

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE HIDROXICLORETO DE COBRE E MANGANÊS SOBRE A QUALIDADE ÓSSEA DE FRANGOS DE CORTE

*Paola Aparecida Damázio Rodrigues¹, Priscila Michelin Groff-Urayama¹, Cássio Yutto Oura¹, Tatiane Souza dos Santos¹, Karolina Von Zuben Augusto², Laís Garcia Cordeiro¹, José Roberto Sartori¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Botucatu, SP. Autor correspondente: paola.damazio@unesp.br

²Trouw Nutrition R&D, Campinas, SP.

Apresentado no
19º Seminário Técnico Científico de Aves, Suínos e Peixes
5º Congresso de Zootecnia de Precisão
AveSui 2021 – 13 a15 de abril de 2021 – Lar Centro de Eventos / Medianeira - PR, Brasil

RESUMO: Este estudo teve como objetivo analisar a suplementação dos hidroximinerais de cobre e manganês na dieta de frangos de corte e seus efeitos na qualidade óssea quando comparados com a fonte sulfato. Para isso, foram alojados 1920 pintinhos machos, com um dia de idade e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 8 repetições totalizando 64 parcelas com 30 aves cada. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial 2x3+2, dois níveis de cobre (15 e 150 ppm) e 3 níveis de manganês (40, 80 e 120 ppm) ambos na fonte hidroximineral e mais dois tratamentos adicionais: controle low (ração basal com suplementação de 15 ppm de sulfato de cobre e 80 ppm de sulfato de manganês) e controle high (ração basal com sulfato de cobre 150 ppm e 120 ppm de sulfato de manganês). Para fins quantitativos foi analisado a qualidade óssea das tíbias, testando a resistência e densidade óssea, a quantidade de matéria seca, o teor de cinzas e a concentração de cobre e manganês. A suplementação com hidroxicloreto no nível 80 ppm Mn e de Cu no nível 150 ppm foi a que apresentou os melhores índices de qualidade óssea nos frangos de corte aos 42 dias de idade.

PALAVRA-CHAVE: desenvolvimento ósseo, hidroximinerais, nutrição.

ABSTRACT: This study aimed to analyze the supplementation of hydroximineral of copper and manganese in the diet of broilers and their effects on bone quality when compared to the sulfate source. For this purpose, 1920 one-day-old male chicks were housed and distributed in a completely randomized design with 8 treatments and 8 repetitions totaling 64 plots with 30 birds each. The treatments were distributed in a factorial arrangement 2x3 + 2, two levels of copper (15 and 150 ppm) and 3 levels of manganese (40, 80 and 120 ppm) both in the hydroximineral source and two additional treatments: low control (basal diet with supplementation of 15 ppm of copper sulphate and 80 ppm of manganese sulphate) and high control (basal diet with copper sulphate 150 ppm and 120 ppm of manganese sulphate). For quantitative purposes, bone quality of the tibia was analyzed, testing bone strength and density, the amount of dry matter, the ash content and the concentration of copper and manganese. The supplementation with hydroxychlorides at 80 ppm Mn and Cu at 150 ppm was the one with the best bone quality indexes in broilers at 42 days of age.

KEYWORDS: bone development, hydroxy-minerals, nutrition.

INTRODUÇÃO: Tendo em vista uma melhor qualidade óssea nos frangos de corte, pode-se realizar a suplementação de microminerais, como cobre e manganês, que desempenham um papel importante no tecido ósseo. O manganês tem como uma das funções principais a formação da cartilagem, sendo fundamental no crescimento epifisário (Leach e Muenster, 1962). Enquanto que o cobre tem ação na fase inicial do desenvolvimento ósseo, visto que ele é o principal cofator da lisil-oxidase, enzima importante na formação das subunidades de colágeno e elastina (Rucker et al., 1998). Devido à baixa biodisponibilidade dos microminerais inorgânicos, tradicionalmente ocorre sua suplementação das rações com valores acima da exigência aumentando o custo e a poluição ambiental, já que os minerais nas excretas vão se acumulando no solo e lençóis freáticos. Por isso, é de suma importância estudar novas fontes de suplementação, como os hidroximinerais, pois estas vêm se apresentando como alternativa para superar estes desafios, já que apresentam maior biodisponibilidade, melhor custo benefício e proporcionam maior estabilização na ração contribuindo positivamente com o desenvolvimento das aves (Agapito e Seyboth, 2017). Entretanto, ainda não há estudos da associação da suplementação via hidroximineral com cobre e manganês na dieta de frangos de corte e seus efeitos no desenvolvimento e qualidade óssea destes. Sendo assim esta pesquisa tem como objetivo analisar os efeitos dos hidroximinerais de Cu e Mn na qualidade óssea de frangos de corte em comparação com a fonte referência, os sulfatos.

MATERIAL E MÉTODOS: O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, no Laboratório de Nutrição de Aves. Foram utilizados 1920 pintinhos machos com 1 dia de vida oriundos de matrizes da linhagem Cobb 500® com 40 semanas de idade, vacinados contra Marek, Boubá Aviária e Gumboro. Foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com o arranjo fatorial 2x3+2, com 8 tratamentos e 8 repetições, com 30 aves por unidade experimental. Os tratamentos foram compostos por dois níveis de suplementação de cobre e três níveis de suplementação de manganês, oriundos de fonte hidroximineral e mais dois grupos controle, com suplementação de Cu e Mn na forma de sulfato: T1: (Controle low) 15 ppm de sulfato de Cu e 80 ppm de sulfato de Mn; T2: (Controle high) 150 ppm de sulfato de Cu e 120 ppm de sulfato de Mn; T3: 15 ppm de hidroximineral de Cu e 40 ppm de hidroximineral de Mn; T4: 15 ppm de hidroximineral de Cu e 80 ppm de hidroximineral de Mn; T5: 15 ppm de hidroximineral de Cu e 120 ppm de hidroximineral de Mn; T6: 150 ppm de hidroximineral de Cu e 40 ppm de hidroximineral de Mn; T7: 150 ppm de hidroximineral de Cu e 80 ppm de hidroximineral de Mn; T8: 150 ppm de hidroximineral de Cu e 120 ppm de hidroximineral de Mn.

Aos 42 dias de idade, dois frangos de cada unidade experimental (16 por tratamento), próximos do peso médio da parcela, foram abatidos por deslocamento cervical para coleta das pernas direita e esquerda, as quais foram congeladas a -20°C para posteriores análises:

- A) Avaliação do índice de Seedor (IS) e resistência óssea a quebra: Para a análise do IS foram usados ossos descarnados *in natura*, que foram pesados em balança analítica ($\pm 0,001$ g) e medidos com paquímetro digital (0 a 150 mm e precisão de 0,01 mm). O IS foi obtido dividindo-se o peso do osso (mg) pelo seu comprimento (mm) (Seedor et al., 1991). Quanto mais elevado o valor encontrado, maior a densidade da peça óssea. A análise de resistência óssea foi realizada nos mesmos ossos após a avaliação do IS. Foi utilizado o aparelho EMIC DL 300kN regulado para permitir que o vão livre da diáfise seja de 3,0 cm. A partir da fixação de um vão livre para a realização das

avaliações de resistência, pode-se comparar os valores (kgf) encontrados (ALMEIDA PAZ et al., 2006).

- B) Análise da Densitometria mineral óssea (DMO): Para esta análise foram feitas as imagens tomográficas dos ossos descarnados *in natura* por meio de um tomógrafo helicoidal de 1 canal seguindo o protocolo 1x1 Na 50kvp 120fov 110x35 e foi utilizado filtro de tecido ósseo para expressão dos resultados. Em seguida foram feitas as leituras densitométricas através da digitalização das imagens e utilização do programa computacional ClearClanvas Worksatation 2.0. A densidade mineral óssea da tíbia das aves foi mensurada em 5 regiões (epífise proximal, metáfise proximal, diáfise, metáfise distal e epífise distal) e dentro dessas regiões foi realizado a subdivisão em 3 partes. Após a padronização da área de leitura os valores de densidade óptica foram expressados em unidade Hounsfield (HU) segundo metodologia descrita por Martínéz Cummer et al. (2006).
- C) Matéria seca e teor de cinzas nas tíbias: após a análise de resistência óssea, os ossos foram pesados em balança semianalítica com precisão de 0,001 gramas, secos a 105°C em estufa de circulação forçada de ar pelo período de 24 horas, levados ao dessecador por uma hora para esfriar e pesados novamente para obter o valor de matéria seca. Em seguida os ossos foram desengordurados em éter de petróleo utilizando extrator Soxhlet pelo período de 5 horas, levados a estufa a 105°C pelo período de 12 horas, e após uma hora no dessecador, pesados novamente. A etapa seguinte foi a calcinação, foi realizada a lavagem dos cadinhos com detergente neutro; imersão em solução de ácido nítrico a 10% para evitar qualquer tipo de contaminação com resíduos de outros minerais; lavagem em água corrente e água destilada; secos em estufa a 105°C e depois levados ao dessecador para esfriar. Em seguida os cadinhos foram pesados sem amostra e depois com amostra e em seguida levados a mufla pelo período de 4 horas a 600°C. As cinzas ósseas foram determinadas com base na matéria seca desengordurada e expressa porcentagem de cinzas (Método 972.15 AAFCO, 2000). A porcentagem de cinzas ósseas foi obtida pela fórmula: Porcentagem de Cinzas Ósseas = (Peso da Cinza (g) / Peso do Osso (g)) x 100.
- D) Concentração de cobre e manganês nas tíbias: para determinação das concentrações de cobre e manganês nas tíbias foram pesados 100 mg das cinzas em triplicata. Após a pesagem, as amostras foram colocadas em tubo de digestão, logo em seguida, as amostras foram digeridas adicionando-se 1 ml de ácido clorídrico a 37% P.A. e 0,4 ml de peróxido de hidrogênio 30% P.A., o volume final da digestão foi volumado para 25 ml com água ultrapura. Após isso, foi obtido a concentração do manganês e cobre, utilizando o método de espectrofotometria de absorção atômica modelo SHIMADZU AA-6800 de acordo com Neves et al. (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 1. Parâmetros de qualidade óssea da tíbia de frangos de corte com 42 dias de idade suplementados com diferentes níveis de hidroxiclreto de cobre e manganês.

CuOHCl	MnOHCl	IS (mg/mm)	MS (%)	Cinzas (%)	Resistência óssea (kgf)	Cu na tíbia (ppm)	Mn na tíbia (ppm)	UH (CT)
15	-	174,77	48,83 ^b	51,47	44,93 ^b	21,46	23,44	268,78
150	-	178,81	49,54 ^a	51,38	46,23 ^a	21,67	23,15	290,30
	40	175,54 ^b	49,26	52,04 ^a	45,88 ^{ab}	20,48 ^b	22,66 ^b	281,47 ^{ab}
	80	182,39 ^a	49,28	51,31 ^{ab}	48,41 ^a	22,00 ^{ab}	24,40 ^a	317,15 ^a
	120	172,43 ^b	49,03	50,92 ^b	42,46 ^b	22,22 ^a	22,82 ^b	240,01 ^b

	P – values						
CuOHCl	0,156	0,029	0,732	0,049	0,714	0,606	0,360
MnOHCl	0,016	0,768	0,003	0,021	0,025	0,021	0,029
CuOHCl vs MnOHCl	0,442	0,153	0,762	0,874	0,246	0,052	0,144
CV (%)	9,17	3,20	2,93	18,67	24,47	20,92	57,89

CuOHCl: Hidroxicloreto de Cobre; MnOHCl: Hidroxicloreto de Manganês; IS: Índice de Seedor; MS: Matéria seca; UH: Unidade Hounsfield; CV: Coeficiente de variação. ^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada fator, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

Não houve interação para nenhuma das variáveis estudadas (P>0,05), entretanto, avaliando-se os fatores isoladamente, para o hidroxicloreto de cobre, no nível 150 ppm obteve-se maiores valores de matéria seca (MS) em relação ao nível baixo de 15ppm. O cobre é cofator da enzima lisil oxidase, desse modo a alta suplementação de cobre resultou em maior estímulo da enzima lisil oxidase, sendo esta responsável pela formação e maturação das ligações cruzadas do colágeno e da elastina (MCDOWELL, 1992), aumentando, assim, a MS. Além disso, houve maior resistência óssea à quebra no nível 150 ppm de CuOHCl, comprovando possível aumento na produção de colágeno e elastina que irão conferir em elasticidade e rigidez óssea, corroborando as considerações de Dibner et al. (2007) de que o cobre está entre os minerais considerados essenciais para o desenvolvimento desses tecidos ósseos.

Enquanto isso, para o hidroxicloreto de manganês, foi observado diferença estatística no índice de Seedor, teor de cinzas, resistência óssea e concentração de cobre e manganês nas tíbias. Com o nível 80 ppm foi observado maiores valores de índice de Seedor, resistência óssea, densidade mineral óssea e concentração de manganês nas tíbias. Foi possível constatar que a adição de manganês a 80 ppm de hidroxicloreto resultou no aumento significativo da densidade mineral óssea (DMO) no osso da tíbia, em relação a fonte sulfato, fato este que também foi constatado no índice de Seedor. Foi observado que as concentrações de 40 ppm e 120 ppm não favoreceram a DMO. Os resultados do presente estudo corroboram os encontrados por Hartnett et al (2019), pois quando a suplementação mineral de manganês foi de 51,45 ppm, resultou no aumento da densidade mineral óssea.

A quantidade de Mn e a densidade óssea na tíbia foram maiores nos frangos que receberam 150 ppm de Cu e 80 ppm de manganês na forma Hidroxicloreto em relação aos que receberam os tratamentos controles. A inclusão de maiores níveis de Cu e Mn na forma de sulfato na dieta nos frangos do controle 2 aumentou a quantidade de cinzas e Cu na tíbia em relação aos do controle 1.

Avaliando os controles (fonte sulfato) em relação aos tratamentos utilizando a fonte hidroxicloreto, foi possível observar que para o índice de Seedor, matéria seca e concentração de cobre e manganês nas tíbias que os controles demonstraram piores médias do que alguns tratamentos utilizando os hidroxicloretos. Isso pode ser explicado pelo fato que essa nova fonte apresenta maior biodisponibilidade, pois permite a liberação controlada dos minerais no trato gastrointestinal, aumentando a probabilidade do mineral chegar ao sítio de absorção nos enterócitos (AGAPITO e SEYBOTH, 2017). Luo et al. (2005) e Olukosi et al. (2018) relataram que o hidroxicloreto de cobre apresenta biodisponibilidade maior ou igual a do sulfato.

CONCLUSÃO: O uso das fontes hidroxicloreto de cobre e de manganês melhora a qualidade óssea de frangos de corte aos 42 dias quando comparadas com as fontes sulfato. A suplementação com hidroxicloretos de Mn no nível 80 ppm Mn e de Cu no nível 150 ppm proporciona os melhores resultados para parâmetros de qualidade óssea de frangos de corte aos 42 dias de idade.

AGRADECIMENTOS: À Fapesp pela bolsa concedida (IC - Processo 2019/24947-3) e à Trouw Nutrition pela parceria e financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AAFCO, Association of American Feed Control Officials, 2000.

AGAPITO, G., SEYBOTH, L. Hidroxi-minerais: uma nova abordagem para uso de minerais em todas espécies animais, *Avicultura Industrial*, v.2, n.2, p.31-32, 2017.

ALMEIDA PAZ, I.C.L., MENDES, A.A., QUINTEIRO, R.R., VULCANO, L. C., TAKAHASHI, S.E., GARCIA, R.G., KOMIYAMA, C.M., BALOG, A., PELICIA, K., WESCHELER, F.S., PICCININ, A. Bone mineral density of tibia and femur of broiler breeders: growth, development and production. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 8, p. 75-82, 2006.

DIBNER, J.J., RICHARDS, J.D., KITCHELL M.L. et al. Metabolic challenges and early bone development. *The Journal of Applied Poultry Research*, v.16, p.126-137, 2007.

HART NETT, P., BOYLE, L., YOUUNGE, B., O'DRISCOLL, K. O efeito da composição do grupo e da suplementação mineral durante a criação nas medidas da condição da cartilagem e densidade mineral óssea em marrãs de reposição. *Animais*, v. 9, n. 9, p. 637, 2019.

LEACH, R.M., MUENSTER, A.M. Studies on the role of manganese in bone formation. *The Journal of Nutrition*, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 51-56, 1962.

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.

MARTINÉZ CUMMER, M.A., HECK, R., LEESON, L. Use of Axial X-Ray Microcomputed Tomography to Assess Three-Dimensional Trabecular Microarchitecture and Bone Mineral Density in Single Comb White Leghorn Hens. *Poultry Science*, v.85, n.4, p.706-711, 2006.

McDOWELL, L.R. Copper and molybdenum – minerals in animal and human nutrition. Academy Press Inc. San Diego – California, p. 178-204, 1992.

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. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, v.113, p.679- 683, 2009.

OLUKOSI, O.A., KUJIK, 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.

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

SEEDOR, J. G., QUARTUCCIO, H. A., THOMPSON, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK- 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 6, 1991.