 levels of Cu hydroxychloride (15 and 150 ppm) and 3 levels of Mn hydroxychloride (40, 80, 120 ppm) and 2 additional treatments that were the controls with sulfate source (15 ppm Cu sulfate with 80 ppm Mn sulfate and 150 ppm Cu sulfate with 120 ppm Mn sulfate). Each of the eight treatments had eight replicates and 30 birds per replicate, filling 64 pens. The levels of mineral supplementation were determined according to the levels of nutritional requirement proposed by Rostagno et al. (2011), using recommended levels, above or below the requirement.

The diet basal were formulated based on corn and soybean meal following the recommendations by Rostagno et al. (2011) in four phases: Pre-starter (d1-d7), starter (d8-d21), grower (d22-d35), and finisher (d36-d42) (**Table 1**). The premix was Cu and Mn free. Each level and source of supplementation of Cu and Mn were included in the basal diet (DB) through the replacement of limestone.

Table 1. Ingredients (%) and calculated nutritional levels of the basal diet.

Ingredients, %	Pre-starter	Starter	Grower	Finisher
	(1-7 days)	(8-21 days)	(22-35 days)	(36-42 days)
Corn, 8%	59.06	61.58	64.44	68.75
Soybean Meal, 46%	36.64	33.81	30.31	26.48
Soybean Oil	0.50	1.32	2.31	2.21
Dicalcium Phosphate	1.22	0.87	0.64	0.41
Limestone*	0.95	0.98	0.94	0.87
Salt	0.52	0.48	0.46	0.44
DL-Methionine, 99%	0.340	0.290	0.270	0.250
L-Lysine HCl, 99%	0.320	0.270	0.270	0.300
premix ¹	0.200	0.180	0.160	0.120
L-Threonine 98,5%	0.120	0.090	0.080	0.080
Choline Chloride, 60%	0.072	0.063	0.058	0.038
Salinomycin	0.055	0.055	0.055	-
Phitase 500FTU ³	0.005	0.005	0.005	0.005
Calculated Levels				
AME ² , Kcal/kg	2,964	3,050	3,150	3,200
Crude protein, %	22.39	21.20	19.80	18.40
Calcium, %	0.93	0.84	0.76	0.66
Available Phosphorus, %	0.47	0.40	0.35	0.31
Sodium, %	0.23	0.21	0.20	0.20
Potássio, %	0.87	0.83	0.77	0.71
Chlorine, %	0.42	0.39	0.37	0.37
Lysine dig, %	1.32	1.21	1.13	1.06
Methionine dig, %	0.66	0.60	0.56	0.53
Met+Cys dig, %	0.95	0.88	0.83	0.77
Threonine dig, %	0.86	0.79	0.74	0.69

¹Trace mineral and vitamin premix supplied the following per kg of diet: vitamin A, 13,500 UI; vitamin D3, 3,750 UI; vitamin E, 30 UI; vitamin K3, 3.75 mg; vitamin B1, 3 mg; vitamin B2, 9 mg; pantothenic acid, 18 mg; vitamin B6, 4.5 mg; vitamin B12 22.5 µg; niacin, 52.5 mg; folic acid, 2.25 mg; Biotin, 0.15 mg; Se, 0.375 mg; Fe, 50 mg; Co, 1 mg; I, 1 mg; Zn Hydroxychloride, 80 mg, ² Apparent metabolizable energy, ³Used of the nutritional matrix. *Each level and source of supplementation of Cu and Mn were included in the basal diet (DB) through the replacement of limestone

To achieve the required dietary levels of Cu in control group (15 and 150 ppm) copper sulfate monohydrate (CSM) 35% was added at the rates of 43 or 429 g/ton, respectively. To achieve the required dietary levels of Cu hydroxychloride (15 and 150 ppm) was added 28 or 278 g/ton,

respectively of CuH 54%. To achieve the required dietary levels of Mn in control group (80 or 120 ppm) sulfate monohydrate (MSM) 31% was added at the rates 258 or 387 g/ton, respectively. To achieve the required dietary levels of Mn hydroxychloride (40, 80 and 120 ppm) was added 89, 179 or 268 g/ton, respectively of MnH 44%.

Feed samples from each treatment and period were analyzed to determine Cu and Mn content (ppm) using inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS) (Table 2).

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.

Treatments			Analyzed levels in the diet							
Mineral Source	Cu, ppm	Mn, ppm	Pre-starter		Starter		grower		finisher	
			Cu, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Mn, ppm
Sulfate ¹	15	80	13.00	80.64	14.25	87.99	19.03	101.59	18.09	95.06
Sulfate	150	120	142.15	125.95	142.50	137.10	132.40	127.55	134.10	132.84
hydroxychloride ²	15	40	16.75	53.52	15.25	52.41	17.44	44.67	20.22	59.14
hydroxychloride	15	80	22.00	82.10	18.00	94.90	16.45	86.71	19.46	85.23
hydroxychloride	15	120	18.75	134.85	10.00	137.55	23.08	156.18	18.37	118.08
hydroxychloride	150	40	148.9	62.03	160.00	49.12	198.40	50.94	142.77	57.28
hydroxychloride	150	80	140.75	86.86	151.50	82.17	158.70	96.85	146.42	96.30
hydroxychloride	150	120	145.25	131.15	142.25	135.25	176.1	137.41	147.60	126.33

¹was used analytical grade copper sulfate monohydrate, 35% - CSM ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and manganese sulfate monohydrate, 31% - MSM ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). ²were used Cu Hydroxychloride, (CuH, Selko IntelliBond C®, Trouw Nutrition) and Mn hydroxychloride (MnH, Selko IntelliBond M®, Trouw Nutrition).

Feeding and management

The experiment was carried out in a poultry house from 1 to 42 days of age. The chicks were housed in 2 m² pens on reused wood shavings. Each pen was equipped with a tubular feeder and a nipple drinking. The initial heating was performed using infrared lamps (250 watts) and at the end of the 14th day of the experiment, they were removed. The poultry house was equipped with automatic control of exhaust fans and nebulizers. Timer carried out the light program with 20-watt lamps, obeying the lineage recommendations. Daily, the values of minimum, maximum and instantaneous

temperature and relative humidity, inside the building, were measured using a digital thermo hygrometer (HOBO®). Mash feed and water were available *ad libitum*.

Productive performance

At days 21 and 42 growth performance parameters (body weight, weight gain, feed intake, and feed conversion ratio) were determined. Mortality was recorded daily.

Carcass and cuts yield

On the 42th d of experiment, 192 birds (24 birds per treatment) were weighed, stunning by electric stunning and slaughtered by bleeding. Afterwards, they were scalded and feathers, head, viscera, and feet were removed. Carcass yield and abdominal fat were calculated in relation to body weight before slaughtering. Parts yield (breast, thighs, wings, and back, all including skin and bones) were obtained in relation to the weight of the eviscerated carcass.

Meat quality

The breast (*Pectoralis major*) muscle of 16 broilers per treatment was stripped and stored immediately at 4°C for subsequent determination of meat quality. The muscle pH values were measured in triplicate 24 h postmortem using an electronic pH meter (Homis portable pH meter, HI 8314, São Paulo, Brazil) which was calibrated with pH 4.6 and 7.0 buffers equilibrated at 37°C. Measurement was directly conducted by inserting the probe into the right side of the muscle samples. The meat color of pectoralis muscle was assessed 24 h *postmortem* in triplicate using a handheld colorimeter CR-400 (Konica Minolta Sensing, New Jersey, EUA) which was previously calibrated against a white tile according to the manufacturer's manual. The color was reported in the CIELAB trichromatic system as L* (lightness), a* (redness), and b* (yellowness).

In the water-holding capacity, 1g of muscle was collected, identified, wrapped in filter paper and centrifuged 1500 rpm for 4 min. After centrifugation, the samples were weighed and placed in the oven at 70°C for 12 hours and after the fragments were weighed again. Holding water capacity (%) was calculated as follows: $100 \times [(\text{weight after centrifugation} - \text{weight after drying}) / \text{initial sample}]$

weight] (Nakamura and Katok, 1985). For cook loss the left breast muscles were weighed and cooked in a water bath in plastic bags to an internal temperature of 80°C. Then the muscles were allowed to cool to room temperature and, the mass changes were used to calculate the loss of cooking based on the initial muscle weight. Cooking loss (%) was calculated as follows: $100 \times [(initial\ weight - cooked\ final\ weight)/initial\ weight]$ (Honikel, 1998). Then, the cooked samples were used for shear force measurement using a Texture Analyzer (TAXT-Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipped with Warner-Bratzler device, calibrated with a normal weight range of 5 kg and device speed was 10 mm/s, evaluating the shear force (N) according to the procedure described by Cavitt et al. (2004). The samples were cut into five rectangles (1.0 x 1.0 x 2.0 cm) on the cranial surface and the fibers oriented perpendicular to the Razor Blade.

Skin resistance, footpad scoring and litter quality

Samples of the drumstick skin (3 cm) from 16 chickens per treatment were used to determine the breaking strength (kg) and elasticity (mm). The texture analyzer (Model TA-XT2i, Stable Mycro Systems LTDA., Goldalming, UK) was used for this test. The samples were submitted to the flexion test at the constant strain rate for elastic material. The speed of the device was 1 mm/s, the firing force was 10g and the tension was 15mm (Ribeiro, 2016).

Footpad scoring was done on day 42 on 5 randomly selected birds per pen by visual inspection and three scores were assigned. The score 1 – Foot pad without apparent injuries; score 2 – Foot pad with mild injuries, and score 3 – Foot pad with severe injuries, according to Zhao et al. (2010). Total footpad score (TFS) was calculated using the following formula (Olukosi et al., 2018):

$$TFS = \frac{(1 \times n) + (2 \times n) + (3 \times n)}{Total\ number\ of\ birds\ scored}$$

Where the **numbers 1 to 3** indicate the score assigned to each bird and **n** indicates the number of birds assigned the particular score in each pen. A lower score is associated with better footpad quality.

Dry matter content of litter and quality from each pen was evaluated at the end of the grower phase. To litter dry matter (LDM), about 10 g of litter was collected from 4 points per pen and placed to dry for 24 hours at 105°C. Through the difference between the initial weight and the final weight, the LDM content was obtained (%). To litter quality, scores from 1 to 5 were attributed based on the welfare quality assessment protocol for poultry (Botreau et al., 2009). Score 1, if the litter was friable with no capping or compaction, to score 5, if litter was wet and dough-like. The total litter score (TLS) was calculated as follows:

$$\text{TLS} = \frac{(1 \times \%) + (2 \times \%) + (3 \times \%) + (4 \times \%) + (5 \times \%) }{100}$$

Where the **numbers** 1 to 5 were the scores as described previously and the **%** was the percentage of the pen area corresponding to each score in each pen. A lower score is associated with better litter quality. The litter was stirred weekly until the 28th day of age.

Mineral content in plasma and liver

To mineral concentration in plasma, about 5 mL of blood were collected via the jugular vein and placed in tubes with sodium heparin. Then, the blood was centrifuged for 15 minutes at 2000 rpm to obtain plasma and stored in plastic microtubules at -20° C. Fragments of the right lobe liver were collected and frozen at -20° until further analysis. For extraction of the metal nutrients in plasma 30 µl de plasma was transferred to 10 mL glass flask, to which were added 1.0 mL of nitric acid 14 mol/L and 0.3 µl of hydrogen peroxide 30% m/m and subsequently the samples were submitted to heating. For extraction of the metal nutrients in liver, approximately 100 mg of sample were transferred directly to the microwave oven's Teflon flasks, to which were added 3.0 mL of nitric acid 14 mol/L and 2.0 mL of hydrogen peroxide 30% m/m. For heating it was used a microwave oven (Provecto Analítica model DGT-100 Plus, Campinas, Brazil) (Rosa et al., 2002). Copper and manganese were determined using a SHIMADZU AA-6800 atomic absorption spectrometer (Neves et al., 2009).

Apparent ileal mineral absorption (AIA)

A total of 24 broilers with 42-d-old were randomly selected and separated according on the treatment. These birds received for 24 hours the experimental diets containing 0.3% of chromium oxide (marker). After, the animals were euthanized and ileum digesta were collected from taking the distal two-thirds part of the ileum after dissection from Meckel's diverticulum to the ileo-cecocolic junction. The samples were stored at -20°C until analysis. Approximately 50 mg of sample and 10 mL of 0.10 mol/L hydrochloric acid solution were transferred to 50 mL Teflon flasks. The ileum digesta was then subjected to ultrasonic shaking to extract the metal analytes according to Neves et al. (2009) and digestion using nitric and perchloric acids was used to extract chromium (Kimura and Miller, 1957). The concentration of Cu, Mn and Cr in the feed and in the ileum digesta were analyzed using inductively coupled plasma- mass spectroscopy (ICP-MS).

Apparent ileal absorption (AIA) of minerals was calculated using the following formula (Hafeez et al., 2014):

$$AIA(\%) = 100 - [(MF - MI) \times (NI / NF) \times 100]$$

MF= concentration (%) of marker in feed; **MI**= concentration (%) of marker in digesta; **NI**= concentration (%) of nutrient in digesta; **NF**= concentration (%) of nutrient in feed.

Statistical analysis

The data were submitted to normally test, and after the data were analyzed by ANOVA at the $P < 0.05$ level. Significant differences of the factorial were determined by Tukey test at 5% of probability. In order to compare the factorial dietary treatment means with the additional treatments, the Dunnett test was performed ($P < 0.05$). The data were analyzed with Minitab® 18.

RESULTS

There was no Cu x Mn interaction ($P > 0.05$) on growth performance response. When assessing the main factors, there was an effect for the FCR at 42 days of age for copper. Birds that were fed diets supplemented with 150 ppm CuH had better FCR than birds that fed 15 ppm CuH. In addition, the

supplementation of 150 ppm CuH + 40 ppm MnH determine better FCR than 15 ppm CSM + 80 ppm MSM (Table 3).

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.

Treatments		1 to 21 d-old				1 to 42 d-old			
		BW, g	WG, g	FI, g	FCR	BW, g	WG, g	FI, g	FCR
CuH 15ppm		997.1	957.3	1312.3	1.374	3046.0	3006.2	4858.3	1.616 ^b
CuH 150ppm		998.8	959.4	1296.7	1.357	3055.9	3016.4	4810.2	1.597 ^a
	MnH 40ppm	998.9	959.2	1304.8	1.378	3061.7	3022.0	4853.7	1.606
	MnH 80ppm	996.2	956.4	1295.7	1.360	3060.6	3020.9	4821.6	1.604
	MnH 120ppm	999.0	959.4	1313.0	1.358	3030.6	2991.0	4827.3	1.613
CuH 15ppm	MnH 40ppm	1001.8	961.9	1322.0	1.394	3064.2	3024.2	4899.8	1.620
CuH 15ppm	MnH 80ppm	992.8	952.9	1297.1	1.366	3041.2	3001.4	4803.2	1.601
CuH 15ppm	MnH 120ppm	996.8	957.2	1318.0	1.361	3032.6	2993.1	4871.8	1.627
CuH 150ppm	MnH 40ppm	995.9	956.5	1287.6	1.363	3059.2	3019.8	4807.6	1.592 ^x
CuH 150ppm	MnH 80ppm	999.6	960.0	1294.4	1.354	3080.0	3040.4	4840.0	1.600
CuH 150ppm	MnH 120ppm	1001.3	961.7	1308.1	1.354	3028.6	2989.0	4782.8	1.599
Control 1		985.5	945.7	1317.1	1.391	3010.5	2970.8	4852.8	1.634
Control 2		1006.3	966.4	1333.3	1.384	3059.3	3019.4	4901.7	1.623
P - values									
CuH		0.784	0.758	0.176	0.171	0.743	0.738	0.360	0.046
MnH		0.924	0.918	0.451	0.294	0.634	0.637	0.865	0.597
CuH vs MnH		0.701	0.714	0.508	0.691	0.796	0.796	0.526	0.116
Control 1 vs all		0.760	0.750	0.508	0.251	0.899	0.899	0.767	0.074
Control 2 vs all		0.902	0.914	0.259	0.397	0.899	0.899	0.767	0.044
Control 1 vs. control 2		0.311	0.310	0.443	0.814	0.311	0.310	0.443	0.215
CV. %		2.04	2.12	3.06	3.04	3.22	3.25	3.34	3.03

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; BW= body weight; WG= weight gain; FI= feed intake; FCR= feed conversion ratio; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. ^{a,b} Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test.

^x Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1.

Broilers fed diets supplemented with 150 ppm CuH showed higher breast yield compared to those fed diets containing 15 ppm. Breast yield was positively influenced by the inclusion of 40 ppm Mn hydroxychloride, comparing with 120 ppm, but back and wing performance were higher at 120 ppm than 80 ppm and 40 ppm, respectively (Table 4).

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.

Treatments	CY, %	Breast, %	Thigh, %	Back, %	Wings, %	AF, %
CuH 15ppm	74.42	39.71 ^b	29.20	18.92	11.83	1.14
CuH 150ppm	74.82	40.38 ^a	28.95	18.69	11.88	1.09
MnH 40ppm	74.52	40.48 ^a	28.83	18.87 ^{ab}	11.66 ^b	1.14
MnH 80ppm	74.71	40.25 ^{ab}	29.18	18.41 ^b	11.86 ^{ab}	1.04
MnH 120ppm	74.64	39.41 ^b	29.21	19.14 ^a	12.06 ^a	1.09
CuH 15ppm MnH 40ppm	74.18	40.05	28.77	19.25	11.67	1.23
CuH 15ppm MnH 80ppm	74.55	40.17	29.11	18.42	11.78	1.10
CuH 15ppm MnH 120ppm	74.54	38.90	29.71	19.10	12.05	1.08
CuH 150ppm MnH 40ppm	74.86	40.91	28.88	18.50	11.65	1.06
CuH 150ppm MnH 80ppm	74.86	40.32	29.26	18.40	11.93	0.97
CuH 150ppm MnH 120ppm	74.74	39.92	28.72	19.17	12.06	1.11
Control 1	73.88	40.31	28.68	19.11	11.83	1.26
Control 2	74.65	40.10	28.99	18.68	11.84	1.09
P - values						
CuH	0.241	0.049	0.289	0.213	0.683	0.183
MnH	0.686	0.030	0.310	0.006	0.032	0.418
CuH vs MnH	0.909	0.543	0.076	0.140	0.840	0.485
Control 1 vs all	0.418	0.053	0.145	0.056	0.273	0.207
Control 2 vs all	0.876	0.061	0.170	0.060	0.278	0.552
Control 1 vs. control 2	0.099	0.670	0.459	0.082	0.972	0.163
CV. %	2.08	4.98	4.85	5.70	6.13	2.20

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; CY= Carcass yield; AF= Abdominal fat; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate.

^{a,b}Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. Controls were tested by Dunnett's test.

For the color of breast meat, higher levels of CuH showed higher value of L* and b*.

Meanwhile, 40 ppm of MnH determined higher L* values compared to the 120 ppm level. Water-holding capacity, cooking loss and shear force showed no difference among treatments. Comparing the sulfate source to the hydroxychloride source, the pH of the control 2 (150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate) determined lower values than the other treatments. Meanwhile, broilers of the control 1 determined a higher value of L* and b* compared to 15 ppm CuH and 120 ppm MnH. Control 2 determined lower values for L* compared to 150 ppm CuH and 40 or 80 ppm MnH (Table 5).

Table 5. pH, lightness (L*), redness (a*), yellowness (b*), water-holding capacity (WHC), cooking loss, and shear force in chicken breasts at 42 days of age supplemented with different sources and levels of copper and manganese.

Treatments		pH	a*	b*	L*	WHC, %	Cook loss, g	Shear force, N
CuH 15ppm		6.26	4.24	6.10 ^b	54.64 ^b	60.42	19.39	14.78
CuH 150ppm		6.26	4.56	6.81 ^a	56.16 ^a	59.78	19.77	14.14
	MnH 40ppm	6.28	4.25	6.91	56.01 ^a	60.24	20.11	15.71
	MnH 80ppm	6.28	4.45	6.35	55.55 ^{ab}	59.73	18.98	14.26
	MnH 120ppm	6.23	4.51	6.09	54.64 ^b	60.35	19.65	13.42
CuH 15ppm	MnH 40ppm	6.28	3.84	6.64	55.58	60.23	20.10	15.18
CuH 15ppm	MnH 80ppm	6.25	4.43	6.33	54.87	59.94	18.88	15.45
CuH 15ppm	MnH 120ppm	6.26	4.46	5.33 ^x	53.49 ^x	61.10	19.19	13.73
CuH 150ppm	MnH 40ppm	6.29 ^y	4.66	7.19 ^x	56.45 ^y	60.24	20.11	16.24
CuH 150ppm	MnH 80ppm	6.30 ^y	4.47	6.38	56.24 ^y	59.51	19.08	13.07
CuH 150ppm	MnH 120ppm	6.21	4.57	6.85	55.80	59.60	20.11	13.12
Control 1		6.27 ^a	4.30	6.20	55.24	60.92	19.05	13.94
Control 2		6.18 ^b	5.03	6.52	54.85	60.18	17.78	14.22
P - values								
CuH		0.930	0.867	0.030	0.001	0.361	0.719	0.428
MnH		0.202	0.282	0.106	0.036	0.743	0.676	0.074
CuH vs MnH		0.171	0.256	0.168	0.389	0.660	0.932	0.221
Control 1 vs all		0.339	0.353	0.049	0.003	0.752	0.972	0.146
Control 2 vs all		0.021	0.379	0.059	0.002	0.884	0.811	0.175
Control 1 vs. control 2		0.025	0.158	0.598	0.610	0.414	0.331	0.827
CV. %		1.73	4.03	24.46	25.61	5.19	24.42	26.81

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; L*= lightness; a*= redness; b*= yellowness; WHC= water-holding capacity; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. ^{a,b} Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. ^{x,y} Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1 and letter "Y" differ from control 2.

There was no difference ($P>0.05$) among different supplementation sources. It was observed an interaction between the different supplementation sources and levels of minerals for skin elasticity. The interaction shows that the level 150 ppm of Cu + 40 ppm of Mn determined higher elasticity than level of 150 ppm of Cu + 80 ppm of Mn. For TFS, higher levels of copper provided better footpad scores and lower litter humidity values. The MnH did not alter the TFS or litter quality ($P>0.05$) (**Table 6**).

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.

Treatments		Skin quality		TFS	LDM, %	TLS
		BS, N	Elasticity, mm			
CuH 15ppm		56.62	8.61	1.610 ^a	50.81 ^b	3.063
CuH 150ppm		58.44	8.59	1.350 ^b	54.19 ^a	2.992
	MnH 40ppm	60.94	8.90	1.440	53.35	3.000
	MnH 80ppm	56.42	8.45	1.513	51.38	3.046
	MnH 120ppm	55.23	8.45	1.488	52.76	3.047
CuH 15ppm	MnH 40ppm	57.17	8.50 ^{Aa}	1.530	51.09	3.063
CuH 15ppm	MnH 80ppm	57.59	8.99 ^{Aa}	1.650	51.67	3.031
CuH 15ppm	MnH 120ppm	55.12	8.34 ^{Aa}	1.650	49.66	3.094
CuH 150ppm	MnH 40ppm	64.71	9.30 ^{Aa}	1.350	55.61	2.938
CuH 150ppm	MnH 80ppm	55.25	7.91 ^{Bb}	1.375	51.10	3.061
CuH 150ppm	MnH 120ppm	55.35	8.56 ^{Aab}	1.325	55.86	3.000
Control 1		50.16	8.62	1.425	52.64	2.969
Control 2		50.64	8.55	1.400	50.42	3.094
P - values						
CuH		0.558	0.934	0.001	0.043	0.394
MnH		0.282	0.291	0.689	0.942	0.836
CuH vs MnH		0.401	0.017	0.689	0.893	0.660
Control 1 vs all		0.232	0.141	0.053	0.559	0.897
Control 2 vs all		0.246	0.101	0.054	0.437	0.849
Control 1 vs. control 2		0.915	0.895	0.823	0.227	0.312
CV. %		26.28	16.29	17.72	13.03	7.97

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; BS= breaking strength; TFS= Total footpad score; LDM= Litter dry matter; TLS= total litter score; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. ^{a,b} Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. In factorial, uppercase letters differ from each other within the MnH factor and lowercase letters differ from each other within the CuH factor. Controls were tested by Dunnett's test.

Broiler fed diets supplemented with higher level of Cu and Mn determined higher ($P < 0.05$) plasma and liver Cu concentration. The levels of 80 and 120 ppm of MnH determined higher Mn plasma contents and the level 120 ppm of MnH determined higher concentration of Mn in the liver. There was an interaction ($P < 0.05$) between CuH and MnH for liver Mn contents. Mn liver content tended to be lower when higher level of Cu was supplemented in the diet along with 80 ppm of Mn, and lower Mn levels decrease Mn liver concentration. Comparing the sulfate source with the hydroxychloride, it can be observed that the use of hydroxychloride, in most cases, determined higher concentrations of Cu and Mn in the liver and plasma (**Table 7**).

The apparent ileal absorption (AIA) of Cu and Mn had a significant effect on broilers supplemented with the different levels and mineral source ($P < 0.05$). The 150 ppm Cu level increased the AIA of Cu when compared to 15 ppm. By supplying 80 or 120 ppm of Mn increased the AIA of this mineral than 40 ppm. When 15 ppm of CSM was supplemented, the AIA of Cu is lower than diets supplemented with hydroxychlorides, except for the diet supplemented with 15 ppm CuH + 40 ppm MnH. Finally, when 120 ppm MnH + 40 ppm CuH was used, the AIA of Cu was greater than the sulfate source with 120 ppm Mn and 150 Cu.

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.

Treatments	Plasma Cu, ppm	Plasma Mn, ppm	Liver Cu, ppm	Liver Mn, ppm	AIA of Cu, %	AIA of Mn, %
CuH 15ppm	0.454 ^b	0.456 ^b	14.283 ^b	21.247 ^b	65.70 ^b	82.04
CuH 150ppm	0.579 ^a	0.503 ^a	15.438 ^a	22.859 ^a	77.84 ^a	78.83
MnH 40ppm	0.516	0.470 ^b	14.879	21.450 ^b	70.37	74.18 ^b
MnH 80ppm	0.497	0.512 ^a	15.694	21.001 ^b	71.96	82.87 ^a
MnH 120ppm	0.549	0.510 ^a	15.720	23.709 ^a	73.00	84.24 ^a
CuH 15ppm MnH 40ppm	0.428	0.438	14.290 ^X	20.557 ^{XY Ab}	63.15	74.70 ^X
CuH 15ppm MnH 80ppm	0.417	0.511 ^{XY}	13.824 ^X	23.553 ^{XY Aab}	66.67	84.82
CuH 15ppm MnH 120ppm	0.517 ^X	0.475	14.734 ^X	24.449 ^{XY Aa}	67.29	86.60 ^y
CuH 150ppm MnH 40ppm	0.605 ^{XY}	0.503	15.468 ^X	22.323 ^{XY Aa}	77.59 ^X	73.68 ^X
CuH 150ppm MnH 80ppm	0.577 ^X	0.513 ^{XY}	17.564 ^{XY}	18.451 ^{Bb}	77.25 ^X	80.92
CuH 150ppm MnH 120ppm	0.581 ^X	0.545 ^{XY}	16.705 ^{XY}	22.969 ^{XY Aa}	78.70 ^X	81.88
Control 1	0.389 ^b	0.442	11.274 ^a	18.211	55.89 ^b	82.53
Control 2	0.491 ^a	0.441	13.923 ^b	17.632	76.05 ^a	79.11
P - values						
CuH	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	0.002	0.207
MnH	0.124	0.031	0.263	<0.001	0.848	0.005
CuH vs MnH	0.066	0.095	0.081	<0.001	0.905	0.822
Control 1 vs all	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.005	0.023
Control 2 vs all	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.097	0.029
Control 1 vs. control 2	0.028	0.974	0.006	0.481	0.015	0.274
CV. %	37.47	25.77	29.59	20.04	20.58	10.73

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. ^{a,b}Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. In factorial, uppercase letters differ from each other within the MnH factor and lowercase letters differ from each other within the CuH factor. ^{X,Y} Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1 and letter "Y" differ from control 2.

DISCUSSION

A melhor conversão alimentar dos frangos suplementados com níveis elevados de CuH pode estar relacionada ao efeito melhorador de desempenho do Cu. De fato, estudos tem demonstrado melhor desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo nível de Cu acima de 125 ppm (Pesti e Bakalli, 1996; Paik et al., 1999; Moraes et al., 2001; Santos et al., 2020). Entretanto, esse efeito somente foi encontrado quando foi utilizado a fonte hidroxiclreto, mostrando que ao utilizar a fonte sulfato, por ser menos biodisponível, para obter este mesmo efeito seria necessário aumentar os níveis de suplementação. Dessa forma, os hidroxicloreto são mais biodisponíveis e, por isso, fonte alternativa promissora de suplementação mineral para melhorar índices produtivos (Miles et al., 1998; Lu et al., 2010; Cohen and Steward, 2012; M'Sadeq et al., 2018).

Nguyen et al. (2020) também determinaram que a fonte hidroxiclreto de cobre, quando comparada com a fonte sulfato melhorou o desempenho produtivo dos frangos de corte aos 35 dias de idade. Santo et al. (2020) determinaram que o nível 150 ppm de Cu da fonte hidroxiclreto melhorou a conversão alimentar de frangos de corte aos 42 dias de idade em comparação com 15 ppm de cobre.

Resultados obtidos por Yang et al. (2011) e Philpot et al. (2020) não observaram efeito melhorador de desempenho nos frangos suplementados com altos níveis de Cu. O mecanismo de ação do cobre como melhorador do desempenho inclui sua atividade bacteriostática contra bactérias patogênicas (Pesti e Bakalli, 1996; Puig e Thiele, 2002). Desta forma, este mineral favorece a proliferação de microrganismos benéficos no trato gastrointestinal proporcionando uma modulação da microbiota (Silva, 2011). Por isso, quando os frangos são criados com baixo grau de desafio sanitário esse efeito pode estar ausente. Além dos aspectos relacionados a modulação da microbiota intestinal, a menor suplementação de cobre pode prejudicar a imunidade celular e humoral (Prohaska e Failla, 1993), atividade de superóxido dismutase (Jones e Suttle, 1981, Stabel e Spears, 1990, Gengelbach et al., 1997), proliferação de células T, produção de citocinas e produção de anticorpos (Stabel e Spears, 1990). Devido a ação da enzima superóxido dismutase cobre e zinco dependentes atuar na remoção

de radicais livres, produzidos durante a fagocitose, isto ocasiona células de defesa do sistema imune menos susceptíveis ao ataque de radicais livres, melhorando assim a imunidade dos frangos de corte (Harris, 1997).

Apesar do cobre não ter demonstrado efeito no ganho de peso dos frangos, níveis elevados de CuH melhoraram o rendimento do peito das aves e por isso, o efeito melhorador de desempenho do cobre também foi visível através dessa variável. O Cu atua na síntese de colágeno e elastina por ser cofator da lisil-oxidase, enzima que faz a reticulação do colágeno (Rucker et al., 1998). Por isso, indiretamente o cobre melhora a qualidade dos músculos, pele, ossos e demais tecidos que mudam de tamanho como consequência do preenchimento como os intestinos e vasos sanguíneos (Richards et al., 2010). Philpot et al. (2020) não encontraram diferença no ganho de peso dos frangos suplementados com altos níveis de cobre, entretanto, notaram que o rendimento do peito dos frangos suplementados com maiores níveis foi superior, aos 54 dias.

Segundo Gajula et al. (2011), a suplementação de Mn no nível de 60 ppm seria suficiente para o desempenho de frangos de corte, contrariando Cupertino et al. (2015) que valores entre 30 a 40 ppm. Contudo, esses trabalhos relataram valores ótimos para atender às exigências nutricionais e garantir bons resultados de desempenho produtivo descartando repostas que melhorem além do desempenho parâmetros de saúde e bem-estar das aves.

O Mn é um micromineral importante na formação dos ossos e altos níveis do Mn pode influenciar positivamente o desenvolvimento desse tecido (SUTTLE, 2010). Como as asas e o dorso possuem alta proporção de tecido ósseo em relação a quantidade de carne o nível 120 ppm foi melhor para o rendimento desse corte por sua influência positiva na mineralização óssea. Jasek et al. (2019) relataram que 160 ppm de MnH foi capaz de melhorar a qualidade e a resistência dos ossos de frangos. Enquanto isso, o nível 40 ppm aumentou o rendimento do peito, já que esse corte possui proporção menor de tecido ósseo em relação a quantidade de carne.

Segundo Lu et al. (2006), com o aumento da inclusão do Mn, pode ocorrer diminuição do pH da carne sem alterar outros parâmetros de qualidade. O pH está correlacionado com a capacidade de retenção da água do músculo, se o pH está acima de 6,2 a carne pode reter mais água que o normal (Barbut, 1997; Le Bihan-Duval et al., 1999). Entretanto, a capacidade de retenção de água das carnes estava dentro dos valores esperados (Jayasena et al., 2013; Droval et al., 2012) e não tiveram nenhum efeito entre os tratamentos. Dessa forma, somente a avaliação do pH não é suficiente para afirmar que houve alteração da qualidade da carne. Altos valores de pH da carne estão sendo encontrados em diversos estudos, sem alterações de outros parâmetros de qualidade. Segundo Alnahhas et al. (2016), valores de pH 24 horas *post-mortem* acima de 6,10 podem ser encontrados em linhagens melhoradas geneticamente para obterem maior rendimento de peito e são chamadas de linhagens pH+.

A luminosidade da carne está relacionada se a carne está escura ou clara, quanto maior o L* mais pálida é a carne. Segundo Le Bihan-Duval et al. (1999), o aumento do peso vivo e do rendimento de peito parece ser capaz de aumentar a palidez da carne. Essa informação corrobora com este estudo já que os maiores valores de rendimento de peito obtidos foram no nível de 150 ppm de CuH com 40 ppm de MnH e os mesmos obtiveram maiores valores de luminosidade.

Apesar do teor de L* estar na faixa de 54, o que poderia inferir uma carne com a anormalidade PSE (carne pálida, flácida e exsudativa), os valores de pH 24 horas após o abate estavam entre 6,2 e para ser considerada uma carne PSE os valores devem estar abaixo de 5,7 (Droval et al., 2012). Além disso, na avaliação de carnes PSE, Droval et al. (2012) encontraram valor de L* de 59.26. Dessa forma, ao utilizar 150 ppm CuH com 40 ppm de MnH é possível aumentar o rendimento do peito sem prejuízos à qualidade da carne.

A capacidade de retenção de água, força de cisalhamento e perda de água após cocção da carne não foram alterados quando utilizou a fonte hidroxicloreto, mostrando que essa fonte pode ser utilizada na alimentação dos frangos sem causar danos na qualidade da carne.

Na análise de elasticidade da pele houve interação dos fatores CuH e MnH. No desdobramento da interação foi observado que a melhor elasticidade da pele dos frangos foi quando se utilizou alto nível de CuH com baixo nível de MnH. O cobre é um micromineral importante para a manutenção de tecidos como a pele e isso se deve por ser o principal cofator da enzima lisil oxidase. Essa enzima participa da formação de ligações cruzadas no colágeno e elastina ao adicionar um grupo hidroxila aos resíduos de lisina, conferindo rigidez e elasticidade as proteínas do tecido conjuntivo (Rucker et al., 1998; Richards et al., 2010). Altos níveis do cobre estão associados com maior ativação e ação dessa enzima e por isso, confere maior elasticidade os tecidos (Werman et al., 1995; Zhao et al., 2010). Com a pele mais resistente, lesões de pele como as dermatoses e celulites são reduzidas e menos carcaças são condenadas nos frigoríficos, já que essas são uma das principais causas de condenação parcial (Oliveira et al., 2016).

Aves suplementadas com alto nível de CuH obtiveram redução de aproximadamente 16% na dermatite do coxim plantar. Como já mencionado, o cobre possui diversos benefícios aos frangos e um deles é o aumento da resistência e elasticidade dos tecidos (Rucker et al., 1998; Richards et al., 2010). Richards et al. (2010) e Zhao et al. (2010) relataram que houve redução da incidência de lesões nos coxins plantares quando foi utilizado maiores valores de Zn e Cu pois esses minerais, desempenham papel fundamental na remodelação tecidual tanto fisiológica como patológica. A avaliação dos coxins plantares é parâmetro relevante para mensurar o bem-estar das aves. A dermatite do coxim plantar é uma condição que causa lesões necróticas nas patas, causando dor e consequentemente queda na produtividade. Por isso, é importante reduzir essa condição patológica para gerar ganhos produtivos além de preservar o bem-estar.

Os escores de pontuação da cama não foram alterados com os diferentes níveis e fontes de Cu e Mn estudados. Com maiores valores de suplementação de CuH, a cama tornou-se mais seca e esse fato também explica a melhor qualidade dos coxins plantares dos frangos que receberam 150 ppm CuH. Devido ao fato de o cobre favorecer positivamente as bactérias benéficas do trato gastrointestinal

(Silva, 2011) e ter ação bacteriostática aos microrganismos patogênicos (Pesti e Bakalli, 1996; Puig e Thiele, 2002). Por isso, melhora o trânsito intestinal, diminuindo incidências de diarreia e outros distúrbios intestinais infecciosos que aumentam a umidade das excretas e, conseqüentemente, da cama.

De maneira geral, quando foi comparado os mesmos níveis de suplementação mineral, os frangos que receberam a fonte hidroxicloreto obtiveram maiores concentrações de Cu e Mn no plasma e no fígado do que os frangos que receberam a fonte sulfato. Este resultado confirma o princípio que os hidroxicloretos possuem maior biodisponibilidade relativa dos minerais do que os sulfatos. Semelhante a esse estudo, Olukosi et al. (2018) avaliaram o efeito da suplementação da ração de frangos com hidroxicloreto de cobre e zinco em comparação com a fonte sulfato e encontraram maior concentração de cobre no fígado das aves que receberam a fonte hidroxicloreto. Lu et al. (2010) também encontraram maior deposição de cobre hepático nos frangos que foram suplementados com a fonte hidroxicloreto do que a fonte sulfato comprovando assim melhor biodisponibilidade relativa da fonte hidroximineral.

Os hidroxicloretos possuem ligações covalentes que são mais fortes que as ligações iônicas dos sulfatos, por isso, melhoram a estabilidade dos componentes das rações e a biodisponibilidade dos minerais por evitar a interação antagonistas com outros nutrientes da dieta (Cohen and Steward, 2012). A grande vantagem dessa fonte é a redução do custo de fabricação, além da diminuição da inclusão mineral por serem mais absorvidos e do impacto ambiental, já que os frangos de corte irão excretar menos minerais no ambiente (Cohen and Steward, 2012; M'Sadeq et al., 2018). Miles et al. (1998) e Lu et al. (2010) verificaram que os hidroxicloretos foram menos reativos na ração e mais biodisponíveis do que outras formas inorgânicas.

Com maiores valores de Cu e Mn suplementados na ração houve aumento do conteúdo desses minerais no fígado e no plasma dos frangos. Segundo Suttle (2010) e Yang et al. (2011), o fígado é considerado o órgão alvo para deposição do cobre e do manganês. O cobre quando em excesso, acumula-se principalmente nos lisossomos e no citoplasma dos hepatócitos e a toxicidade hepática

para esse mineral é relatada com níveis acima de 220 ppm, nesse caso, há comprometimento da função mitocondrial dos hepatócitos (Yang et al., 2011). Enquanto isso, o Mn em excesso é sequestrado para dentro das mitocôndrias, consequentemente há interferência na respiração celular com aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cupertino et al., 2015; Tufarelli e Laudadio, 2017).

Somente houve interação para Cu e Mn no conteúdo de manganês no fígado dos frangos. De maneira geral, quando foi utilizado 120 ppm de MnH com 15 ou 150 ppm de CuH, houve maior deposição de Mn nesse órgão. Dessa forma, maiores níveis de MnH suplementados aumentaram o conteúdo desse mineral no fígado.

As medições de absorção de microminerais como o Cu, Mn e o Zn são difíceis de serem realizadas devido à complexidade da excreção mineral endógena (M'Sadeq et al., 2018). Esses elementos são absorvidos em quase todo o trato gastrointestinal e excretados no intestino por meio da bile, quando isso ocorre, o mineral não absorvido e o nutriente absorvido e excretado pela bile podem se misturar no intestino, impedindo o cálculo exato de ambos (Finley et al., 1997). Neste estudo, a absorção aparente ileal de CuH foi maior em comparação com o sulfato e quando a ração foi suplementada com 15 ppm de CSM a absorção mineral de cobre foi menor que as demais, mostrando que a fonte sulfato realmente possui menor biodisponibilidade. Valores próximo a 60% de absorção aparente ileal para o Cu são encontrados quando é utilizado a fonte sulfato no nível de 15 ppm (Hafeez et al., 2014).

Com relação ao Mn, quando se utilizou 120 ppm MnH em comparação com 120 ppm de MSM, a fonte hidroximineral novamente demonstrou maior AIA do que a fonte inorgânica. M'Sadeq et al. (2018) não encontraram diferença na AIA de cobre e manganês para frangos de corte com 38 dias em comparação a fonte sulfato, entretanto, os níveis de hidroxicloretos utilizados tiveram redução da inclusão em comparação com a fonte sulfato. Dessa forma, mesmo recebendo a suplementação com níveis menores, a fonte hidroxicloreto foi capaz de se igualar a fonte sulfato para esse parâmetro.

Com base nestas observações, pode-se concluir que a fonte hidroxicloreto foi mais biodisponível que a fonte sulfato pela maior absorção ileal aparente dos minerais e pela maior concentração dos minerais no fígado e no plasma. Sendo assim, como os hidroxicloretos foram mais biodisponíveis aos frangos, possivelmente pode-se reduzir a inclusão dessa fonte em relação ao sulfato sem prejuízos ao desempenho produtivo, além da diminuição da poluição ambiental pela menor excreção de minerais. Entretanto, este aspecto precisará ser melhor avaliado para auxiliar na comprovação desta hipótese. Altos níveis de Cu hidroxicloreto são capazes de melhorar o FCR, rendimento de peito, qualidade dos coxins plantares e elasticidade da pele. Enquanto isso, baixos níveis de Mn hidroxicloreto aumentam o rendimento do peito e altos níveis de MnH podem aumentar o rendimento do dorso e das asas. Além disso, os hidroxicloretos podem ser usados em substituição à fonte sulfato sem comprometer a qualidade da carne dos frangos. Diante disso, o nível 150 ppm de CuH + 80 ppm de MnH são níveis e fontes interessantes na suplementação das rações de frangos de corte com acréscimos a produtividade.

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.

REFERECES

- Alnahhas, N., Berri, C., Chabault, M., Chartrin, P., Boulay, M., Bourin, M. C., and Le Bihan-Duval, E. 2016. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genetics* 17:61-69.
- Barbut, S. Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. 1997. *Br. Poult. Sci.* 38:355-358.
- Botreau, R., Veissier, I., and Perny, P. 2009. Overall assessment of animal welfare: strategy adopted in Welfare Quality. *Anim. Welf.* 18: 363-370.

- Cavitt, L. C., Youm, G. W., and Meullenet, J. F. 2004. Prediction of poultry meat tenderness using Razor Blade shear, Allo–Kramer shear, and sarcomere length. *J. Food Sci.* 69:11-15.
- 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>.
- Cupertino, E. S., Gomes, P. C., Albino, L. F. T., Rostagno, H. S., Cecon, P. R., and Schimidt, M. 2005. Exigências de manganês para frangos de corte nas fases de crescimento e terminação. *R. Bras. Zootec.* 34:2308-2315.
- Droval, A. A., Benassi, V. T. Rossa, A., Prudencio, S. H., Paião, F. G., and Shimokomaki, M. 2014. Consumer attitudes and preferences regarding pale, soft, and exudative broiler breast meat. *J. Appl. Poult. Res.* 21:502-507.
- Finley, J. W., Caton, J. S., Zhou, Z., and Davison, K. L. 1997. Surgical model for determination of true absorption and biliary excretion of manganese in conscious swine fed commercial diets. *J. Nutr.* 127:2334-2341.
- 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.
- 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.
- Hafeez, A., Mader, A., Goodarzi Borojeni, F., Ruhnke, I., Röhe, I., Männer, K., and Zentek, J. 2014. Impact of thermal and organic acid treatment of feed on apparent ileal mineral absorption, tibial and liver mineral concentration, and tibia quality in broilers. *Poult. Sci.* 93:1754-1763.
- Harris, E. D. 1997. Copper. Pages 231-274. In *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. O'Dell, B, L., and Sunde R. A. Harris, E. D, eds, Dekker, NY.

- Honikel, K. O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci.* 49:447-457.
- Jasek, A., Coufal, C. D., Parr, T. M., Le, J. T. 2019. Evaluation of increasing manganese hydroxychloride level on male broiler growth performance and tibia strength. *J. Appl. Poult. Res.* 28:1039-1047.
- Jayasena, D. D., Samooel, J., Hyun, J. K., Young, S. B., Hae, I. Y., Jun, H. L., Jong, G. K., and Cheorun, J. 2013. Comparison of quality traits of meat from Korean native chickens and broilers used in two different traditional Korean cuisines. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 26:1038-1046.
- 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.
- Kimura, F. T.; Miller, V. L. 1957. Improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. *J. Agric. Food Chemist.* 5:216-216.
- Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed., Acad. Press, New York, NY.
- Le Bihan-Duval, E., Millet, N., and Remignon, H. 1999. Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. *Poult. Sci.* 78:822-826.
- Lu, L., Cao, J. L., Luo, X. G., Liu, B., Yu, S. X. 2006. The effect of supplemental manganese in broiler diets on abdominal fat deposition and meat quality. *Anim. Feed Sci. Tech.* 129:49-59.
- Lu, L., Luo, X. G., Ji, C., Liu, B., Yu, S. X. 2007. Effect of manganese supplementation and source on carcass traits, meat quality, and lipid oxidation in broilers. *J. Anim. Sci.* 85:812-822.
- Lu, L., Wang, R. L., Zhang, Z. J., Steward, F. A., Luo, X., and 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.

- Lucas, A. M., and Stettenhein, P. R. 1972. Avian anatomy: integument. 1st ed., United States Department of Agriculture, Washington, DC
- 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., and 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.
- Morais, S. C. D., Menten, J. F. M., Brainer, M. M. A., Vale, M. 2001. Altos níveis dietéticos de cobre no desempenho e no colesterol sérico e muscular de frangos de corte. *Scient. Agric.*, 58:1-5.
- 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.
- Nakamura, M., and Katok, K. 1985. Influence of thawing method on several properties of rabbit meat. *Bulletin of Ishika Prefecture College of Agriculture*, 11:45-49.
- National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. 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., and Padilha, P. M. 2009. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chem.* 113:679- 683.
- Nguyen, H. T. T., Morgan, N., Roberts, R., Swick, R. A., Toghyani, M. 2020. Copper hydroxylchloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels. *Poult. Sci.* 99:6964–6973, 2020.
- Oliveira, A. A., Andrade, M. A., Armendaris, P. M., and Bueno, P. H. S. 2016. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados. *Ciênc. anim. bras.* 17:79-89.

- 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., and 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.
- Philpot, S. C., Perryman, K. R., and Dozier, W. A. 2020. Growth performance and carcass characteristics of broilers fed diets varying in supplemental copper concentrations from 29 to 53 days of age. *J. Appl. Poult. Res.* 29:289-300.
- Puig, S., and Thiele, D. J. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 6:171-180.
- 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.
- Pesti, G. M., and Bakalli, R. I. 1996. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. *Poult. Sci.* 75:1086-1091.
- 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.
- Ribeiro, M. V. Programas vitamínicos e diferentes fontes minerais nas dietas de frangos de corte. 2016. 95f. (Mestrando em ciência animal) - Programa de pós-graduação em ciência animal. Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná, 2016.
- Richards, J. D., Zhao, J., Harell, R. J., Atwell, C. A., Dibner, J. J. 2010. Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. *Asian-Aust. 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.
- 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.
- Rucker, R. B., Kosonen, T., Clegg, M. S., Mitchell, A. E., Rucker, B. R., Uriu-Hare J. Y., and C. L. Keen, C. L. 1998. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:996-1002.
- Santos, T. S., Augusto, K. V. Z., Han, Y., Sartori, M. M. P., Denadai, C. T., Santos, C.T., Sobral, N. C., Roça, R. O., Sartori, J. R. 2021. High levels of copper and zinc supplementation in broiler diets on growth performance, carcass traits and apparent ileal mineral absorption. *British Poultry Science*, DOI: 10.1080/00071668.2021.1887453.
- 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.
- Suttle, N. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock*. 4^a ed. CABI Publishing, Cambridge, MA.
- Tufarelli, V., and Laudadio V. 2017. Manganese and its role in poultry nutrition: an overview. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 5:749-754.
- Werman, M. J., Barat, E., Bhathena, S. J. 1995. Gender, dietary copper and carbohydrate source influence cardiac collagen and lysyl oxidase in weanling rats. *J. Nutr.* 125:857-863.

- Yang, X. J., Sun, X. X., Li, C. Y., Wu, H. X., and Yao, J. H. 2011. Effects of copper, iron, zinc, and manganese supplementation in a corn and soybean meal diet on the growth performance, meat quality, and immune responses of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 20:263-271.
- 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.

CAPÍTULO III

HYDROXYCHLORIDE: POTENTIAL SOURCE OF Cu AND Mn

Effects of copper and manganese supplementation with hydroxychloride or sulfate source on bone quality, superoxide dismutase activity and immune responses for broilers chickens challenged with *E. coli* LPS

ABSTRACT This study was conducted to evaluate the effects of different levels and sources of Cu and Mn (sulfate or hydroxychloride - H) on bone quality, mineral content in tibia and immune and antioxidant parameters of broilers chickens. A total of 1,920 one-d-old male Cobb chicks were allocated in a completely randomized design with eight treatments and eight replicates of 30 birds each. The treatments were distributed in a 2x3+2 factorial arrangement: CuH (15 and 150 ppm) × MnH (40, 80, 120 ppm) + 15 ppm Cu sulfate with 80 ppm Mn sulfate (control 1) or 150 ppm Cu sulfate with 120 ppm Mn sulfate (control 2). At 42 d-old two birds per replicate were slaughtered for bone quality analysis: tibia dry matter (TDM), bone breaking strength (BBS), Seedor index (SI), ash content, bone densitometry by tomography, femoral degeneration (FD), black bone syndrome (BB) and content of Cu and Mn in tibia ash. At 35 d-old, 12 birds per treatment were selected for the *E.coli* LPS challenge and then, the respiratory burst of macrophages, activity of superoxide dismutase and white blood cells parameters were analyzed. The liver of the challenged chickens was collected and the relative expression of the SOD and iNOS genes was determined. Data were analyzed with Minitab® 18, and the means were compared by Tukey and Dunnett tests ($P<0.05$), for analysis of gene expression, the Kruskal-Wallis test was performed. The level 150 ppm CuH increased TDM and BBS when compared to 15 ppm. The supplementation with 80 ppm MnH proved to be efficient for tibia quality. The sulfate source showed worse means of TDM, SI, BBS, ash and, Cu and Mn contents in tibia than most levels of hydroxychlorides. By supplying 80 ppm MnH there was observed an increase in macrophage nitric oxide production and SOD activity and, upregulated the relative expression of the SOD2 in the liver

of 35-d-old broilers challenged with *E.coli* LPS. With high levels. High levels of the hydroxychloride source upregulated the relative expression of the iNOS. In conclusion, dietary broiler supplementation with 150 ppm CuH + 80 ppm MnH allowed a to improvement in bone quality, tibia mineral content, liver SOD activity/expression and NO production/expression. The hydroxychloride source seems to be more efficient than the sulfate source for bone quality and some parameters of the immune system.

Key words: Bone characteristics, chicken health, hydroxy minerals, lipopolysaccharide, respiratory burst.

INTRODUCTION

Functional nutrients can be considered a timely subject and attention has been paid on it aiming at their benefits, especially on animal health and welfare along with the basic nutrients provided. Research have indicated that supplementation of trace minerals with levels above the recommended for growth are beneficial to birds (Werman et al., 1995; Paik et al., 1999; Zhao et al., 2010; Li et al., 2011). Optimal trace mineral supplementation levels for growth could be insufficient to maintain an acceptable immune system response for birds under challenge (Santin et al., 2017).

Minerals represent about 4% of weight of birds and although necessary in lower concentrations in the body, are extremely important due to their participation in many physiological processes (Richards et al., 2010). Trace minerals are part of biomolecule structures, important for the tissue growth and maturation and are cofactors of several enzymes (Silva and Pascoal, 2014).

In this sense, the trace mineral Mn act as a cofactor in the synthesis of mucopolysaccharides and carbonate, which are essential for bone formation (Swiatkiewicz and Koreleski, 2008; Suttle, 2010). There are several manganese-dependent enzymes including arginase, phosphoenolpyruvate decarboxylase, glutamine synthetase, as well as Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) (McDowell, 2003). Meanwhile, copper is important in the initial bone formation since act as a main cofactor of lysyl oxidase, an important enzyme in the of collagen and elastin synthesis (Rucker et al., 1998), along

with its importance for the immune (McDowell, 2003) and antioxidant response for being component of the enzyme superoxide dismutase (Underwood and Suttle, 1999).

Copper and manganese are commercially available in organic, inorganic and recently as hydroximineral form. Inorganic sources of mineral supplementation are not sufficiently absorbed by animals (Upadhaya et al., 2016) and are reported to be rapidly dissociated, becoming free to interact with antagonists (Ward et al., 1996; Upadhaya et al., 2016). The hydroxychlorides of copper (Intellibond® C) and manganese (Intellibond® M) in broiler nutrition have emerged as an alternative source of mineral supplementation and are known for their great strength of chemical bonding (Cohen and Steward, 2012). They can be more stable in diets and gastrointestinal tract and, consequently more bioavailable for chickens (Perez et al., 2017; Olukosi et al., 2018; Nguyen et al., 2020).

Therefore, it is opportune to study efficient nutritional strategies to meet trace minerals requirement for broilers health and welfare without causing negative impact on the environment. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of different sources and levels of Cu and Mn on bone, immunological and antioxidant parameters to broilers chickens.

MATERIAL AND METHODS

All procedures described below were previously approved by Animal Use Ethics Committee from the São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, under protocol number 0191/2018.

Experimental design and diets

The experiment was conducted in the poultry laboratory at São Paulo State University UNESP, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu. A total of 1,920 1-d-old male Cobb chicks were allocated to eight dietary treatments in a 2x3+2 factorial arrangement. The factors were two levels of hydroxychloride Cu (15 and 150 ppm) and three levels of hydroxychloride Mn (40, 80, 120 ppm) and two additional treatments that were the controls with sulfate source (15 ppm Cu sulfate with 80 ppm Mn sulfate and 150 ppm Cu sulfate with 120 ppm Mn sulfate). Each of the eight

treatments had eight replicates and 30 birds per replicate, filling 64 pens. The levels of mineral supplementation were determined according to the levels of nutritional requirement proposed by Rostagno et al. (2011), using recommended levels, above or below the requirement.

The basal diet was formulated based on corn and soybean meal following the recommendations by Rostagno et al. (2011) in four phases: Pre-starter (d1-d7), starter (d8-d21), grower (d22-d35), and finisher (d36-d42) (**Table 1**). The premix was Cu and Mn free. Each level and source of supplementation of Cu and Mn were included in the basal diet through the replacement of limestone.

Table 1. Ingredients (%) and calculated nutritional levels of the basal diet.

Ingredients, %	Pre-starter	Starter	Grower	Finisher
	(1-7 days)	(8-21 days)	(22-35 days)	(36-42 days)
Corn, 8%	59.06	61.58	64.44	68.75
Soybean Meal, 46%	36.64	33.81	30.31	26.48
Soybean Oil	0.50	1.32	2.31	2.21
Dicalcium Phosphate	1.22	0.87	0.64	0.41
Limestone*	0.95	0.98	0.94	0.87
Salt	0.52	0.48	0.46	0.44
DL-Methionine, 99%	0.340	0.290	0.270	0.250
L-Lysine HCl, 99%	0.320	0.270	0.270	0.300
Premix ¹	0.200	0.180	0.160	0.120
L-Threonine 98,5%	0.120	0.090	0.080	0.080
Choline Chloride, 60%	0.072	0.063	0.058	0.038
Salinomycin	0.055	0.055	0.055	-
Phitase 500FTU ³	0.005	0.005	0.005	0.005
Calculated Levels				
AME ² , kcal/kg	2,964	3,050	3,150	3,200
Crude protein, %	22.39	21.20	19.80	18.40
Calcium, %	0.93	0.84	0.76	0.66
Available Phosphorus, %	0.47	0.40	0.35	0.31
Sodium, %	0.23	0.21	0.20	0.20
Potássio, %	0.87	0.83	0.77	0.71
Chlorine, %	0.42	0.39	0.37	0.37
Lysine dig, %	1.32	1.21	1.13	1.06
Methionine dig, %	0.66	0.60	0.56	0.53
Met+Cys dig, %	0.95	0.88	0.83	0.77
Threonine dig, %	0.86	0.79	0.74	0.69

¹Vitamin and trace mineral premix supplied the following per kg of diet: vitamin A, 13,500 UI; vitamin D3, 3,750 UI; vitamin E, 30 UI; vitamin K3, 3.75 mg; vitamin B1, 3 mg; vitamin B2, 9 mg; pantothenic acid, 18 mg; vitamin B6, 4.5 mg; vitamin, B12 22.5 µg; niacin, 52.5 mg; folic acid, 2.25 mg; Biotin, 0.15 mg; Se, 0.375 mg; Fe, 50 mg; Co, 1 mg; I, 1 mg; Zn Hydroxychloride, 80 mg, ² Apparent metabolizable energy, ³Used of the nutritional matrix. *Each level and source of supplementation of Cu and Mn were included in the basal diet (DB) through the replacement of limestone.

To achieve the required dietary levels of Cu in control group (15 and 150 ppm) copper sulfate monohydrate (CSM) 35% was added at the rates of 43 or 429 g/ton, respectively. To achieve the

required dietary levels of Cu hydroxychloride (15 and 150 ppm) was added 28 or 278 g/ton, respectively of CuH 54%. To achieve the required dietary levels of Mn in control group (80 or 120 ppm) sulfate monohydrate (MSM) 31% was added at the rates 258 or 387 g/ton, respectively. To achieve the required dietary levels of Mn hydroxychloride (40, 80 and 120 ppm) was added 89, 179 or 268 g/ton, respectively of MnH 44%.

Feed samples from each treatment and period was analyzed to determine Cu and Mn content (ppm) using inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS) (**Table 2**).

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.

Treatments			Analyzed levels in the diet							
Mineral Source	Cu, ppm	Mn, ppm	Pre-starter		Starter		Grower		Finisher	
			Cu, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Mn, ppm	Cu, ppm	Mn, ppm
Sulfate¹	15	80	13.00	80.64	14.25	87.99	19.03	101.59	18.09	95.06
Sulfate	150	120	142.15	125.95	142.50	137.10	132.40	127.55	134.10	132.84
hydroxychloride²	15	40	16.75	53.52	15.25	52.41	17.44	44.67	20.22	59.14
hydroxychloride	15	80	22.00	82.10	18.00	94.90	16.45	86.71	19.46	85.23
hydroxychloride	15	120	18.75	134.85	10.00	137.55	23.08	156.18	18.37	118.08
hydroxychloride	150	40	148.9	62.03	160.00	49.12	198.40	50.94	142.77	57.28
hydroxychloride	150	80	140.75	86.86	151.50	82.17	158.70	96.85	146.42	96.30
hydroxychloride	150	120	145.25	131.15	142.25	135.25	176.1	137.41	147.60	126.33

¹was used analytical grade copper sulfate monohydrate, 35% - CSM (CuSO₄ · H₂O) and manganese sulfate monohydrate, 31% – MSM (MnSO₄ · H₂O). ²were used Cu Hydroxychloride, (MnH, Selko IntelliBond C®, Trouw Nutrition) and Mn hydroxychloride (MnH, Selko IntelliBond M®, Trouw Nutrition).

Feeding and management

The experiment was carried out in a poultry house from 1 to 42 days of age. The chicks were housed in 2 m² pens on reused wood shavings. Each pen was equipped with a tubular feeder and a nipple drinking. The initial heating was performed using infrared lamps (250 watts) and at the end of the 14th day of the experiment, they were removed. The poultry house was equipped with automatic control of exhaust fans and nebulizers. Timer carried out the light program with 20-watt lamps,

obeying the lineage recommendations. Daily, the values of minimum, maximum and instantaneous temperature and relative humidity, inside the building, were measured using a digital thermo hygrometer. Mash feed and water were available *ad libitum*.

Bone parameters

At 42 day of age, after 8-h feed fast 16 broilers per treatment were selected. These broilers were euthanized by electronarcosis, followed by bleeding, scalding, and plucking. After slaughter and evisceration, the thighs were separated, identified, weighed, and frozen (-20°C) for further analysis. As to the Seedor index (SI) analysis, the left thighs were thawed, and the tissue was removed to access the tibia. Tibia length was measured using digital calipers and weighed using a precision scale (0.01 g). Bone density was evaluated through the SI, obtained by dividing the weight (mg) by the length (mm) of the tibia (Seedor, 1991). After the SI evaluation, bone breaking strength (BBS) of the tibia was determined using a testing system for Compression EMIC DL (Instron Scientific Equipment Ltda., São José dos Pinhais, Brazil) with 300 kN (67,500 lbf) capacity and each tibia was supported on a 3.00-cm span (Almeida Paz et al., 2007).

After BBS analysis, the broken tibias were later used for other measurements. All tibias were defatted using petroleum ether (P.A.) through Soxhlet extractor. After, the bones were dried at 105°C for 24 h, placed in a desiccator, and weighted to determine fat-free dry matter. Then, the tibias were placed in a muffle furnace at 600°C for 6 h and cooled in a desiccator, and the ash weight was recorded. The percentage of bone ash was obtained using the formula: Ashes (%) = (ashes, g / tibia weight, g) x 100.

Using eight right tibias per treatment, bone densitometry analysis using computed tomography was performed. The adherent tissue was removed and the bones were taken to the Veterinary Hospital of FMVZ, Unesp, Botucatu Campus for tomographic images, using a 1-channel helical tomograph following the protocol 1x1 Na 50kvp 120fov 110x35 and a tissue filter was used to express the results. After obtaining the tomographic images, densitometric readings were performed

by digitizing the images and using the computer program ClearClanvas Worksatation 2.0. Then, the bone mineral density of the tibia of the birds was measured in 5 regions (proximal epiphysis, proximal metaphysis, diaphysis, distal metaphysis and distal epiphysis). After standardization of the reading area, bone mineral density values were expressed in a Hounsfield unit (HU) according to the methodology described by Martínéz Cummer et al. (2006).

Incidence of femoral degeneration (FD) and Black Bone syndrome (BB)

At 42 day of age, after slaughtering, the right femur of 16 birds per treatment was collected and the head and neck of the bone were subjected to a macroscopic examination to evaluate the FD. For this, scores from 1 to 5 were assigned. Score 1 corresponded to bones without injury. Score 2 to injuries where there is no more cartilage on the head of the femur. Score 3 was assigned to injuries where the head of the femur had no cartilage and it was partially broken. Score 4 corresponded to lesions where the head of the femur was quite damaged and with partial contour. Score 5 the head of the femur was totally broken, without recognition of its contour (Almeida Paz et al., 2007).

For BB syndrome 16 thighs per treatment were roasted in an electric oven until internal temperature reached 90 °C. After roasting, thighs were visually assessed to determine the darkening of the femur adjacent muscle tissues. Their appearance was scored as score 1: region close to the bone did not presented any darkening); score 2: region close to the bone slightly darkened, and score 3: region close to the bone with severe darkening. (Baldo et al., 2013).

Copper and manganese content in tibia

About 100 mg of tibia ash were transferred to the Teflon flask, to which were added 3.0 mL of nitric acid 14 mol/L and 2.0 mL of hydrogen peroxide 30% m/m, and then heated in a microwave oven (Provecto Analítica model DGT-100 Plus, Campinas, Brazil) (Rosa et al., 2002). As to the copper and manganese determinations, a Shimadzu model AA-6800 atomic absorption spectrometer was used (Neves et al., 2009).

Challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide

At 35 days of age 6 birds per treatment were selected and were subjected to abdominal inoculation (1 mL/kg) with lipopolysaccharide of *Escherichia coli* (LPS, Sigma-Aldrich - ref. L2880) diluted with saline solution 0.9% (1mg/1mL). Subsequently, the respiratory burst, white blood cells and SOD activity were analyzed.

Respiratory burst assessment of macrophages: NO and H₂O₂ production

After 24h of inoculation of LPS, for each 200g of live weight 1 mL of Sephadex G-50 Fine solution (3.0%) was injected into the abdominal cavity to attract macrophages (Quereshi et al., 1986). After 24h of Sephadex inoculation, the birds were euthanized and 20 ml of cold RPMI-1640 solution was inoculated into the peritoneal cavity, shortly after the injected liquid was aspirated and stored in propylene tubes and identified. The total count of macrophages in the Neubauer chamber was performed with a trypan blue cell exclusion test. The samples were diluted or concentrated to standardize with similar cell values ($\times 10^6$ cells). After, it was evaluated the production of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂).

The macrophages NO production was measured by the colorimetric method, according to Green et al. (1982) which consists of the combination of 100 μ L of the supernatant of the test sample with 100 μ L of the Griess reagent (Need 0.1% and 1.0% sulfanilamide in 5.0% H₃PO₄). The readings were performed in an ELISA microleader at 540 nm. The results were expressed in μ moles of NO / 2.0×10^6 cells, comparing the optical density with the standard NO curve. The hydrogen peroxide test was based on the principle of the release of hydrogen peroxide by macrophages and the oxidation of phenol red by H₂O₂, which is dependent on peroxidase. The protocol was adapted by Pick and Mizel (1981) and modified by Russo et al. (1989) and the results were expressed in nmoles of H₂O₂ / 2.0×10^6 cells.

Enzymatic activity of superoxide dismutase

After 48h of challenge the broilers were euthanized by cervical dislocation and the liver was collected, immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until enzyme activity determination. Then, 1g of liver samples was homogenized in 5 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 5,000 rpm for 20 min at 4°C . Supernatant was used for SOD activity and protein content analyses. Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was assayed according to Beauchamp and Fridovich (1971), which measures one unit of SOD required inhibiting 50% of nitroblue tetrazolium (NBT). The inhibition of NBT was measured spectrophotometrically (Abs) at 560 nm. The results were expressed as U.mg pt^{-1} . For this, total protein concentration was determined by Bradford (1976) method with Coomassie brilliant blue G-250, using bovine serum albumin as a standard.

White blood cells parameters

As to leukocyte differentiation, blood was collected from the jugular vein 48h after LPS challenge using a 5 mL syringe and needles 22G. Then, it was transferred to microtubes with EDTA K3 anticoagulant. The leukocyte differentiation was performed in a blood extension stained with May-Gruenwald- Giemsa, Wright stain (Weiss and Wardrop, 2010). Differential counting was performed under a microscope at $100\times$ in immersion oil. One hundred cells were counted to establish the percentage of each cellular component. The heterophile: lymphocyte relationship was also calculated.

RNA Extraction and Quantitative Real-time PCR Analysis

After 48h of challenge the liver was collected, immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C . The RNA was extracted from a 50 mg sample of liver of 6 birds per treatment (Zhao et al., 2013). The extraction was performed using the Trizol method with 500 μL of Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for each sample to disrupt cells and release their contents. The extraction product was visualized on a 1% agarose gel and quantified using the NanoDrop instrument (ND-1000

Spectrophotometer). Afterward, samples were treated with DNase, and cDNA synthesis reaction was set as follows: a mix of oligodT solution (N = 18) 0.75 mM; random oligonucleotides (N = 8) 0.15 mM; 0.75 mM dNTP and 11 µl of RNA treated with DNase in the previous step, was prepared and incubated at 65°C for 5 minutes and then placed on ice for 1 minute. To this preparation, 0.5mM DTT, 40U of RNase out and 100U of Super Script III were added. The reaction was then incubated at 50°C for 1 hour and then at 70°C for 15 minutes.

Then, Real-time PCR analysis (RT-PCR) was performed using ABI StepOne Plus system (Applied Biosystems) and a SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primer sequences for the target and reference genes were listed in Table 3. The PCR cycle parameters were as follows: one cycle at 50°C for 2 minutes, a cycle at 94°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The dissociation curve was obtained as follows: 95°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds and 95°C for 15 seconds. To calculate the efficiency for the oligonucleotides used, four dilutions of cDNA samples were made: 1:5, 1:25, 1:125 and 1:625. The efficiency (E) was calculated using the formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$. The relative levels of mRNA expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Pfaffl, 2001), which normalized to the reference mRNA level of *β-actin*. Each sample was analyzed in triplicate.

Table 3. Primer sequences for the target and reference genes.

Gene	Accession number	Annealing temp (°C)	Primer sequence (5' -3')
<i>β-actin</i>	X00182	61	F: CAACACAGTGCTGTCTGGTGGTA R: ATCGTACTCCTGCTTGCTGATCC
iNOS	NM_204961	60	F: CAGCTGATTGGGTGTGGAT R: TTTCTTTGGCCTACGGGTC
SOD-2	NM_204211.1	59	F: CACTCTTCCTGACCTGCCTTAC R: TAGACGTCCCTGCTCCTTATTA

iNOS= Inducible nitric oxide synthase; SOD-2= Manganese-dependent superoxide dismutase

Statistical analysis

The data was submitted to normality test, and after the data were analyzed by ANOVA at the $P < 0.05$ level. Significant differences of the 2x3 factorial (CuH: 15, 150 ppm x MnH: 40, 80, 120 ppm) were determined by Tukey test at 5% of probability. In order to compare the factorial dietary treatment means with the control's treatments, the Dunnett test was performed ($P < 0.05$). Relative gene expression results were compared among treatments using the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). Gene expression was presented as fold changes relative to the control 1. The data were analyzed with Minitab® 18.

RESULTS

There was no significant Cu x Mn interaction on any of the bone response ($P > 0.05$). However, by evaluating the factors individually with 150 ppm of CuH it observed higher tibia dry matter (TDM) and bone breaking strength (BBS) for broilers at 42 d-old. Meanwhile with 80 ppm MnH higher values of SI, BBS and HU were determined ($P < 0.05$). It can be observed that 40 ppm MnH supplementation level determined the highest ash values, differing from 120 ppm ($P = 0.03$). As to the mineral sources, the sulfate showed worst means for SI and TDM than most levels of hydroxychlorides ($P < 0.05$) (**Table 4**).

Table 4. Tibia bone quality of broilers with 42 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn.

Treatments		SI, mg/mm	TDM, %	Ash, %	BBS, N	HU, CT
CuH 15ppm		174.77	48.83 ^b	51.47	44.93 ^b	268.78
CuH 150ppm		178.81	49.54 ^a	51.38	46.23 ^a	290.30
	MnH 40ppm	175.54 ^{ab}	49.26	52.04 ^a	45.88 ^{ab}	281.47 ^{ab}
	MnH 80ppm	182.39 ^a	49.28	51.31 ^{ab}	48.41 ^a	317.15 ^a
	MnH 120ppm	172.43 ^b	49.03	50.92 ^b	42.46 ^b	240.01 ^b
CuH 15ppm	MnH 40ppm	175.64 ^Y	48.83	51.95 ^X	44.70	279.40
CuH 15ppm	MnH 80ppm	180.56 ^Y	48.59 ^X	51.41	48.31	274.33
CuH 15ppm	MnH 120ppm	168.09	49.09	51.05	41.78	252.71
CuH 150ppm	MnH 40ppm	175.44 ^Y	49.69	52.13 ^X	47.07	283.65
CuH 150ppm	MnH 80ppm	184.22 ^{XY}	49.97	51.22	48.50	365.00 ^{XY}
CuH 150ppm	MnH 120ppm	176.77 ^Y	48.96	50.79	43.13	234.42
Control 1		169.85	50.21	50.35 ^b	46.63	251.30
Control 2		160.16	49.78	51.94 ^a	41.78	269.32
P - values						
CuH		0.156	0.029	0.732	0.049	0.360
MnH		0.016	0.768	0.003	0.021	0.029
CuH vs MnH		0.442	0.153	0.762	0.874	0.144
Control 1 vs all		<0.001	0.024	0.005	0.098	0.028
Control 2 vs all		<0.001	0.084	0.053	0.098	0.048
Control 1 x control 2		0.115	0.442	0.016	0.100	0.560
CV, %		9.17	3.20	2.93	18.67	57.89

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; SI= Seedor Index; TDM= tibia dry matter; BBS= bone breaking strength; HU= Hounsfield units by computed tomography (CT) CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. ^{a,b} Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. ^{X,Y} Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1 and letter "Y" differ from control 2.

In assessing the incidence of femoral degeneration and black bone syndrome, there was no difference between levels and sources ($P>0.05$). The supplementation of 120 ppm of MnH determined higher concentration of copper in tibia compared to the level of 40 ppm ($P<0.01$), and 80 ppm MnH determined higher concentration of Mn in tibia than 40 ppm MnH ($P=0.021$) (**Table 5**).

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.

Treatments		Total femoral degeneration score	Total black bone syndrome score	Cu in tibia, ppm	Mn in tibia, ppm
CuH	MnH				
CuH 15ppm		1.708	1.792	21.46	23.44
CuH 150ppm		1.708	1.646	21.67	23.15
	MnH 40ppm	1.843	1.907	20.48 ^b	22.66 ^b
	MnH 80ppm	1.500	1.532	22.00 ^b	24.40 ^a
	MnH 120ppm	1.781	1.719	22.22 ^a	22.82 ^{ab}
CuH 15ppm	MnH 40ppm	2.062	1.938	20.98 ^x	22.88
CuH 15ppm	MnH 80ppm	1.375	1.563	21.85 ^{xy}	23.36
CuH 15ppm	MnH 120ppm	1.688	1.875	21.56 ^{xy}	24.09
CuH 150ppm	MnH 40ppm	1.625	1.875	19.98 ^x	22.45
CuH 150ppm	MnH 80ppm	1.625	1.500	22.15 ^{xy}	25.45 ^{xy}
CuH 150ppm	MnH 120ppm	1.875	1.563	22.88 ^{xy}	21.55
Control 1		2.063	1.625	14.74 ^b	21.72
Control 2		1.500	1.813	18.63 ^a	22.78
P - values					
CuH		0.999	0.376	0.714	0.606
MnH		0.397	0.184	0.025	0.021
CuH vs MnH		0.370	0.771	0.246	0.052
Control 1 vs all		0.359	0.551	<0.001	0.002
Control 2 vs all		0.598	0.441	<0.001	0.004
Control 1 vs. control 2		0.128	0.456	<0.001	0.329
CV. %		61.12	35.06	24.47	20.92

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. ^{a,b} Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. X,Y Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1 and letter "Y" differ from control 2.

The production of H₂O₂ and NO by macrophages were higher when broilers received 150 ppm CuH (P <0.05). The supplementation level of 80 ppm MnH determined higher SOD activity, and nitric oxide production for broilers. In general, the broilers supplemented with the hydroxychloride source had higher Enzyme SOD activity, NO and H₂O₂ production. (Table 6).

Table 6. Production of hydrogen peroxide (H₂O₂, nmol/2 × 10⁶ cells) and nitric oxide (NO, μmol/2 × 10⁶ 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.

Treatments		H ₂ O ₂ , nmol/2×10 ⁶ cells	NO, μmol/2×10 ⁶ cells	SOD in liver, U.mg pt ⁻¹
CuH 15ppm		0.1614 ^b	5.240 ^b	10.973
CuH 150ppm		0.2329 ^a	6.904 ^a	10.728
	MnH 40ppm	0.1969	5.064 ^b	10.281 ^b
	MnH 80ppm	0.2077	7.868 ^a	11.785 ^a
	MnH 120ppm	0.1869	5.285 ^b	10.495 ^b
CuH 15ppm	MnH 40ppm	0.1592	4.343	10.760 ^x
CuH 15ppm	MnH 80ppm	0.1764	6.561 ^{xy}	11.639 ^{xy}
CuH 15ppm	MnH 120ppm	0.1487	4.737	10.092 ^x
CuH 150ppm	MnH 40ppm	0.2348 ^x	5.148	9.802
CuH 150ppm	MnH 80ppm	0.2391 ^{xy}	9.179 ^{xy}	11.879 ^{xy}
CuH 150ppm	MnH 120ppm	0.2254 ^x	5.834	11.204 ^{xy}
Control 1		0.1504	5.339	8.753 ^b
Control 2		0.1948	5.716	10.136 ^a
P - values				
CuH		0.045	0.046	0.628
MnH		0.906	0.032	0.042
CuH vs MnH		0.987	0.830	0.177
Control 1 vs all		0.031	0.040	0.025
Control 2 vs all		0.049	0.048	0.045
CV. %		61.12	35.06	24.47

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. a,b Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. X,Y Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1 and letter "Y" differ from control 2.

The supplementation 15 of ppm of CuH along with 40 ppm of MnH determined lower basophil count compared to sulfate source in LPS challenged chickens. Broilers chickens that received 40 ppm MnH had lower basophil counts (**Table 7**).

Table 7. White blood cells parameters with broilers challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide of broilers with 35 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn.

Treatments	Het, %	Lymp, %	Eosin, %	Mono, %	Baso, %	LT, mm ³	H:L
CuH 15ppm	42.92	40.47	5.16	5.33	5.85	18083	1.177
CuH 150ppm	41.28	43.02	5.47	5.14	5.16	17583	1.075
MnH 40ppm	42.71	42.87	5.20	5.29	3.54 ^b	18625	1.090
MnH 80ppm	41.58	41.41	6.00	4.58	6.45 ^a	17500	1.128
MnH 120ppm	42.00	40.96	4.74	5.83	6.53 ^a	17375	1.161
CuH 15ppm MnH 40ppm	42.92	42.17	5.58	5.92	2.58 ^{xy}	19500	1.069
CuH 15ppm MnH 80ppm	41.42	41.08	5.50	4.58	7.33	17917	1.087
CuH 15ppm MnH 120ppm	44.42	38.17	4.41	5.50	7.66	16833	1.375
CuH 150ppm MnH 40ppm	42.50	43.58	4.83	4.66	4.50	17750	1.110
CuH 150ppm MnH 80ppm	41.75	41.75	6.50	4.58	5.58	17083	1.169
CuH 150ppm MnH 120ppm	39.58	43.75	5.08	6.17	5.41	17917	0.947
Control 1	41.50	40.75	5.50	7.33	4.91	15417	1.120
Control 2	44.58	39.67	5.58	5.66	4.50	16333	1.165
P values							
CuH	0.435	0.275	0.729	0.813	0.411	0.714	0.468
MnH	0.906	0.782	0.504	0.463	0.006	0.711	0.916
CuH vs MnH	0.553	0.650	0.689	0.627	0.094	0.687	0.259
Control 1 vs all	0.755	0.275	0.225	0.109	0.551	0.165	0.178
Control 2 vs all	0.555	0.200	0.390	0.445	0.559	0.198	0.188
CV, %	19.47	22.77	68.04	63.63	68.52	31.71	47.85

CuH= Cu Hydroxychloride; MnH= Mn Hydroxychloride; CV= coefficient of variation. Control 1= 15 ppm Cu sulfate + 80 ppm Mn sulfate; Control 2= 150 ppm Cu sulfate + 120 ppm Mn sulfate. a,b Means of factors followed by different lowercase letters differ by Tukey's test. X,Y Controls were tested by Dunnett's test and means followed by letter "X" differ from control 1 and letter "Y" differ from control 2.

All gene expression analysis results are presented as fold changes compared to the control 1 (15 ppm CSM + 80 ppm MSM) (**Figure 1**). Expression of iNOS in the liver was upregulated in birds that received the 80 ppm MnH with 15 or 150 ppm CuH and 40 ppm MnH+150 ppm CuH than other treatments. Expression of SOD-2 in the liver was upregulated in birds that received the 80 ppm MnH with 15 or 150 ppm CuH and 120 ppm MnH + 150 ppm CuH. Birds fed diets supplemented with high levels of manganese from the hydroxychloride source determined upregulation of SOD-2 in the liver. The sulfate source determined downregulation of the iNOS and SOD-2 genes when compared to most treatments using the hydroxychloride source.

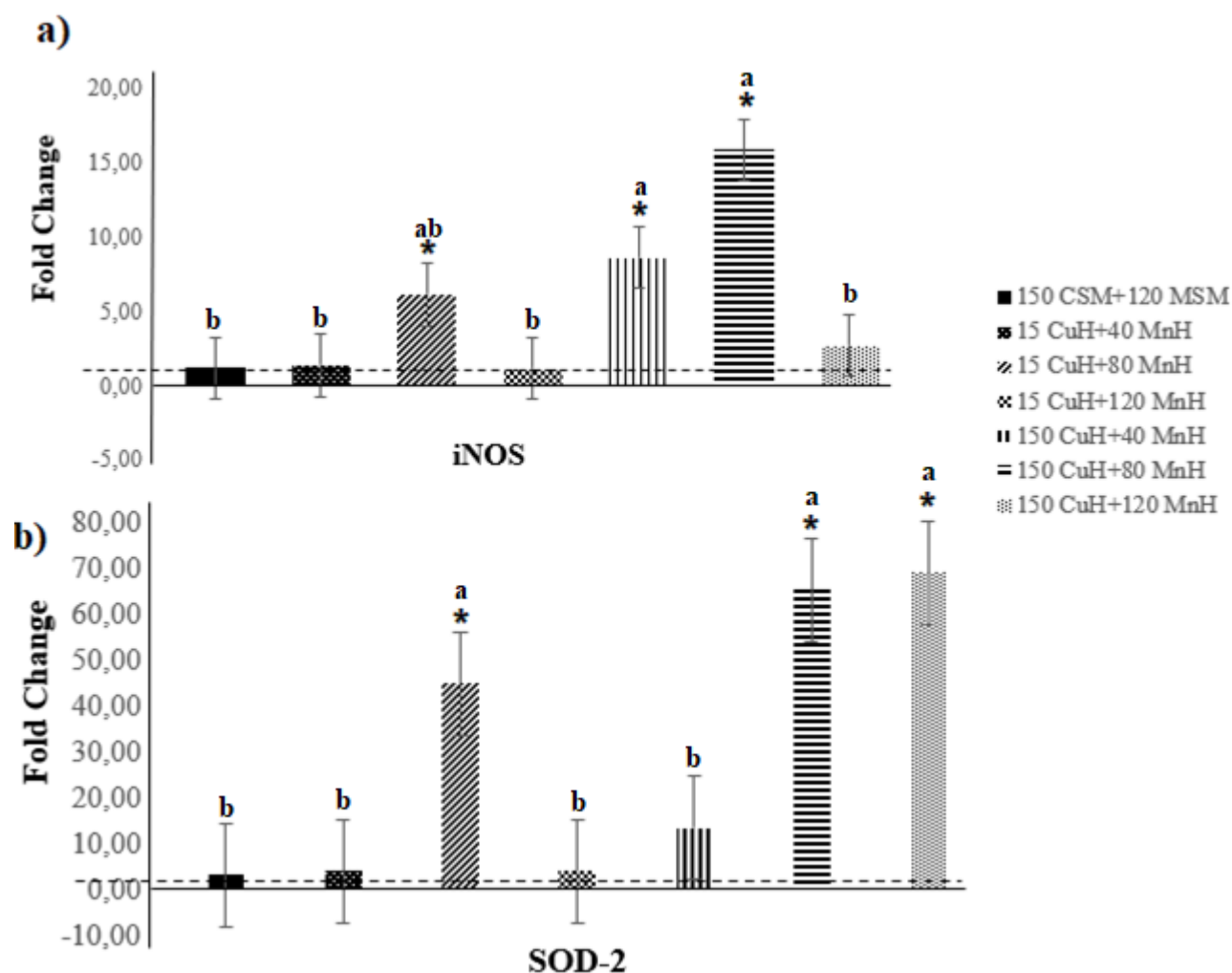


Figure 1. iNOS (a) and SOD-2 (b) relative gene expression in liver of broiler chickens with 35 days of age supplemented with different sources and levels of Cu and Mn and challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Tissue samples were collected of six birds per treatment and analysed using 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.

DISCUSSION

Este estudo foi conduzido com a hipótese de que a substituição da fonte sulfato pela fonte hidroxiclreto pode melhorar a qualidade óssea e a saúde de frangos de corte por ser uma fonte mais biodisponível.

A inclusão dietética de fontes hidroxiclreto de cobre e manganês determinou melhores resultados para a qualidade óssea, sistema imunológico e antioxidante dos frangos de corte. Especialmente, com o nível 80 ppm MnH + 150 ppm CuH foi possível melhorar a qualidade das tíbias das aves. Com 80 ppm MnH também foi possível aumentar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos e atividade SOD hepática além da maior expressão relativa dos genes SOD2 e iNOS dos frangos desafiados com LPS de *E.coli*.

Com maiores valores de Cu suplementados na ração é possível que ocorra maior estímulo da lisil oxidase, enzima que atua na formação das ligações cruzadas de colágeno e elastina, ao adicionar um grupo hidroxila com a lisina, conferindo rigidez e elasticidade aos tecidos (Richards et al., 2010). Dessa forma, indiretamente o cobre promove maior resistência dos ossos por ser cofator dessa enzima (McDowell, 2003). O aumento da matéria seca das tíbias dos frangos quando altos níveis de Cu foram utilizados pode ter ocorrido pela maior síntese e maturação de colágeno e elastina por ação da enzima lisil oxidase, já que não houve diferença para o teor de cinzas. Além disso, foi encontrado maior resistência óssea (BBS) com o nível 150 ppm de CuH, comprovando esse possível aumento na síntese de colágeno e elastina que irá conferir elasticidade e rigidez dos ossos. Segundo Rucker et al. (1998) e Dibner et al. (2007) o cobre está entre os minerais considerados essenciais para o desenvolvimento dos ossos nas aves, principalmente por favorecer o crescimento e a resistência óssea.

A suplementação de manganês com a fonte hidroxiclreto no nível de 80 ppm favoreceu a qualidade dos ossos. Esse nível está próximo ao recomendado por Rostagno et al. (2017), de 70 ppm, e pelo NRC (1994) de 60 ppm, sendo assim está suprimindo as exigências nutricionais dos frangos. Gajula et al. (2011) afirmaram que o Mn no nível de 60 ppm, seria suficiente para o desempenho dos frangos e dos parâmetros ósseos. Foi possível constatar que a adição de 80 ppm de Mn hidroxiclreto resultou no aumento da densidade mineral óssea medida pela escala Hounsfilde nos ossos da tíbia dos frangos com relação a fonte sulfato, fato este que também foi constatado no índice de Seedor.

Altos níveis de manganês não foram benéficos para a qualidade das tíbias dos frangos de corte. Níveis de Mn acima da exigência podem prejudicar a qualidade das tíbias (Gajula et al., 2011) e a absorção de outros minerais importantes para os ossos como o zinco, por competirem no trato gastrointestinal pelos mesmos sítios de absorção (Cozzolino, 1997). Além disso, a suplementação com níveis acima da exigência não foi capaz de aumentar a concentração desse mineral nas tíbias, desse modo, há um limite para a deposição óssea de Mn, ou seja, mesmo que aumente o nível da suplementação não há aumento da deposição.

O nível de suplementação do MnH de 40 ppm, não determinou bons resultados para o índice de Seedor (SI) e o conteúdo de Cu e Mn nas tíbias foi baixo quando comparado com os demais tratamentos. A suplementação da ração de frangos de corte com baixos níveis de Mn há aumento da incidência de osteoblastos danificados, membrana externa mitocondrial incompleta e membrana nuclear encolhida (Liu et al., 2015). Com redução dos osteoblastos viáveis a formação óssea fica comprometida bem como a densidade mineral óssea, expresso pelo menor índice de Seedor. Liu et al. (2015) verificaram que com a suplementação de 40 ppm de Mn as tíbias apresentaram menor comprimento em relação ao grupo que foi suplementado com 60 ppm.

Por se tratar de uma fonte mineral mais recente, há poucos estudos utilizando os hidroxicloretos na avicultura, principalmente sobre a interação do cobre com o manganês. De maneira geral, no presente estudo foi verificado que os frangos suplementados com a fonte sulfato determinaram menores valores do índice de Seedor, densitometria óssea, matéria seca, teor de cinzas e conteúdo de cobre e manganês nas tíbias, quando comparados os hidroxicloretos. Isso pode ser explicado pelo fato que essa fonte é conhecida por ser mais biodisponível (Miles et al., 1998; Luo et al., 2005; Lu et al., 2010; Cohen and Steward, 2012; Olukosi et al., 2018). Em especial o tratamento 150 ppm de CuH + 80 ppm MnH determinou melhores resultados para os frangos de corte na avaliação óssea.

Os menores níveis de Mn da fonte hidroxicloreto foram suficientes para que igualasse aos resultados observados com o nível mais elevado de Mn da fonte sulfato. Isso mostra que os hidroxicloretos possuem mais estabilidade nas rações e formam menos reações antagonistas no sistema digestivo (Luo et al., 2005). Sendo assim, a fonte hidroxicloreto pode ser utilizada com níveis menores que a fonte sulfato sem efeito negativo nos parâmetros ósseos dos frangos de corte (M'Sadeq et al., 2018).

As maiores concentrações de Mn podem gerar interações antagônicas dentro dos enterócitos levando a menor deposição do Cu nas tíbias (Cozzolino et al., 1997). O cobre e o manganês são íons com carga semelhantes e, na absorção passiva, sofrem reações antagônicas por competirem por sítios semelhantes (Silva and Pascoal, 2014).

A degeneração femoral (FD) e da síndrome do osso negro (BB) estão relacionadas com patologias locomotoras dos frangos e a redução da incidência dessas anomalias são de grande interesse para as indústrias, pois problemas locomotores resultam em pior desempenho e comprometem o bem-estar das aves (Almeida Paz et al., 2009). Os escores da FD e da BB síndrome ficaram próximos aos valores aceitáveis nas aves de todos os tratamentos. Isso pode ser explicado pois não houve nenhuma dieta com total deficiência de cobre e manganês e também não houve valores extremamente baixos para a densidade mineral óssea e índice de Seedor, já que isso é um fator predisponente ao aparecimento da FD e BB (Korver, 2010).

Os macrófagos produzem óxido nítrico (NO) em resposta a estímulos inflamatórios, por regulação positiva da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Schat et al., 2014). A NOS oxida o aminoácido arginina em NO e citrulina enquanto que a enzima arginase (dependente de manganês) converte a arginina em ornitina e ureia (Schat et al., 2014). Há relação de competição entre a arginase e a NOS, pois o substrato de ambas é comum (Prabhakar et al., 1997). Os frangos suplementados com o nível 80 ppm de Mn da fonte hidroxicloreto apresentaram maior valor de produção do NO pelos macrófagos e atividade da SOD hepática. Isso mostra que a suplementação com

altos níveis de Mn pode limitar a ação da NOS, enquanto 40 ppm foi deficiente ao sistema da ave. Diante disso, com o nível 80 ppm de Mn é possível induzir a uma boa resposta imunológica e antioxidante. O nível de 80 ppm de MnH é o nível e a fonte interessante com efeito imunoestimulante nas aves (Zhang et al., 2020).

O nível 150 ppm de CuH conferiu em maior produção de H_2O_2 . O cobre atua na imunidade celular e humoral (Prohaska e Failla, 1993), atividade de superóxido dismutase (Jones e Suttle, 1981, Stabel e Spears, 1990, Gengelbach et al., 1997), proliferação de células T, produção de citocinas e produção de anticorpos (Stabel e Spears, 1990).

A suplementação da ração de frangos de corte desafiados com LPS utilizando a fonte hidroxicloreto de Mn é capaz de aumentar a atividade da SOD do fígado de frangos em comparação a fonte sulfato (Perez et al., 2017), principalmente ao utilizar o nível 80 ppm MnH. Zheng et al. (2018) relataram que a fonte hidroxicloreto aumentou a atividade da SOD no soro de suínos na fase de terminação.

A maior biodisponibilidade da fonte hidroxicloreto pode explicar o aumento da atividade da SOD do que os sulfatos (Perez et al., 2017; Zheng et al., 2018). As ligações covalentes dos hidroxicloretos são mais fortes que as ligações iônicas dos sulfatos e por isso melhoram a estabilidade dos componentes das rações e a biodisponibilidade dos minerais (Cohen and Steward, 2012). Miles et al. (1998) e Lu et al. (2010) verificaram que os hidroxicloretos foram menos reativos na ração e mais biodisponíveis do que outras formas inorgânicas.

Os frangos que receberam 40 ppm de MnH obtiveram menores valores de basófilos. Apesar da ação dos basófilos ainda não ser totalmente elucidada em frangos, essas células apresentam participação no processo inflamatório pela liberação do mediador inflamatório histamina e pela fagocitose dos patógenos (Macari et al., 2002). Sendo assim, o aumento dos basófilos ocorre em processos infecciosos (Weiss and Wardrop, 2010). Esse nível também produziu menos óxido nítrico

pelos macrófagos durante o Burst respiratório. Dessa forma, pode ser considerado um nível ineficiente para o sistema imune.

Os frangos suplementados com 15 ppm de CuH com 80 ou 120 ppm de MnH determinaram maiores valores de basófilos. Com esses níveis de suplementações pode ocorrer maior produção dessas células para auxiliar no processo inflamatório ocorrido pela administração do LPS de *E. coli* na cavidade abdominal.

O cobre, o manganês e a fonte utilizada foram capazes de regular a expressão gênica nas aves desafiadas com LPS *E.coli*. Com o uso da fonte sulfato, quando comparado os mesmos níveis da fonte hidroxiclreto, os frangos determinaram menor expressão relativa dos genes SOD2 e iNOS mostrando que por ser mais biodisponível (Miles et al., 1998; Lu et al., 2010 e M'Sadeq et al., 2018) os hidroxicloreto são capazes de regular positivamente tanto a expressão gênica como a produção/atividade da SOD e iNOS.

Perez et al. (2017) também verificaram que quantidades maiores da suplementação de frangos de corte com manganês e zinco utilizando a fonte hidroxiclreto, em comparação com a fonte sulfato, aumentou a expressão relativa da SOD, IL-1 e catelicidinas e atividade da SOD.

Em especial, utilizando 80 ppm de MnH é possível melhorar a depuração de radicais livres principalmente durante processos infecciosos, melhorando a saúde desses animais frente à desafios. Com o uso da fonte hidroxiclreto também foi determinado possível efeito imunoestimulante, especialmente quando os frangos foram suplementados com altos níveis de MnH com 15 ou 150 ppm CuH.

Semelhante a este estudo, Li et al. (2004) determinaram que com o aumento da suplementação de Mn há aumento da expressão relativa da SOD2 nas células cardíacas dos frangos de corte (LI et al., 2004). Goel et al. (2013) determinaram maior expressão relativa de genes relacionados à imunidade celular, como IL-12 e o gene iNOS em pintainhos submetidos à nutrição *in ovo* com cobre.

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 hidroxicloreto 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 hidroxicloreto (CuH) com 40 ou 80 ppm de Mn Hidroxicloreto (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.