

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE
COBRE E SEUS EFEITOS PARA FRANGOS DE CORTE**

Sandra Carvalho Matos de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COBRE E SEUS EFEITOS PARA FRANGOS DE CORTE

Sandra Carvalho Matos de Oliveira
Medicina Veterinária
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Nutrição e Alimentação Animal).

Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

O48s	<p>Oliveira, Sandra Carvalho Matos de. Suplementação de diferentes fontes e níveis de cobre e seus efeitos para frangos de corte / Sandra Carvalho Matos de Oliveira._ Cruz das Almas, BA, 2016. 69f.; il.</p> <p>Orientador: Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito. Coorientador: Alexandre Moraes Pinheiro.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Frango de corte – Alimentação e rações. 2.Frango de corte – Cobre na nutrição animal. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p>
CDD: 636.513	

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COBRE
E SEUS EFEITOS PARA FRANGOS DE CORTE**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Sandra Carvalho Matos de Oliveira

Aprovada em: 25 de Maio de 2016

Prof. Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Duarte Abreu
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

Prof^a. Dra. Lia Muniz Barreto Fernandes
Universidade Federal da Bahia
Examinador Externo

Dr. Ricardo Gonzalez Esquerra
Novus do Brasil
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.” Albert Einstein

Dedico este mestrado ao meu amado esposo Marcos Vinícius, aos meus pais Evandro e Sônia, aos meus irmãos Eliandro, Ricardo e Luisa pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões. A vitória da minha conquista dedico com todo meu carinho e amor a vocês.

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin

Agradeço à Deus em primeiro lugar, pela minha vida, por sempre ter guiado os meus passos, me dando força e sabedoria para enfrentar todas as dificuldades, permitindo que eu pudesse ir em busca dos meus objetivos.

À UFRB e ao CCAAB, pela oportunidade e disponibilização do Setor de avicultura para realização do experimento.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudo.

Ao meu marido, Marcos Vinícius, por ser o maior incentivador e motivador dos meus sonhos, por todo o amor, carinho e compreensão, por não medir esforços em me auxiliar durante toda a minha vida acadêmica, por comemorar e estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha família, por acreditar e apoiar todas as minhas escolhas, me dando forças para superar os mais difíceis obstáculos.

Ao professor Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito pela orientação, confiança, compreensão, paciência, ensinamentos, dedicação e por ser este exemplo de profissional, ético e sempre disposto a compartilhar os conhecimentos contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Professor Alexandre Moraes Pinheiro pela co-orientação, pelo incentivo para o meu ingresso no mestrado acadêmico, pela amizade, ensinamentos.

A professora Veridiana Fernandes da Silveira pelo apoio e amizade durante toda a graduação e incentivo para realização do mestrado acadêmico.

Aos amigos do NEAR, Jamile, Lennon, Eric, Givanildo, Matheus, Zilda, Celina, Diana, Monivellin, Divaney, Izabel, pela amizade, dedicação, colaboração e companheirismo em várias etapas deste experimento. Em especial a Saulo e Adriana que estiveram comigo em todos os momentos, pelo esforço físico, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo apoio me mostrando o quanto nós éramos fortes e capazes de realizar os nossos objetivos, não tenho palavras para agradecer, sem vocês certamente não conseguiria.

As meninas do Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária (CCAAB/UFRB), Diana, Keu, Inês, Cíntia, Carol, pela amizade, apoio e toda a ajuda durante as análises.

Aos alunos do laboratório de doenças infecciosas, por me auxiliarem durante as análises.

A professora Ana Elisa, pela amizade, apoio, pelas palavras de incentivo e carinho tão necessário em diversos momentos.

A professora Larissa, por ter permitido a realização de análises no Laboratório de Reprodução Animal e Biotécnicas.

À Priscila Rocha, pela contribuição nas análises morfométricas.

Aos funcionários do setor de avicultura.

Aos funcionários do setor zootécnico pelo auxílio com a fabricação e transporte das rações.

Aos meus queridos amigos do mestrado em especial a Monna, Caudinéia, Emmanuel, Mairon e Maicon, pela amizade e pelos bons momentos vividos. Sentirei muita falta de vocês.

EPÍGRAFE

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

SUPLEMENTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COBRE E SEUS EFEITOS PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO: Utilizou-se 1.440 pintos de corte da linhagem Cobb alojados em aviário experimental, adotando-se um DIC em esquema fatorial 2x2+2 com seis repetições por tratamento com objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de duas fontes de cobre (Cu) (sulfato de cobre (CuSO_4) e cobre complexado ao ácido 2-Hidroxi-4-metilbutanoico ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$)) associadas a dois níveis (30 e 100mg/kg) somado a dois tratamentos adicionais, controle positivo (CP- Enramicina, 10mg/kg) e controle negativo (CN - isento de aditivo melhorador de desempenho). Nos dois tratamentos adicionais (CP e CN), o cobre foi incluso nas dietas em níveis considerados normais (10 mg/kg) para atendimento das necessidades nutricionais deste elemento. Foram avaliadas características de desempenho, mineralização óssea, biometria e morfometria intestinal assim como características imunológicas de frangos de corte. Os resultados do desempenho na fase inicial demonstraram que houve interação ($P<0,05$) entre as fontes e níveis de Cu estudados indicando que ao se utilizar a menor dosagem de Cu, a fonte CuSO_4 proporcionou maior consumo de ração (CR, 1-10 e 1-22 dias) e ganho de peso (GP, 1-10 dias). Por outro lado, ao se utilizar a fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ as aves submetidas à rações suplementadas com 100mg/kg de Cu apresentaram maior CR (1-10 e 1-22 dias) e GP (1-10 dias) em relação àquelas submetidas ao menor nível avaliado. A conversão alimentar (CA) das aves na fase pré-inicial, apenas foi influenciada ($P<0,05$) pelo nível de cobre com melhor resposta observada no maior nível (100mg/kg) de cobre. Considerando a fase total de criação (1-38 dias), o maior nível de Cu nas rações aumentou ($P<0,05$) o CR de frangos de corte. Aves suplementadas com Cu em níveis mais elevados (30 e 100 mg/kg) apresentaram maior GP e melhor CA em relação às aves dos tratamentos adicionais. Não houve efeito dos tratamentos avaliados sobre a mineralização óssea (teor de cinzas, cálcio e fósforo em tíbias) e comprimento de tíbias de pintos de corte ($P>0,05$). Houve interação entre fonte e nível de Cu para o peso da tíbia e sobre o Índice de Seedor indicando que aves alimentadas com maior nível de Cu proveniente da fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ apresentaram tíbias com menor massa e densidade. O comprimento e pesos relativos do duodeno e íleo, respectivamente, foram maiores ($P<0,05$) em aves alimentadas com $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$. A utilização de 30mg/kg de Cu propiciou maior ($P<0,05$) peso relativo do jejuno. A suplementação de Cu em maiores níveis (30 e 100 mg/kg) gerou aumento ($P<0,05$) na altura das vilosidades e íleo quando comparado às aves dos tratamentos adicionais impactando no aumento da superfície de absorção do íleo, ocorrendo o mesmo para jejuno. Aves submetidas a rações com uso de maiores níveis de Cu apresentaram maior profundidade de cripta do jejuno e íleo em relação àquelas dos tratamentos adicionais. A produção de óxido nítrico (ON) aos 23 dias foi influenciada ($P<0,05$) pelas fontes e níveis de Cu. Havendo maior produção ($P>0,05$) do metabólito nos grupos no nível 30mg/kg de suplementação de Cu, ocorrendo o mesmo com a fonte CuSO_4 em relação à $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$. Aos 38 dias a produção de ON e o metabolismo mitocondrial (MTT) foram maiores nos grupo suplementados com menor nível de Cu (30 mg/kg) quando comparado ao maior nível de Cu. A média da ON produzido por aves aos 38 dias com o uso de Cu, assim como MTT foram superiores em relação aos valores observados em aves dos tratamentos adicionais. Aves suplementadas com menor nível da fonte CuSO_4 apresentaram menor ($P<0,05$) MTT aos 38 dias. Os resultados demonstram a eficiência do uso do Cu sobre o desempenho de

frangos de corte evidenciando que o nível de suplementação e a fonte de Cu utilizada podem gerar respostas diferentes sobre o desempenho, biometria e morfometria intestinal, assim com na produção de ON e MTT de células mononucleadas do sangue periférico.

Palavras chave: aditivos; desempenho; imunidade; micromineral; mineralização óssea; morfometria intestinal

SUPPLEMENT COPPER SOURCES AND DIFFERENT LEVELS AND ITS EFFECTS BROILER

ABSTRACT: In this study, we used 1,440 broiler chicks from Cobb lineage housed in experimental avian, adopting a DIC in factorial $2 \times 2 + 2$ with six repetitions per treatment to evaluate the effects of supplementation of two sources of copper (Cu) (copper sulfate (CuSO_4) and copper complexed to 2-Hydroxy-4-methylthiobutanoic acid ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$)) associated with two levels (30 and 100mg/kg) plus two additional treatments: positive control (CP enramycin , 10mg/kg) and negative control (CN - free improver performance additive). In both additional treatments (CP and CN), copper was included in the diets at levels considered normal (10 mg / kg) to meet the nutritional needs of this element. Performance characteristics were evaluated: bone mineralization, biometrics and intestinal morphology as well as immunological characteristics of broilers. Performance results in the initial phase demonstrated that there was interaction ($P < 0.05$) between the sources and levels of Cu studied indicating that when using a lower dose of Cu, the CuSO_4 source provided higher feed intake (CR, 1- 10 and 1-22 days) and weight gain (GP, 1-10 days). Performance results in the initial stage demonstrated that there was interaction ($P < 0.05$) between the sources and levels of Cu studied indicating that when using a lower dose of Cu, the CuSO_4 source provided higher feed intake (CR, 1- 10 and 1-22 days) and weight gain (GP, 1-10 days). On the other hand, when using ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$) as a source of Cu, the birds subjected to diets supplemented with 100mg/kg Cu showed higher CR (days 1-10 and 1-22) and PG (1-10 days) compared to those submitted to the lowest evaluated level. The feed conversion (FC) of the birds in the pre-initial stage, was only influenced ($P < 0.05$) by the copper level with the best response observed in higher level (100mg / kg) of copper. Considering the final stage of breeding (1-38 days), the highest level of Cu in the diets increased ($P < 0.05$) the CR of broilers. Birds supplemented with Cu at higher levels (30 and 100 mg/kg) showed a higher GP and better FC compared to birds of the additional treatments. There was no effect of treatments carried out on bone mineralization (ash content, calcium and phosphorus in tibia) and length of tibia of broiler chicks ($P > 0.05$). There was interaction between source and level of Cu for the weight of the tibia and the Sedor index indicating that broiler fed with the highest level of Cu from the source $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ tibias showed a lower weight and density. The relative length and weight for the duodenum and ileum, respectively, were higher ($P < 0.05$) in birds fed ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$). The use of 30mg/kg of Cu provided higher ($P < 0.05$) relative weight to the jejunum. Supplementation of Cu at higher levels (30 and 100 mg/kg) caused an increase ($P < 0.05$) in villus height and ileum compared to the birds of the additional treatments impacting on the increase of the ileal absorptive surface, and the same happened to jejunum. Broilers fed with high Cu levels feed showed greater depth of jejunum and ileum crypt in relation to those of the additional treatments. The production of nitric oxide (ON) at the 23th day was affected ($P < 0.05$) for the sources and Cu levels. With higher production ($P > 0,05$) of the metabolite in groups at level 30 mg/kg Cu supplementation, the same occurred with the source CuSO_4 compared to the source ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$). After 38 days, the production of ON and mitochondrial metabolism (MTT) were higher in the groups supplemented with lower levels of Cu (30mg/kg) compared to those with higher levels of Cu. The average production of nitrous oxide, as well as MTT, for birds at 38 days using Cu were higher compared to those observed in birds of additional treatments. Broilers supplemented with a lower level

of CuSO₄ source had lower ($P<0.05$) MTT after 38 days. The results demonstrate the efficiency of Cu use on the performance of broiler chickens showing that the level of supplementation and the source of Cu used may generate different answers on performance, biometrics and intestinal morphometry, as well as in the production of ON and MTT mononuclear cells from peripheral blood.

Keywords: additives; bone mineralization; immunity; intestinal morphometry; performance; trace minerals

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais.	22
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes de cobre em níveis supranutricionais.	24
Tabela 3. Características da mineralização óssea de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	26

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais	38
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	43
Tabela 3. Comprimento relativo de segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	45
Tabela 4. Peso relativo de segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	46
Tabela 5. Características da morfometria do jejuno de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	48
Tabela 6. Características da morfometria do íleo de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	49
Tabela 7. Características imunológicas de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cobre e sua importância fisiológica	3
2.2 Uso do cobre supranutricional	5
2.2.1 Efeitos tóxicos provocados pela utilização de níveis elevados de cobre	5
2.2.2 Efeito do cobre sobre o trato gastrointestinal	7
2.2.3 Cobre como aditivo melhorador de desempenho	10
2.3 Efeitos do cobre sobre o sistema imunológico	12
2.4 Absorção de cobre e seus efeitos sobre o desenvolvimento e mineralização óssea	14
CAPÍTULO 1 – Uso de diferentes fontes e níveis de cobre sobre o desempenho e mineralização óssea de pintos de corte	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO 2 – Suplementação de diferentes níveis e fontes de cobre em rações de frangos de corte e seus efeitos sobre o desempenho, biometria e morfometria intestinal e características imunológicas	34
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

A industrialização e a intensificação dos sistemas de criação de frangos de corte passaram a expor às aves a permanentes desafios, estando relacionados a variações na composição e qualidade da ração, ao estresse decorrente de fatores ambientais, instalações e a patologias que provocam mudanças no pH e o desequilíbrio na microbiota intestinal, podendo alterar a saúde intestinal e conseqüentemente influenciar a digestão e absorção de nutrientes que por sua vez afetará negativamente o desempenho e a lucratividade de toda a cadeia avícola.

Na avicultura é comum a utilização de antimicrobianos em baixas dosagens caracterizando-os como aditivos melhoradores de desempenho (AMD), pois propiciam aos animais uma proteção à mucosa intestinal que por sua vez influenciam a absorção de nutrientes e assim gerando melhor desempenho produtivo. No entanto, o uso de antibióticos com esta finalidade tem sido cada vez mais limitado, devido às restrições dos órgãos reguladores da alimentação animal em função da possibilidade seleção de cepas de bactérias patogênicas resistentes (seja para animais ou para humanos) e das exigências dos consumidores por produtos livres de eventuais resíduos de antibióticos no mercado.

Nos últimos anos têm surgido novas estratégias com produtos alternativos aos antibióticos na alimentação das aves, estes, para que se tenha difusão no seu uso pela cadeia avícola, deverão estrategicamente, apresentar efeitos semelhantes àqueles proporcionados pelos AMD convencionais (antibióticos) sem, no entanto gerar possíveis efeitos adversos mencionados.

Deste modo alguns produtos se destacam com eficiência comprovada em pesquisas, assim como a biotecnologia de produção cada vez mais moderna. A utilização de alguns microminerais como o cobre e zinco tem sido realizada corriqueiramente ao longo dos anos, com a finalidade bactericida e fungicida de forma a melhorar o desempenho através de melhor equilíbrio da microbiota intestinal.

O cobre é um micromineral essencial para animais de produção, e também pode ser adicionado à dieta de frangos de corte em níveis

supranutricionais, agindo como aditivo melhorador de desempenho. A adição de diferentes níveis e fontes tem demonstrado resultados eficientes com relação ao peso corporal e a conversão alimentar.

Vários mecanismos de ações são propostos, sendo o principal seu efeito bactericida tóxico no intestino, resultando em melhor saúde intestinal e conseqüentemente melhor desempenho, porém efeitos sistêmicos são apontados recentemente em pesquisas.

Em outra via, uma questão que tem sido discutida é a poluição ambiental decorrente do excesso de cobre presente nas fezes ou excretas dos animais alimentados com níveis supranutricionais deste mineral. Novos estudos têm sido desenvolvidos na busca por fontes que apresentem maior biodisponibilidade, conseqüentemente menor excreção mineral no ambiente e que ao mesmo tempo promova melhora sistêmica na saúde e atuando positivamente sobre o desempenho dos animais.

Neste contexto surge a demanda por pesquisas relacionadas a diferentes fontes de cobre de acordo com sua biodisponibilidade e avaliação de características fisiológicas mais aprofundadas visando esclarecer melhor, efeitos e formas de ação do cobre em diferentes níveis para frangos de corte. Assim sendo, objetivou-se com o presente estudo, avaliar os efeitos da suplementação de cobre proveniente de duas fontes, o sulfato de cobre (CuSO_4) e o ácido 2-Hidroxi-4-metiltiobutanóico ligado ao cobre ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$) com dois níveis em rações de frangos de corte, analisando os efeitos sobre o desempenho, mineralização óssea, morfometria e biometria intestinal e parâmetros imunológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cobre e sua importância fisiológica

O cobre (Cu) é um micromineral essencial ao metabolismo animal e sua importância na nutrição foi descoberta em 1928, bem como a associação de patologias relacionadas à sua deficiência (HILL e MATRONE, 1961). E está envolvido no funcionamento do sistema nervoso central, no metabolismo dos ossos e no funcionamento do músculo cardíaco. A atuação deste nutriente está relacionada a outros componentes da dieta incluindo molibdênio, manganês, zinco, ferro, proteínas e outros microelementos (MCDOWELL, 1999; REEVES, 2004).

Alguns dos sinais da sua deficiência são anemia, redução da pigmentação dos pelos, lã e plumas, redução da atividade enzimática, fragilidade óssea e redução da espessura da cartilagem (CARLTON e HENDERSON, 1962; HILL e MATRONE, 1961).

O cobre é componente essencial de diversas enzimas que dependem deste micromineral para realizar a sua atividade metabólica. A citocromo oxidase é uma enzima da membrana mitocondrial interna essencial ao processo de respiração celular, nela estão inseridos três átomos de cobre envolvidos na transferência de elétrons e na redução do oxigênio. Deste modo a deficiência de cobre resulta na redução da atividade da citocromo oxidase e na capacidade respiratória das mitocôndrias (LINDER e HAZEGH-AZAM, 1996; UAUY *et al.*, 1998; LEHNINGER *et al.*, 2006).

De acordo com Mcdowel (1992), o cobre atua diretamente no metabolismo do ferro, favorecendo a sua absorção a nível intestinal e reabsorção após armazenamento hepático e excreção biliar, dessa forma pode influenciar diretamente a síntese de hemoglobina, pois auxilia o transporte de ferro para os tecidos através da ceruloplasmina, uma globulina que é constituída de aproximadamente 85 a 90% do cobre sérico total, indispensável para a oxidação do ferro, convertendo íon ferroso (Fe^{2+}) em férrico (Fe^{3+}),

permitindo a sua ligação à transferina e o transporte e armazenado na forma de ferritina.

Segundo Bairele *et al.*, 2010 além da atuação no transporte e armazenamento do ferro, a ceruloplasmina, está presente nas reações responsáveis pela resposta inflamatória de fase aguda e na remoção de radicais livres, protegendo as células contra o dano oxidativo

De acordo com McDonald *et al.* (2002) após a suplementação de cobre na dieta, este micromineral será absorvido e à partir da corrente sanguínea será armazenado no fígado de três diferentes formas, a primeira de estocagem temporária destinada a trocas com o sangue e excreção pela bile, a segunda também de estocagem temporária para incorporação na ceruloplasmina e a terceira de armazenagem por longo tempo e secreção contínua para a corrente sanguínea. Segundo Who (2004) após ser libertado da bile para o intestino, existe uma pequena reabsorção do cobre, fazendo com que este mineral continue atuando no organismo por um longo período.

O cobre também está presente na composição da enzima superóxido dismutase (SOD1) que catalisa a dismutação dos radicais superóxido (O_2^-) no citoplasma (Uauy *et al.*, 1998). O cobre presente no centro ativo da SOD1 é reduzido pelo substrato O_2^- para dar origem ao oxigênio molecular (O_2) e ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), proporcionando defesa contra os efeitos nocivos dos radicais livres de oxigênio. Desta forma nenhum outro micromineral pode substituir o cobre neste processo (LINDER e HAZEGH-AZAM, 1996).

Além disso, de acordo com Suttle (2010), outras enzimas importantes são cobre-dependentes, podendo-se destacar a feroxidase II, que atua na oxidação do ferro, a lisil oxidase, que participa da síntese de colágeno e a tirosinase, essencial na síntese de melanina.

Os níveis nutricionais do cobre preconizados para frangos de corte de acordo com o NRC (1994) são de 8mg/kg, em todas as fases de criação. Rostagno *et al.* (2011), por sua vez, recomendam que a suplementação nas rações possam variar entre 6,5 e 12,5 mg/kg em função da fase de criação, com maior valor na fase pré-inicial.

Schmidt *et al.* (2005) sugerem que os níveis de cobre de 8,5 a 11,1 mg/kg, normalmente presentes nas dietas à base de milho e farelo de soja, são suficientes para um desenvolvimento animal adequado, não havendo

necessidade de suplementação desse mineral para frangos de corte na fase de terminação e abate. De acordo com os autores, frangos de corte na fase de abate, alimentados com pelo menos 5% de proteína animal, em condições ambientais favoráveis e livres de patologias, não necessitam de suplementação mineral, pois fontes de proteína animal usadas nas rações (farinhas de carne e ossos, farinha de vísceras etc) apresenta níveis suficientes de microminerais.

2.2 Uso do cobre supranutricional

Na avicultura industrial, um dos principais objetivos da adição de cobre supranutricional a dieta de frangos está relacionado à sua atuação como aditivo melhorador de desempenho das aves, principalmente em decorrência das suas propriedades antibacterianas ou bacteriostáticas (ARIAS E KOUTSOS, 2006).

As diferentes fontes de cobre disponíveis comercialmente apresentam variadas biodisponibilidades relativas, entre elas, encontram-se o sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), o óxido de cobre (CuO) o carbonato de cobre (CuCO_3) e o sulfato de cobre monidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) sendo o primeiro, normalmente é considerado como 100% disponível em relação as outras fontes e por esse motivo, aliado ao seu custo, é o sal mais utilizado para uso de cobre como aditivo melhorador de desempenho alternativo (SUTTLE, 2010).

As fontes de cobre podem apresentar diferentes efeitos no trato digestivo. O cloreto de cobre tribásico (TBCC) é mais biodisponível para aves do que o sulfato de cobre. No entanto quimicamente TBCC é menos ativo do que o sulfato de cobre visando efeito bactericida (LUO *et al.*, 2005).

2.2.1 Efeitos tóxicos provocados pela utilização de níveis elevados de cobre

Com relação à utilização do cobre em altos níveis segundo o NRC (1994) é comum a adição de cobre em níveis que variam de 125 a 250mg/kg

utilizando fontes como o CuSO_4 à dieta de aves, sendo esta estratégia uma rotina na indústria avícola. De acordo com Fisher *et al.*(1973), níveis acima de 500mg/kg pioram o ganho de peso, o consumo de ração e a eficiência alimentar. No entanto, Shahzad *et al.*(2012) relataram que sobrecarga de cobre pode provocar efeitos tóxicos. Segundo os autores a utilização de cobre através do óxido ou sulfato em doses acima de 300 mg/kg de alimento para aves provoca prejuízos do crescimento

A redução na taxa de crescimento é o indicador mais comum para identificar a toxicidade de um determinado mineral e esta é influenciada principalmente pelo nível utilizado e a interação com outros minerais (NRC, 1994).

Poupoulis e Jensen (1976); Fisher *et al.* (1973) observaram a presença de sérios danos na mucosa interna da moela de frangos alimentados com dietas contendo níveis superiores a 500 mg/kg de cobre. A erosão de moela foi observada em aves suplementadas com níveis a partir de 250mg/kg de cobre e a gravidade destas lesões piorou de acordo com a utilização de doses maiores.

O cobre é um metal redox-ativo essencial às células eucarióticas, no entanto, quando as concentrações deste micromineral não são cuidadosamente reguladas pode acontecer o acúmulo, tornando-o potencialmente tóxico após o seu transporte para o meio intracelular através de proteínas transmembrana (Ctp1, Ctp2) (Knight *et al.*, 1996). O fator de transcrição do cobre (Mac1) se mantém estável em condições de baixa ou intermediária concentração plasmática deste elemento protegendo as células contra a sua toxicidade, pois reduz a transcrição dos genes das proteínas transportadoras de cobre, no entanto, quando há elevação plasmática dos níveis deste micromineral ocorre a degradação do Mac 1 e ativação de proteases que alteram as proteínas de membrana e elevam a sua concentração celular alterando a homeostase no meio intracelular e provocando a inativação ou ainda a morte das células (JENSEN and WINGE., 1998; ZHU *et al.*, 1998).

De acordo com Radisky e Kaplan (1999) este efeito tóxico decorrente da elevada ingestão de cobre foi confirmado em células fúngicas (daí o conhecido efeito antifúngico do cobre), no entanto, estas reações também podem ser

verificadas sobre as células das aves que semelhantes às células fúngicas são eucarióticas.

Objetivando reduzir o efeito tóxico do cobre em aves, Jensen e Maurice (1979), avaliaram o efeito da adição de aminoácidos sulfurados (AAS) em dietas de frangos corte com elevados níveis de cobre. Foi observado que a utilização de 500 até 700mg/kg de cobre provoca o aumento significativo da concentração hepática de cobre, no entanto, com a adição de 0,4% de metionina na dieta, este efeito foi consistentemente reduzido.

A utilização de fontes inorgânicas em níveis elevados provoca além das lesões teciduais o aumento da excreção ambiental deste micromineral. Os impactos ambientais provocados pelo excesso de minerais depositados no solo, provenientes de dejetos animais tem aumentado nos últimos anos. A utilização de fontes orgânicas de minerais tem sido uma alternativa adotada na substituição das formas inorgânicas, pois podem reduzir a excreção no meio ambiente, em virtude de uma maior biodisponibilidade (HAHN E BAKER, 1993; MOHANNA E NIS, 1998; UNDERWOOD E SUTLLE, 2001).

2.2.2 Efeito do cobre sobre o trato gastrointestinal

Ainda são restritas as pesquisas no que diz respeito aos mecanismos pelos quais o cobre em níveis maiores do que aqueles normalmente usados para fins nutricionais, afeta o desenvolvimento das aves. Uma hipótese sobre o modo como o cobre pode trazer benefícios ao desempenho de frangos de corte está relacionada com a manutenção e/ou favorecimento da microbiota benéfica no trato gastrointestinal reduzindo assim a susceptibilidade a doenças, o recrutamento e a infiltração de linfócitos (MILES *et al.*, 1998; JENKINS *et al.*, 1970; ARIAS e KOUTSOS, 2006) e aumentando a absorção de nutrientes (HAWBAKER *et al.*, 1961; BUNCH *et al.*, 1965).

O sistema digestório das aves assim como demais sistemas corporais, passa por um processo de maturação no período pós-eclosão, responsável por parte do seu desenvolvimento (UNI *et al.*, 1998; UNI, 2000). Deste modo, existe um período de adaptação entre a fase de dependência dos nutrientes providos

via saco vitelínico desde o período embrionário até a completa utilização da alimentação exógena (NOY e SKLAN, 1998).

A formação da microbiota ocorre junto ao desenvolvimento do sistema digestório e pode variar ao longo da vida de acordo com fatores como a densidade de alojamento, composição da dieta, condições das instalações, idade e desafio pela presença de patógenos. A microbiota intestinal atua em equilíbrio impedindo a colonização por bactérias patogênicas por meio da exclusão competitiva (PEDROSO *et al.*, 2006).

De acordo com Pelicano (2005) a utilização de alimentos e aditivos que possam fornecer ou aumentar a disponibilidade dos nutrientes necessários para estimular o rápido desenvolvimento do trato gastrointestinal ou maximizar a capacidade de digestibilidade dos alimentos, assim como manter o equilíbrio da microbiota intestinal é muito importante nas primeiras semanas de criação. A adequada nutrição na fase inicial tem relação direta com o peso das aves ao abate para frangos de corte.

A mucosa intestinal das aves é constituída por vilosidades que possibilitam a ampliação da superfície interna do órgão proporcionando uma maior área de digestão e absorção, na base das vilosidades encontram-se as criptas que são responsáveis pela regeneração das células intestinais (SOLIS *et al.*, 2005).

O epitélio intestinal funciona como uma barreira natural contra a microorganismos e substâncias tóxicas que provocam distúrbios na microbiota epitélio intestinal, podendo interferir na permeabilidade da barreira natural, facilitando a invasão de agentes patogênicos. Estes agentes provocam processos inflamatórios crônicos na mucosa intestinal acelerando ou atenuando o processo de renovação celular, prejudicando a digestão, o transporte e absorção de nutrientes (LESER e MOLBAK, 2009).

Deste modo, devem ser utilizados métodos com objetivo de melhorar a imunidade dos intestinos (BELLONI *et al.*, 2012). O uso de aditivos nutricionais na dieta promove maior densidade dos vilos em frangos de corte (PELICANO 2005, SEN *et al.* 2012).

Pang e Applegate (2009) sugeriram a utilização de 125mg/kg de cobre na dieta podem ser responsáveis pela mudança no perfil de microorganismos no intestino, pois reduz as concentrações de ácidos de cadeia curta e longa

resultando no aumento do pH ileal. Neste trabalho foi relatado que altas concentrações de cobre na dieta podem inibir seletivamente algumas bactérias, como a *Escherichia coli* e estimular bactérias benéficas como os lactobacilos. No entanto, segundo os autores, ainda não se conhece totalmente nem o local, nem o mecanismo exato pelo qual esta ação ocorre. Ye *et al.* (2003) demonstraram atividade antimicrobiana do cobre sobre *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Salmonella*.

A ação bactericida do cobre pode ocorrer de diferentes maneiras, tanto no espaço intersticial como no interior das células bacterianas. O cobre tem a capacidade de aceitar ou doar seus elétrons, resultando em um catalisador de alta capacidade de oxidação e com um alto potencial de redução (REN *et al.*, 2009).

De acordo com Suwalsky *et al.* (1998), ao se ligar a membrana plasmática das bactérias, por atração e penetrá-la através dos canais existentes o cobre altera a permeabilidade das membranas celulares resultando no extravasamento de íons e metabólitos. Ao mesmo tempo catalisa a oxidação de lipídeos e desnaturação proteica provocando a morte celular.

Supostamente, o uso de fontes orgânicas perderia parcialmente tal efetividade em função do conceito de absorção ocorrer antes da dissociação em nível intestinal, porém funções sistêmicas geram resultados positivos em pesquisas com fontes complexadas ou de maior biodisponibilidade comparadas ao sulfato de cobre (SOLIOZ *et al.*, 1994).

A redução de compostos tóxicos produzidos por bactérias patogênicas, na ocasião da utilização de cobre na dieta pode ser um mecanismo pelo qual este aditivo melhora o desempenho, pois estes compostos tóxicos, especialmente amônia, podem alterar o metabolismo e o tempo de vida celular prejudicando a digestão e absorção dos nutrientes. Logo, ao se reduzir a concentração de bactérias e substâncias tóxicas pode-se diminuir a atividade metabólica da mucosa intestinal e conseqüentemente os requisitos de energia para as células do epitélio intestinal. Esta energia poupada nestes processos pode ser utilizada para o ganho de peso (RADECKI, 1992).

De acordo com Hodgkinson e Petris (2012) o cobre pode atuar na destruição de bactérias associado a macrófagos ativados. A presença de fatores pró inflamatórios, como por exemplo o lipopolissacarídeo pode

estimular a captação de cobre por aumentar a expressão do importador de cobre de alta afinidade (CTR1) presente na membrana plasmática. Ocorre o estímulo do seu tráfego pela maior expressão do transportador de cobre (ATP7A) dentro do compartimento fagossomal. O potencial bactericida é aumentado pela conversão do radical hidroxila que ocorre após a decomposição do H_2O_2 . Ao final desta reação ocorre a produção de radicais livres tóxicos capazes de reagir com diversas macromoléculas e causando graves danos aos microrganismos, assim como ao próprio tecido animal dependendo do nível de cobre adotado.

O radical hidroxila é reativo à maioria dos tipos de macromoléculas, provocando danos para os lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos de microrganismos patogênicos. Um segundo mecanismo de ação do cobre acontece através da desordenação na estrutura das proteínas. Esta desorganização pode ocorrer através de interações com polipeptídeos ou por recobrir os aminoácidos (KEYER e IMLAY, 1996; MACOMBER e IMLAY, 2009).

2.2.3 Cobre como aditivo melhorador de desempenho

A utilização do cobre como aditivo melhorador de desempenho depende da sua concentração na dieta, das concentrações dos agentes antagonistas que interferem a sua absorção e conseqüentemente da sua utilização para os processos metabólicos (VASQUEZ *et al.*, 2001).

Ewing *et al.* (1998) demonstraram efeitos benéficos da utilização do cobre como aditivo melhorador de desempenho. Os autores confirmam que o sulfato de cobre penta-hidratado, citrato de cobre e o oxiclreto de cobre podem ser utilizados na suplementação de frangos de corte promovendo maior ganho de peso. No entanto, o citrato de cobre mostrou-se uma fonte mais eficiente como alternativa ao sulfato de cobre, pois, utilizando-se 63mg/kg de citrato de cobre as aves apresentaram pesos corporais significativamente superiores aos observados em aves, quando da utilização de 125 mg/kg de oxiclreto de cobre e sulfato de cobre pentahidratado.

Choi e Paik. (1989); Baker *et al.* (1991) relataram melhoria do ganho de peso e conversão alimentar em aves suplementadas com níveis entre 125 e 250mg/kg de sulfato de cobre.

De acordo com Kim *et al.*(2011) o uso do quelato de cobre metionina (Cu-Met) resultou em melhorias no ganho de peso quando comparado ao tratamento controle (isento de suplementação supranutricional de cobre, porém com antibiótico). Além disso, foi observado que tanto o quanto o proteinato de cobre na concentração de 100mg/kg de cobre na ração resultaram em melhor ganho de peso das aves em comparação com as mesmas fontes utilizando 50mg/kg de cobre. O efeito do cobre dietético foi comparado ao dos antibióticos por melhorar a produtividade em frangos de corte. Este experimento concluiu que fontes orgânicas de cobre podem ser alternativas em substituição aos antibióticos.

Arias e Koutsos (2006) observaram efeitos significativos do cobre sobre o ganho de peso das aves na fase inicial, onde frangos alimentados com rações suplementadas com sulfato de cobre e cloreto de cobre tribásico apresentaram maior ganho de peso que aves do grupo controle negativo. Este efeito sobre o desempenho permaneceu aos 31 e 45 dias onde as aves suplementadas com ambas as fontes utilizando o nível de 188mg/kg de cobre obtiveram maior ganho de peso. Samanta *et al.* (2011) utilizando o sulfato de cobre observou-se uma melhoria significativa no peso corporal de frangos de corte quando suplementado com 150mg/kg comparado ao controle negativo.

Lim *et al.* (2006) concluíram que as aves alimentadas com 200 mg/kg de cobre como cloreto de cobre tribásico apresentaram um ganho de peso superior ao das aves que não receberam cobre ou antibiótico. Liu *et al.* (2005) observaram que o consumo de ração das aves suplementadas com cloreto de cobre tribásico foi superior consumo das aves alimentadas com sulfato de cobre.

Wang *et al.*(2014) observaram ganho de peso corporal superior com o aumento de 5 para 200mg/kg de cobre na ração, semelhante aos resultados sobre o desempenho obtidos por Pesti e Bakalli (1996) ao elevar o nível de 125 para 250mg/kg de cobre e de 65 para 125mg/kg de cobre nas rações.

2.3 Efeitos do cobre sobre o sistema imunológico

Na avicultura industrial os animais são submetidos a constantes desafios que afetam diretamente à saúde das aves, além das práticas de manejo a genética e nutrição tem influência direta sobre a sanidade (RIBEIRO *et al.*, 2008). Em virtude destes desafios as aves precisam utilizar mecanismos de defesa imunológica contra agentes infecciosos, para inibir a sua proliferação e conseqüentemente os efeitos da presença destes patógenos (SARNI *et al.*, 2010).

Quando expostos a agentes infecciosos as aves produzem respostas imunológicas específicas e não específicas contra o antígeno. Os linfócitos são integrantes da resposta imunológica adquirida de frangos de corte e fazem parte os linfócitos T e B. Ao realizar o isolamento por centrifugação em gradiente de densidade estas células presentes no sedimento formam a camada de células mononucleares. A presença de uma resposta imunológica adquirida eficiente é essencial para a síntese de anticorpos, fornecendo a memória e eliminando microrganismos invasores (PROCHASKA e CLEMENTE, 1983; KOLLER *et al.*, 1987).

Durante a resposta imune celular ocorre a produção de óxido nítrico induzida (NATHAN e XIE, 1994). Não se sabe exatamente o papel do óxido nítrico sobre a resposta imunológica celular, mas a sua produção é mediada pelo reconhecimento do antígeno específico pelos linfócitos T e liberação de Interferon gama (IFN- γ), um importante co-indutor da síntese de óxido nítrico (SCHMIDT e WALTER, 1994; XIE *et al.*, 1992).

Sicher *et al.* (1994) propuseram que o óxido nítrico atue como mecanismo de “feedback” para que não ocorra a ativação excessiva de linfócitos T, sugerindo que a sua produção seja dependente de estímulo imunológico e que faça parte dos mecanismos de defesa do organismo.

De acordo com Flora Filho e Zilberstein (2000) o óxido nítrico participa da primeira barreira de defesa do organismo com poder bactericida. Deste modo ele atua em concentrações maiores do que as de elementos mensageiros, sendo tóxico aos microrganismos invasores.

Diferentes ajustes metabólicos acontecem durante a fase aguda da resposta imunológica. As variações decorrentes do estresse provocado pela presença de microorganismo tem início horas após o desafio, e são mantidas até à resolução da resposta imune. Os requisitos e o metabolismo de microminerais são alterados durante a resposta imunológica em frangos de corte (BENSON *et al.*, 1993).

Um exemplo da alteração no metabolismo de mirominerais é o aumento do nível de cobre plasmático (KLASING, 2007; LAURIN e KLASING, 1987). Este aumento está relacionado a intensificação da síntese e liberação de ceruloplasmina. A ceruloplasmina tem um papel importante no metabolismo de do cobre. Este é um excelente catalisador de oxidação-redução e o potencial oxidativo é gerado durante a resposta imunológica, devido à produção e liberação de H₂O₂, radicais livres e óxido nítrico por leucócitos com a finalidade destes de destruir os microorganismos invasores (CADENAS, 1989).

O cobre é conhecido por desempenhar um importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico, no entanto o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Na resposta imunológica de fase aguda, o fígado utiliza elevadas quantidades de cobre para a síntese de proteínas que participam da eliminação de patógenos (PERCIVAL, 1998).

A atuação do cobre como co-fator enzimático associado a ceruloplasmina e a superóxido dismutase tem influência sobre a eliminação de patógenos capazes de provocar danos em células do sistema imunológico. A atuação destas enzimas auxilia no entendimento da importância do cobre como um constituinte de células do sistema fagocítico (LUKASEWYCZ e PROLASKA, 1990).

Outra hipótese é que o cobre reduza a microbiota patogênica por meio da sua ação antimicrobiana e conseqüentemente a susceptibilidade as doenças e assim reduzuz também o recrutamento e a infiltração intestinal de linfócitos, aumentando a absorção de nutrientes (ARIAS e KOUTSOS, 2006).

Quando ativado o sistema imune exige um gasto energético que influencia diretamente no desempenho, logo para maximizar a eficiência produtiva deve-se tentar reduzir a ativação do sistema imunológico. Quando ativado é desejável uma resolução rápida ou uma transição da resposta imune

inata para o adaptativa é desejável para minimizar as perdas de produtivas (BENSON *et al.*, 1993).

A nutrição pode influenciar a resposta imunológica contra agentes infecciosos alterando a transdução de sinais em leucócitos, fornecendo substrato para as células que atuam no sistema imune e influenciando a microbiota intestinal (KLASING, 2007). Microminerais como o cobre, ferro e zinco são substratos para a eficiência imunológica (HUMPHREY e KLASING, 2004; KLASING, 2007). Logo para compreensão do efeito da suplementação sobre a imunocompetência é necessário relacionar suplementação nutricional com a produção e funções dos leucócitos, bem como sobre a manutenção da homeostase imunológica (KLASING, 2007; BHASKARAM, 2001).

2.4 Absorção de cobre e seus efeitos sobre o desenvolvimento e mineralização óssea

O osso é considerado um tecido multifuncional, metabolicamente ativo, composto por uma heterogênea população celular que se encontra em diferentes estágios de diferenciação, por meio de uma sequência de eventos que controlam a mobilização e a deposição mineral durante a vida das aves (PIZAURO JÚNIOR, 2002). De acordo com Banks (1991), é constituído por 22% de matriz orgânica, 9% de água e 69 % de material inorgânico. Na matriz orgânica encontra-se como principal componente o colágeno que corresponde a 90% e participa do processo de mineralização óssea, a substância amorfa (glicosaminoglicanos) completa a matriz orgânica representando os 10% restantes.

A correta mineralização óssea é fundamental dentro da avicultura de corte, pois o desenvolvimento muscular depende de um bom suporte estrutural sendo essencial para o bom funcionamento do sistema locomotor. Aves com desordens no desenvolvimento ósseo podem sofrer traumas durante a apanha, transporte e abate, provocando prejuízos decorrentes da condenação de carcaças no abatedouro. No que diz respeito às exigências de minerais para

frangos de corte o cálcio (Ca) e fósforo (P) apresentam grande destaque (SCHOULTEN, 2003; ALMEIDA PAZ *et al.* 2010; LI *et al.* 2012).

Durante o período embrionário, o esqueleto das aves ainda é pobremente mineralizado. O processo de mineralização ocorre de forma mais eficiente nas duas primeiras semanas de vida (ANGEL, 2007). O mecanismo que inicia a formação de cálcio e fosfato inorgânico assim como a sua deposição e acúmulo na matriz orgânica do tecido ósseo ainda não está totalmente esclarecido (SEIFERT E WATKINS, 1997).

Segundo Samanta *et al.* (2011) o cobre é considerado um micromineral essencial na formação óssea, pois atua na manutenção da integridade estrutural do colágeno ósseo. Além disso, participa da formação da elastina presente nos ossos e no sistema cardiovascular. Esta função se deve a presença da lisil oxidase, uma enzima que contém cobre e está diretamente envolvida na formação e maturação das ligações cruzadas entre o colágeno e elastina nos ossos e aortas (STARCHER *et al.*, 1964; RUCKER *et al.*, 1975; OPSAHL *et al.*, 1982).

As diferentes fontes de cobre apresentam biodisponibilidades relativas diferentes, de acordo com a literatura científica (ZHAO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011). Podem ser encontradas comercialmente diferentes formas de apresentação do cobre como fonte micromineral, a forma complexada tem como propósito evitar que este mineral se ligue a outros compostos antes de alcançar a porção do trato gastrointestinal, onde ocorre o processo de absorção (LEDOUX *et al.*, 1991).

A absorção dos microminerais depende de diversos fatores, dentre eles do pH, da presença de carreadores, da forma química e física dos minerais além da presença de outros compostos (HILL e MATRONE, 1970; GEORGIEVSKII, 1982; ORTOLANI, 2002). Georgievskii (1982), propôs que exista uma interação direta entre os minerais, logo, um influencia no processo de atuação do outro, como é o caso da necessidade de cobre juntamente com o ferro para a formação da hemoglobina, da interação do manganês com zinco para a adequada conformação das moléculas de RNA e ainda da função do cálcio e fósforo em conjunto na formação dos ossos.

De acordo com Leeson e Summers (2001) além da ação sinérgica entre enzimas, substratos e minerais, existe a relação antagônica entre os mesmos,

um exemplo que pode ser observado é a atuação do fitato, que é a forma de fósforo fítico, formando quelatos com metais de forma estável e altamente insolúvel, sendo um fator antinutricional relevante na nutrição mineral de aves. A disponibilidade de cobre também pode ser afetada pela presença de altos níveis de Zn e ácido ascórbico (CARLTON e HENDERSON, 1965; EVANS *et al.*, 1975).

O fitato tem características químicas que possibilita a ligação com o cobre e outros minerais bivalentes e trivalentes dentro do intestino delgado, interagindo com estes minerais e tornando-os menos disponíveis para absorção (MAENZ *et al.*, 1999). Este complexo reduz a biodisponibilidade mineral devido à diminuição da solubilidade do complexo fitato-mineral além de aumento no pH intestinal (PERSSON *et al.*, 1998). Erdman (1979) observaram que a ligação do fitato com o Ca, Cu, Fe, Mg, K tende a reduzir a solubilidade dos complexos resultantes levando a redução na absorção destes minerais

Banks *et al.* (2004) observaram que a suplementação de cobre em dietas utilizando 250mg/kg de cobre, usando sulfato de cobre como fonte provocou a redução na absorção de fósforo em frangos de corte em comparação a dietas que não continham cobre suplementar. No entanto, ao realizar a inclusão de 600 FTU de fitase/kg, houve um aumento na absorção do fósforo, demonstrando o efeito positivo da utilização desta enzima para a mineralização óssea.

A utilização da fitase nas rações tem a finalidade de aumentar o aproveitamento do fósforo fítico, que está na forma de fitato nos ingredientes de origem vegetal e reduzir o custo da adição do fósforo inorgânico na ração (RAVINDRAN *et al.*, 1995). No entanto, mesmo tendo se tornado comum à suplementação desta enzima a sua adição não resulta em hidrólise completa do fósforo e este efeito está estritamente relacionado ao teor de minerais da dieta (MAENZ *et al.*, 1999), pois os minerais, em especial o cobre e o zinco ligam prontamente ao ácido fítico a pH intestinal e os complexos resultantes destas ligações tornam-se resistentes à atividade hidrolítica de fitases (OBERLEAS, 1973).

Outra hipótese que foi proposta por Halliwell, (1997) para explicar a redução na absorção do fósforo com a utilização de cobre em níveis supranutricionais na ração de frangos de corte diz respeito ao efeito pró-

oxidante do cobre sobre enzimas exógenas como a fitase e vitaminas, em especial a vitamina E. A atividade pró-oxidante está relacionada à capacidade de substâncias endógenas ou exógenas de oxidar moléculas alvo.

Por meio da reação de Fenton ocorre a redução de peróxido de hidrogênio pelo cobre (Cu^{1+}) ou ferro (Fe^{2+}) a radical hidroxila capaz de reduzir os metais de transição, quando há elevação nos níveis de ferro ou cobre atividade pró-oxidante torna-se ainda mais relevante, pois o dano oxidativo pode levar a inativação enzimática (HERBERT e JAYATILLEKE, 1996; HALLIWELL *et al.*, 1999).

Waldroup (1996) concluiu que uma inadequada suplementação mineral durante a fase de crescimento de frangos de corte poderá ter como consequências um desequilíbrio na homeostase mineral e um desenvolvimento ósseo deficiente.

De acordo com Luo *et al.* (2005) diferentes fontes de cobre apresentam efeitos maior ou menor atividade pró oxidante sobre a fitase. Os autores concluíram que a atividade pró-oxidante do cloreto de cobre tribásico foi significativamente inferior comparado ao efeito do sulfato de cobre.

Lim (2006); Liu *et al.* (2005) observaram que a atividade da fitase na ração suplementada com 200 mg/kg de cobre como cloreto de cobre tribásico foi mais elevada do que nas rações que receberam a mesma dose de sulfato de cobre. Estes autores acreditam que este efeito ocorre devido a insolubilidade do cloreto de cobre tribásico em água não permitindo a dissociação e formação de íons de cobre para promover a oxidação.

Assim sendo, de acordo com os pontos levantados com relação à atuação do cobre sobre o desempenho, características intestinais, imunológicas e mineralização óssea de frangos de corte, surge a necessidade de pesquisas que avaliem o efeito de diferentes fontes (sejam elas orgânicas ou inorgânicas), e da utilização de níveis mais elevados do cobre sobre os parâmetros citados acima, visando o melhor entendimento da ação deste micromineral e da aplicação prática na indústria avícola.

CAPÍTULO 1 – Uso de diferentes fontes e níveis de cobre sobre o desempenho e mineralização óssea de pintos de corte

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Zootecnia, Qualis B1 na Área Zootecnia/Não Ruminantes.

RESUMO

Utilizou-se 1.440 pintos de corte da linhagem Cobb com objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de duas fontes de cobre (Cu), o CuSO_4 e $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ associadas a dois níveis, 30 e 100mg/kg de Cu somados a dois tratamentos adicionais, controle positivo (Enramicina, 10mg/kg) e controle negativo (isento de aditivo melhorador de desempenho) sobre o desempenho e mineralização óssea de pintos de corte. Para o desempenho zootécnico foram analisados consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA). Para as características ósseas foram analisados o teor de cinzas, fósforo (P) e cálcio (Ca), peso e comprimento da tíbia e índice de seedor (relação peso/comprimento dos ossos longos). Os resultados do desempenho demonstraram que houve interação entre os níveis e as fontes de Cu estudados indicando que ao se utilizar o menor nível de cobre, a fonte CuSO_4 proporcionou maior CR (1-10 dias e 1-22 dias) e GP (1-10 dias) das aves. Por outro lado, ao se utilizar a fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ o maior nível de Cu proporcionou maior CR (1-10 dias e 1-22 dias) GP (1-10 dias). O nível mais elevado de Cu proporcionou maior GP (1-10 dias e 1-22 dias) e melhor CA (1-10 dias). Com relação ao efeito do Cu sobre as características ósseas não houve interação ($P>0,05$) para o teor de cinzas, de P, Ca e comprimento das tíbias. No entanto foi observado interação entre as fontes e os níveis de Cu para o peso das tíbias e índice de seedor ($P<0,05$), ao utilizar a fonte CuSO_4 o nível mais elevado de Cu proporcionou maior peso das tíbias, no entanto ao se utilizar o menor nível de Cu a fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ proporcionou maior peso das tíbias. A fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ proporcionou aumento da densidade ao se utilizar o menor nível de Cu. A suplementação de Cu em níveis mais elevados melhora o desempenho de frangos de corte na fase inicial, mas alterações do peso e densidade da tíbia de acordo com níveis e fontes avaliados indicam que podem ocorrer interações entre microminerais que afetam o desenvolvimento ósseo.

Palavras chave: avicultura de corte, antimicrobiano, microminerais, suplementação, características ósseas.

INTRODUÇÃO

Após a proibição do uso de antibióticos em dosagens subterapêuticas nos países da União Europeia aumentou a pressão ou cobrança para a remoção destes compostos da alimentação de frangos de corte em outros países. A indústria avícola busca alternativas que proporcionem resultados semelhantes sem os efeitos indesejáveis (Yegani e Korver et al., 2010). A suplementação de cobre em dietas de frangos de corte apresenta propriedades antimicrobianas e sua prática tem se tornado comum como aditivo melhorador de desempenho (Vasanth et al., 2015). No entanto não se sabe exatamente o mecanismo pelo qual o cobre provoca este efeito (Pang e Applegate, 2007).

Arias & Koutsos (2006) sugeriram que este micromineral atue na regulação da microbiota gastrointestinal através da sua ação bactericida reduzindo o desafio imunológico, pois esta estimulação pode gerar gastos com nutrientes e ser prejudicial ao desempenho das aves em crescimento.

O sulfato de cobre (CuSO_4) é uma fonte inorgânica comumente utilizada sendo demonstrado efeito antimicrobiano com níveis entre 125 e 250 mg/kg de cobre (Wang et al., 2007). No entanto os minerais quelatados possuem potencialmente maior biodisponibilidade, pois reduzem o antagonismo com outros componentes no trato gastrointestinal. O ácido 2-hidroxi-4-metilbutanoico ligado ao cobre ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$) foi eficiente para evitar este antagonismo entre elementos em nível intestinal, logo doses reduzidas seriam supostamente suficientes para alcançar um desempenho similar ou superior a fontes inorgânicas (Zhao et al, 2010).

Minerais como o cobre (Cu), cálcio (Ca), fósforo (P) são essenciais ao desenvolvimento do tecido ósseo, pois estes são importantes na mineralização óssea desde a matriz óssea orgânica à mineralização propriamente dita (Dibner et al., 2007).

De acordo com Champagne et al. (1990) a hidrólise do P a partir da fitato pode ser limitada em decorrência da composição mineral das rações. Khalid et al. (2013) concluíram que o cobre tem grande influência sobre absorção de fósforo pelos ossos, pois o fitato pode se ligar a este micromineral resultando em um complexo fitato-mineral resistente a fitase no pH intestinal. A suplementação de fitase na dieta de frangos de corte tem sido uma alternativa

para melhorar a digestibilidade do fósforo fítico (presente no fitato), pois a utilização desta enzima resulta no aumento de 20 a 45% da utilização do mesmo (Ravindran et al., 1995).

O presente estudo foi proposto com o objetivo avaliar os efeitos da suplementação de diferentes fontes e níveis de cobre em nível supranutricional sobre o desempenho e mineralização óssea de pintos de corte na fase inicial de criação.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste estudo seguiram padrões e normas vigentes de acordo com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), respeitando as boas práticas de produção na avicultura (UBA, 2008).

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB/UFRB) localizada no município de Cruz das Almas no período de maio a julho de 2015. Foram utilizados 1440 pintos de um dia, machos, da linhagem Cobb-500, provenientes de incubatório registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), vacinados contra principais doenças regionais. As aves foram alojadas em um galpão experimental de criação sendo utilizados 36 boxes (1,78 x 1,88m) onde foram distribuídos um comedouro tubular, um bebedouro pendular e foi utilizado cama, proveniente de criação comercial (reutilizada com intuito de aumentar o desafio) para cobrir o piso cimentado. O aquecimento nos primeiros dez dias foi realizado com uso de campânulas a gás.

A iluminação artificial adotada foi crescente, caracterizada por 23 horas de luz (natural + artificial) na primeira semana, luz natural (cerca de 12 horas) na segunda e terceira semanas, 16 horas de luz na quarta semana, 18 horas de luz da quinta semana e 20 horas de luz na sexta semana.

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com distribuição dos tratamentos em esquema fatorial 2x2+2, no qual foram avaliadas duas fontes de cobre, o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{x}$

5H₂O; 25% de cobre) e o cobre ligado ao ácido 2-Hidroxi-4-metiltiobutanóico (Cu (HMTBa)₂; 15% de cobre), onde um átomo de cobre está ligado a duas moléculas de ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanóico (78% de metionina sendo realizada a correção para que as dietas apresentassem a mesma concentração deste aminoácido), associadas a dois níveis de cobre (30mg/kg e 100mg/kg), somados a dois tratamentos, um controle positivo utilizando enramicina (10mg/kg) como aditivo melhorador de desempenho (AMD) e um controle negativo onde as rações eram isentas de AMD.

As rações referentes aos tratamentos adicionais (controle positivo e controle negativo) apresentaram cobre com nível nutricional (10mg/kg) sendo atendido através do uso do premix de microminerais.

As aves foram alimentadas com rações à base de milho, farelo de soja, farinha de carne e ossos com suplementação de fitase (redução em 0,1 pontos percentuais para cálcio e fósforo disponível), seguindo um programa alimentar com rações pré-inicial (1-10 dias) e inicial (11-22 dias) de acordo com as recomendações nutricionais da linhagem (Cobb-Vantress, 2012) (Tabela 1). A obtenção dos tratamentos ocorreu em função da substituição dos ingredientes testes pelo material inerte (areia lavada) nas rações.

Tabela 1. Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Pré-inicial	Inicial
	(1 a 10 dias)	(11 a 22 dias)
Milho	60,236	63,978
Farelo de Soja	33,397	29,256
Farinha Carne ossos 42	3,698	3,342
Óleo de Soja	0,750	1,633
Calcário	0,427	0,434
Sal	0,459	0,439
Met-Hidroxi-Analoga ¹ 84	0,365	0,315
L-Lisina HCl 78	0,186	0,154
L-TREONINA 98	0,048	0,029
Premix Vitamínico ²	0,120	0,100
Premix Mineral ³	0,050	0,050
Cl-Colina 60%	0,096	0,086
Fitase 10.000ftu/g	0,005	0,005
Narasina 10%	0,050	0,070
Tratamentos + Inerte	0,113	0,109
Total	100	100
Composição Nutricional Calculada		
Proteína Bruta (%)	21,8	20,0
EMAn ⁴ (Kcal/kg)	2950	3050
Calcio (%)	0,90	0,84
Fósforo Disp. (%)	0,45	0,42
Sódio (%)	0,22	0,21
Lisina digestível (%)	1,18	1,05
Met+Cis digestível (%)	0,88	0,80
Treonina digestível (%)	0,77	0,69

¹MHA Metionina Hidroxi Análoga;

²Premix vitamínico - Níveis de garantia/kg do produto: Vitamina A 10.000.000 UI; Vitamina D 3.000.000 UI/kg; Vit. E 40.000 UI; Vit. K₃ 3.000mg; Vit B₁ 2.000mg; Vit B₂ 7.000mg; Vit. B₆ 5.000mg; Vit. B₁₂ 20.000µg; Ac. Fólico 1.500mg; Ac. Pantotênico 15.000 mg; Niacina 50.000mg; Biotina 100mg; Selênio 250mg, Anti-oxidante 125mg.

³Premix micromineral - Níveis de garantia/kg do produto: Mn 160g; Zn 100g; Fe 100g; Cu 20g; I 2.000mg (Tratamentos do ensaio fatorial foi usado um premix micromineral isento de cobre, porém com demais microminerais). Nos tratamentos do ensaio fatorial foi usado um premix micromineral isento de cobre, porém com mesmos níveis dos demais microminerais.

⁵ EMAn- Energia metabolizável

As pesagens das aves para avaliação de desempenho zootécnico foram realizadas com 1, 10 e 22 dias de idade. A ração ofertada foi pesada antes do fornecimento de acordo com cada fase (1, 10 e 22 dias) e as sobras foram pesadas com 10 e 22 dias para a determinação do consumo de ração e posterior cálculo da conversão alimentar. A mortalidade foi monitorada diariamente e usada para correção no consumo de ração conforme Sakomoura e Rostagno (2007).

Após a pesagem de 22 dias uma ave por parcela foi selecionada com peso médio ($\pm 2\%$) representativo à parcela, devidamente identificada, quando

no 23º dia, foram separadas (retiradas dos boxes) submetidas ao jejum de 2 horas e então foram eutanasiadas, com posterior necropsia e retiradas as tíbias para posteriores mensurações.

As tíbias foram submetidas a estufa a 65°C e posteriormente desengordurados com uso de éter de petróleo. A determinação do comprimento e largura dos ossos foi efetuada por meio de um paquímetro. O peso dos ossos foi obtido com auxílio de balança de precisão (0,0001g) e a relação peso/comprimento foi obtida segundo Seedor et al. (1991). Os ossos foram então, moídos, pesados, levados à estufa de 105°C para determinação da matéria seca desengordurada, sendo posteriormente encaminhados para mufla, onde foram incinerados a uma temperatura de 550°C por, aproximadamente, 8 horas obtendo, dessa forma, as cinzas na matéria seca desengordurada.

Foi realizada a solubilização das cinzas com ácido clorídrico. Esta solução foi aquecida chapa a 300°C para evaporação de cerca de 50% do volume em capela de exaustão. O volume aquecido foi transferido para balões volumétricos e então a solução mineral foi utilizada para determinação de cálcio e fósforo.

A determinação de fósforo foi realizada utilizando-se espectrofotômetro de luz UV-visível de acordo com a metodologia adaptada do Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2005 (protocolo 965.17). Enquanto as análises/ leituras de cálcio foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica na Universidade Federal de Viçosa.

Os dados foram submetidos à análise de variância avaliando-se inicialmente as pressuposições para o atendimento da mesma. Foi utilizado o pacote estatístico SISVAR, onde inicialmente foi realizada análise estatística global na qual foi considerado o quadrado médio do erro global para decompor e testar a interação, fatores isolados e os tratamentos adicionais. Utilizou-se o teste de F e contrastes de interesse entre os tratamentos adotando-se a probabilidade para significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados da fase pré inicial (1-10 dias) demonstraram que houve interação ($P < 0,05$) para o consumo de ração (1-10 dias e 1-22 dias) e ganho de peso (1-10 dias) (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre

Fonte	Nível (mg/kg)	CR ^{2,3} 1-10d g	GP ^{1,2,3} 1-10d, g	CA ¹ 1-10, kg/kg	CR ^{2,3} 1-22 g	GP ¹ 1-22, g	CA 1-22 kg/kg
CuSO ₄	30	281,7x	242,8x	1,16	1477,6x	1068,0	1,38
	100	278,5	244,4	1,14	1474,9	1080,7	1,36
Cu(HMTBa) ₂	30	263,6by	227,4by	1,16	1435,5by	1045,5	1,37
	100	285,8a	249,7a	1,14	1496,4a	1095,9	1,37
Fonte x Nível (Média)		277,4	241,1	1,15	1471,1	1072,5	1,37
Fonte							
CuSO ₄		280,1	243,6	1,15	1476,2	1074,3	1,37
Cu(HMTBa) ₂		274,7	238,6	1,15	1465,9	1070,6	1,37
Nível (mg/kg)							
30		272,6	235,1B	1,16A	1456,5B	1056,7B	1,38
100		282,1	247,1A	1,14B	1485,6A	1088,3A	1,37
Tratamentos adicionais (TA)							
Controle negativo (CN)		282,5	244,2	1,16	1469,2	1070,5	1,37
Controle positivo (CP)		281,6	243,1	1,16	1479,2	1090,7	1,36
Médias TA		277,3	243,6	1,16	1474,2	1080,6	1,36
Erro padrão da média		4,67	4,20	0,009	12,77	11,13	0,009
Coeficiente de Variação		4,10	4,30	1,84	1,99	2,51	1,54
Probabilidades							
Fonte (F)		0,2604	0,2467	0,7729	0,4274	0,7440	0,5604
Nível (N)		0,0511	0,0088	0,0423	0,0303	0,0082	0,1218
F x N		0,0110	0,0210	0,8186	0,0186	0,1008	0,5021
Tratamentos adicionais		0,8965	0,8518	0,8609	0,5838	0,2100	0,1787
Fatorial x TA		0,2582	0,4976	0,3702	0,7803	0,4079	0,3319

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente ($P < 0,05$). ² Médias seguidas por letras minúsculas (a,b) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (desdobramento de nível dentro de cada fonte de cobre ($P < 0,05$)). ³ Médias seguidas por letras minúsculas (x,y) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (desdobramento de fonte dentro de cada nível de cobre ($P < 0,05$)). CN- Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP)-Rações contendo Enramicina 10g/t como AMD. CR-Consumo de ração; GP- Ganho de peso; CA- Conversão alimentar; g – grama por ave.

O desdobramento da interação demonstrou que ao se utilizar o menor nível de suplementação de cobre (30mg/kg), a fonte CuSO₄ proporcionou maior consumo de ração (1-10 dias e 1-22 dias) e ganho de peso (1-10 dias) das

aves. Por outro lado, ao se utilizar a fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ o grupo de aves submetidas à rações com maior nível de suplementação (100mg/kg) de cobre apresentaram maior consumo de ração (1-10 dias e 1-22 dias) e ganho de peso (1-10 dias) quando comparadas àquelas alimentadas com rações contendo 30 mg/kg de cobre.

Não houve interação ($P>0,05$) entre os fatores estudados sobre o ganho de peso (1-22 dias) e conversão alimentar (1-10 dias e 1-22 dias), indicando não haver relação entre os fatores nesta fase, para as características citadas.

Com relação aos efeitos isolados dos fatores estudados, as aves alimentadas com rações suplementadas com 100mg/kg de cobre apresentaram maior ganho de peso (1-10 dias e 1-22 dias) na fase inicial de criação e melhorou a conversão alimentar (1-10 dias) das aves na fase pré-inicial em detrimento àquelas suplementadas com 30mg/kg de cobre. Possivelmente o maior ganho de peso advem do maior consumo de ração não sendo reflexo de alterações na eficiência alimentar nesta fase.

O uso de AMD não proporcionou ($P>0,05$) qualquer benefício sobre o desempenho de pintos de corte na fase inicial de criação. No mesmo sentido, o contraste estabelecido entre grupos com suplementação supranutricional de cobre (ensaio fatorial) e os tratamentos adicionais (CP e CN) não foi significativo, indicando que a suplementação de AMD ou cobre supranutricional não gerou melhoria de desempenho (Tabela 2).

Com relação ao efeito dos aditivos sobre as características e mineralização óssea os resultados demonstraram que não houve interação ($P>0,05$) entre os fatores estudados para o teor de cinzas, de fósforo (P) e de cálcio (Ca) e para o comprimento das tíbias ($P>0,05$). Também não houveram efeitos dos fatores isolados e dos tratamentos adicionais, sobre as características citadas, deste modo, os aditivos (cobre e enramicina) não influenciaram estes parâmetros quando comparados às rações isentas de AMD ($P>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Características da mineralização óssea de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre

Fonte	Nível	Cinzas %	% P	% Ca	CT, mm	PT ^{1,2} mg	I.S ¹ , mg/mm
CuSO ₄	30	51,21	7,27	15,45	74,33	2965,9	39,92
	100	50,91	7,50	15,74	73,33	3048,4x	41,56
Cu(HMTBa) ₂	30	50,81	6,94	15,53	72,67	3029,2a	41,74a
	100	51,16	7,62	15,84	72,33	2755,1by	38,12b
Fonte x Nível (Média)		51,02	7,33	15,63	73,16	2949,7	40,33
Fonte							
CuSO ₄		51,06	7,38	15,60	73,83	3007,2	40,74
Cu(HMTBa) ₂		50,98	7,28	15,68	72,50	2892,2	39,93
Nível							
30		51,00	7,10	15,49	73,50	2997,7	40,83
100		51,03	7,56	15,79	72,83	2901,8	39,84
Tratamentos adicionais (TA)							
Controle negativo (CN)		51,36	7,30	15,44	73,00	2868,9	39,30
Controle positivo (CP)		51,52	7,61	15,74	73,17	2956,9	40,46
Média TA		51,43	7,46	15,59	73,08	2912,9	39,88
Erro Padrão da Média		0,37	0,28	0,36	0,73	82,5	1,22
Coeficiente de Variação		1,79	9,42	6,03	2,45	6,88	7,45
Probabilidades							
Fonte (F)		0,8360	0,7082	0,8144	0,0781	0,1736	0,5115
Nível (N)		0,9373	0,1176	0,4254	0,3690	0,2549	0,4237
F x N		0,3914	0,4361	0,9776	0,6516	0,0387	0,0393
Tratamentos adicionais		0,7656	0,4370	0,5728	0,8730	0,4567	0,5049
Fatorial x TA		0,2086	0,5997	0,8885	0,8961	0,6108	0,6748

¹ Médias seguidas por letras minúsculas (a,b) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (desdobramento de nível dentro de cada fonte de cobre(P<0,05). ² Médias seguidas por letras minúsculas (x,y) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (desdobramento de fonte dentro de cada nível de cobre(P<0,05).)). CN- Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP)-Rações contendo Enramicina 8% 10g/t como AMD. %P- porcentagem defósforo; % Ca- Porcentagem de cálcio; CT- Comprimento da tibia; PT- Peso da tibia; IS- Índice de Seedor.

Houve interação entre nível e fonte de cobre avaliados para o peso das tíbias (P<0,05). O desdobramento da interação demonstrou que ao se utilizar o maior nível de suplementação de cobre (100mg/kg), a fonte CuSO₄ proporcionou maior peso das tíbias. Por outro lado o grupo das aves submetidas a rações com Cu(HMTBa)₂ na dosagem de 30mg/kg apresentaram maior peso quando comparado àquelas alimentadas com 100mg/kg. Não houve efeito dos tratamentos adicionais sobre o peso das tíbias das aves neste experimento (P>0,05) (Tabela3).

Para o índice de seedor houve interação entre os fatores avaliados (P<0,05). Após a análise do desdobramento foi observado que utilizando a

fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ o menor nível de cobre 30mg/kg proporcionou a obtenção de maior índice de seedor em tíbias quando comparado aos efeitos observados no nível mais elevado (100mg/kg). Não foi observado efeito dos tratamentos adicionais sobre o índice de seedor em tíbias, demonstrando que o uso do cobre em dosagens supranutricionais e da enramicina não afetaram o índice de seedor quando comparado as rações isentas de AMD.

DISCUSSÃO

A fase inicial de criação de frangos de corte é marcada pelo rápido desenvolvimento da ave e por importantes mudanças fisiológicas que envolvem o desenvolvimento de diferentes sistemas, dentre eles o sistema muscular e o sistema ósseo (Penz &Vieira, 1998). Nesta fase o De acordo com o estresse ocasionado pela presença de patógenos provoca a redução no consumo de alimentos e a ineficiência na utilização dos nutrientes ingeridos que pode levar ao aumento do gasto energético para ativação do sistema imunológico logo o comprometimento desta fase de desenvolvimento afeta negativamente o desempenho final do lote. (Siegel 1995).

A suplementação de cobre na dieta de frangos de corte em substituição aos antibióticos convencionais tem demonstrado resultados positivos sobre o desempenho de frangos de corte, pois seu efeito antimicrobiano tem possibilitado a redução da microbiota patogênica e conseqüentemente dos efeitos deletérios decorrentes da sua presença (Arias e Koutsos, 2006)

No presente estudo foi observado que as diferentes fontes e níveis de cobre influenciaram o desempenho de frangos de corte aos 10 e 22 dias. Segundo Pang e Applegate (2007) uma possível explicação para as diferentes respostas observadas sobre o consumo de ração entre as diferentes fontes de cobre pode estar relacionada às diferentes biodisponibilidades que as fontes de cobre apresentam e conseqüentemente aos diferentes efeitos provocados no trato gastrointestinal.

De maneira similar aos resultados verificados no presente experimento Kim et al. (2011) concluíram que ao utilizar o nível mais elevado de cobre (100 mg/kg de cobre) as aves apresentaram maior ganho de peso na fase inicial (10

dias) em comparação com o nível inferior (50mg/kg de cobre). Baker et al. (1991) relataram melhorias no ganho de peso quando as aves foram alimentadas com rações suplementadas com níveis de cobre de 125 a 250mg/kg.

Diferindo dos resultados do presente experimento Arias e Koutsos. (2006) observaram que aos 14 dias as aves alimentadas com 188mg/kg de cobre com as fontes sulfato de cobre e cloreto de cobre tribásico (TBCC) apresentaram ganho de peso superior ao controle negativo. No presente estudo, apesar das respostas observadas com a avaliação do ensaio fatorial (nível x fonte), não foram verificadas diferenças entre os grupos de aves submetidas à rações com níveis supranutricionais de cobre e aquelas submetidas à rações com AMD ou sem aditivos para fins de melhoria de desempenho. As diferenças nas respostas encontradas no comparativo dos estudos podem estar associadas aos diferentes níveis de cobre utilizados para fins de melhoria de desempenho (100 *versus* 188 mg/kg).

Os resultados encontrados por Karimi et al. (2011) corroboram com os resultados do presente estudo. De acordo com os autores, a suplementação de cobre (150 mg/kg utilizando o sulfato de cobre na ração) não apresentou efeito aos 14 e 21 dias sobre o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar quando comparado ao controle negativo.

Luo et al. (2005) observaram que ao utilizar um nível elevado da fonte sulfato de cobre (450mg/kg) o consumo de ração piorou. Estes resultados diferem daqueles encontrados no presente estudo onde a utilização do maior nível de cobre não limitou o consumo de ração. Há que se ressaltar, no entanto, a diferença entre os níveis (100 *versus* 450mg/kg) e como já relatado, níveis acima de 250 mg/kg podem provocar alguns efeitos negativos para frangos de corte.

De acordo com Jensen & Winge (1998); Zhu et al. (1998) quando há elevação do nível de cobre, ocorre a alteração da homeostase intracelular, podendo provocar a inativação e morte das células e conseqüentemente a lesão tecidual em órgãos como proventrículo e moela, afetando a ingestão de alimentos.

Semelhante aos dados obtidos no presente experimento Brainer et al. (2003); Miles et al. (1998) o cobre não influenciou o ganho de peso e a

conversão alimentar de frangos de corte aos 21 dias quando comparado ao controle negativo.

Diferente do presente estudo Kim et al. (2011) não observaram relação entre os níveis e as fontes de cobre utilizadas sobre o consumo de ração aos 21 dias. No entanto com relação ao ganho de peso o grupo de aves que foi suplementada com a fonte proteínato de cobre com nível de 100 mg/kg de cobre apresentou maior ganho de peso que as aves do controle negativo. Os resultados da conversão alimentar corroboram com o presente experimento, onde não houve efeito da fonte de cobre utilizada sobre este parâmetro.

Os dados obtidos no presente trabalho diferem dos obtidos por Lim et al. (2006), estes observaram que aos 21 dias o ganho de peso das aves suplementadas com quelato de cobre-metionina (100mg/kg de cobre) foi superior ao das aves pertencentes ao grupo controle, no entanto, semelhante aos dados do presente experimento a conversão alimentar não foi afetada.

Existe divergência na literatura sobre os efeitos benéficos da utilização profilática do cobre sobre as características de desempenho de frangos de corte, sendo necessários mais estudos que permitam conclusões mais aprofundadas a respeito deste assunto (Banks et al., 2004a).

De acordo com Angel (2006) a formação óssea das aves tem início após a incubação e continua de forma mais intensa nas duas primeiras semanas pós-eclosão. O nível de cinzas do esqueleto do pintainho se eleva de 19,87% no primeiro dia de vida, para 27,74% aos 10 dias.

Nas atuais linhagens de frangos de corte, principalmente nos machos, a taxa de crescimento muscular é elevada, tendo início numa fase precoce, sobre um suporte esquelético ainda imaturo (Gonzales e Mendonça Júnior, 2006) desse modo, os minerais possuem um papel essencial na nutrição de frangos de corte, pois a deficiência ou excesso dietético impossibilita a expressão do desempenho na fase de crescimento (Muniz et al, 2007).

Os resultados encontrados no presente experimento diferem dos encontrados por Banks et al., (2004a), estes autores observaram que as aves alimentadas com a dieta contendo uma fonte orgânica de cobre (cobre-lisina 250 mg/kg) tiveram maior percentagem de cinzas nas tíbias e maior percentagem de fósforo quando comparados com as aves alimentadas com o mesmo nível de sulfato de cobre.

De acordo com Maenz et al. (1999) o aumento da porcentagem de cinzas e de fósforo pode em aves suplementadas com fontes quelatadas de cobre pode acontecer pela menor formação do complexo fitina-mineral, possibilitando a ação da fitase e conseqüentemente maior retenção de fósforo (e eventualmente outros minerais) nos ossos.

Os resultados obtidos por Pekel et al. (2012), Pang e Applegate. (2007) corroboram com os resultados de fósforo obtidos no presente estudo. Os autores não observaram alteração no teor de fósforo nas tíbias nas aves suplementadas com diferentes fontes de cobre comparadas ao tratamento controle.

Os dados do presente estudo se assemelham aos resultados encontrados por Banks et al. (2004b) onde ao utilizarem sulfato de cobre e fitase observaram que os tratamentos com uso de cobre não afetaram a porcentagem de cinzas nas tíbias. Estes dados sugerem que os níveis e a fontes de cobre utilizadas não inibiram a capacidade de fitase de hidrolisar os grupos fosfatos a partir da molécula de fitato.

No presente experimento os diferentes níveis e fontes de cobre não influenciaram o nível de cálcio nas tíbias das aves, no entanto há evidências na literatura científica da ação antagônica do cobre sobre cálcio, com o aumento do nível de cobre resultaria na redução na absorção de cálcio (Underwood, 1977).

Apesar de não ter sido observado efeito antagônico do cobre sobre o fósforo e o cálcio no presente estudo, é possível que ocorra o antagonismo do cobre com outros microminerais como o zinco e o manganês, formando complexos insolúveis (Leeson e Summers, 2001). Deste modo, a resposta observada quando o nível mais elevado de cobre 100mg/kg utilizando a fonte supostamente mais biodisponível $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ pode ter afetado a absorção de outros microminerais e por conseqüência ter influenciado o peso e na densidade das tíbias das aves.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a suplementação de cobre em nível supranutricional na maior dosagem avaliada (100 mg/kg) proporciona aumento no consumo (1-22 dias), ganho de peso (1-22 dias) e melhoria na conversão alimentar (1-10 dias).

A interação entre os faros estudados indicaram que a fonte Cu(HMTBa)_2 quando usada na menor dosagem avaliada (30 mg/kg) gera menor consumo de ração (1-10 dias e 1-22 dias) e conseqüente menor ganho de peso (1-10 dias).

A mineralização óssea (cinzas, cálcio e fósforo na tíbia) não é afetada pelo uso do cobre supranutricional nos níveis avaliados, independente da fonte.

Alterações no peso e densidade da tíbia em função do nível e fonte de cobre utilizados indicam que podem ocorrer interações entre microminerais que impactam na formação óssea e assim sugere-se mais estudos para elucidar tais questões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGEL, R.; POWERS, W.; BASTYR, S. et al. Dietary modifications to reduce air emissions from broiler chickens. **Workshop on Agricultural Air Quality: State of Science**. p. 460-463, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland. AOAC International, 2005.

ARIAS, V. J.; KOUTSOS, E. A. Effects of copper source and level on intestinal physiology and growth of broiler chickens. **Poultry Science**, v.85, p.999-1007, 2006.

BAKER, D. H.; ODLE, J.; FUNK, M. A. et al. Bioavailability of copper in cupric oxide, cuprous, and in a copper-lysine complex. **Poultry Science**, v.70, p.177-179, 1991.

BANKS, K. M.; THOMPSON, K. L.; RUSH, J. K. et al. Effects of copper source on phosphorus retention in broiler chicks and laying hens. **Poultry Science**. v.83, p.990-996, 2004.

BANKS, K. M.; THOMPSON, K. L.; JAYNES, P. The effects of copper on the efficacy of phytase, growth, and phosphorus retention in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 83, p.1335-1341, 2004.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de Monogástricos**. Editora UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil. 2012. 373p.

BRAINER, M. M. A.; MENTEN, J. F. M.; VALE, M. M. et al. Cupric citrate as growth promoter for broiler chickens in different rearing stages. **Scientia Agricola**, v.60, p.441-445, 2003.

- CHAMPAGNE, E. T.; FISHER, M. S.; O. HINOJOSA. NMR and ESR studies of interactions among divalent cations, phytic acid, and N-acetyl-amino acids. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.38, p.199–215, 1990.
- COBB. **Suplemento: Desempenho e Nutrição para Frangos de Corte Cobb500**. São Paulo : Cobb-Vantress Brasil, 2012, 12p.
- 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.
- GONZALES, E.; MENDONÇA JÚNIOR, C. X. Problemas locomotores em frangos de corte. In: VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. **Anais...** Núcleo de Médicos Veterinários. Chapecó-SC. p. 79-94. 2006.
- JENSEN, L. T.; WINGE, D. R. Identification of a copper induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v.17, p.5400-5408, 1998.
- KARIMI A.; BEDFORD, M.R.; SADEGHI, G.H et al. Influence of dietary nonphytate phosphorus levels and phytase supplementation on the performance and bone characteristics of broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.13, p.43–51, 2011.
- KHALID, M. F.; HUSSAIN, M.; REHMAN, A. U. et al. Broiler performance in response to phytate and supplemented phytase. **Iranian Journal of Applied Science**,v.3, p.1-12, 2013.
- KIM, G.B.; SEO, Y.M.; SHIN, K.S. et al. Effects of supplemental Copper- Methionine chelate and Copper -Soy proteininate on the performance, blood parameters, liver mineral content, and intestinal microflora of broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, p.21-32, 2011.
- LEESON, S.; SUMMERS, J. **Nutrition of the chicken**. 4. ed. Ontario: University Books. 2001.
- LIM, H. S.; PAIK I. K.; SOHN, T. et al. Effects of supplementary copper chelates in the form of methionine chitosan and yeast on the performance of broilers. **Asian-australasian Journal Animal Science**, v.9, p.1322–1327, 2006.
- LUO, X. G.; JI, F., LIN, Y. X., STEWARD, F. A. et al. 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.
- MAENZ, D. D.; ENGELE-SCHAAN, C. M.; NEWKIRK, R. W. et al. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. **Animal Feed Science Technology**, v.81, p.177–192, 1999.
- MILES, R. D.; O'KEEFE, S. F.; HENRY, P. R. et al. 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.
- MUNIZ, E. B.; ARRUDA, A. M. V.; FASSANI, E. J. et al. Avaliação de fontes de cálcio para frangos de corte. **Revista Caatinga**, v.20, n.1, p.05-14, 2007.
- PANG, Y.; T. J. APPLGATE. Effects of dietary copper supplementation and copper source on digesta pH, calcium, zinc, and copper complex size in the gastrointestinal tract of the broiler chicken. **Poultry Science**, v.86, p.531–537, 2007.
- PEKEL, A.Y.; DEMIREL, G.; ALP, M. et al. Influence of different dietary copper sources on eggshell quality and phosphorus retention in laying hens. **Journal of Applied Poultry Research**, v.21, p.460-466, 2012.

PENZ JUNIOR, A. M.; VIEIRA, S. L. Nutrição na primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO'98 de CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1998. p.121-139.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; KORNEGAY, E. T. Phytates: Occurrence, bioavailability, and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v.6, p.125–143, 1995.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. **Jaboticabal: Funep**, 2007, 283p.

SEEDOR, J. G.; QUARRACCIO, H. H.; THOMPSON, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Bone and Mineral Research**, v.6, p.339-346, 1991.

SIEGEL, H. Stress, strains and resistance 1. **British Poultry Science**, v. 36, p.3–22, 1995.

UNDERWOOD, E. J. **Trace Elements in Human Nutrition**. 4. ed. New York: Academic Press, 1977. 545p.

VASANTH, S.; DIPU, M. T.; MERCY, A. D. et al. Studies on production performance in broiler chicken supplementing copper and flavomycin in feed. **International Journal of Technical Research and Application**, v.3, p.269-272, 2015.

WANG, Z.; CERRATE, S.; COTO, C. et al. Evaluation of Mintrex copper as a source of copper in broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, v.6, p.308-313, 2007.

YEGANI, M.; KORVER, D. R. Application of egg yolk antibodies as replacement for antibiotics in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.66, p.27–37, 2010.

ZHAO, J.; SHIRLEY, R. B.; VAZQUEZ-ANON, M. et al. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield and foot pad health in commercial meat broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 19, p.365-372, 2010.

ZHU, Z.; LABBE, S.; PENA, M. M. et al. Identification of a copper induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.1277–1280, 1998.

CAPÍTULO 2 – Nível de cobre dietético superior aos usuais, melhoram o desempenho e morfometria intestinal de frangos de corte

Artigo a ser submetido ao Scientie Agricola, Qualis A2 na Área Zootecnia/Não Ruminantes

RESUMO

Utilizou-se 1.440 pintos de corte da linhagem Cobb com objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de duas fontes de cobre (Cu) o CuSO_4 e o $(\text{Cu}(\text{HMTBa})_2)$ associadas a dois níveis supranutricionais, 30 e 100mg/kg somados a dois tratamentos adicionais: controle positivo (Enramicina, 10mg/kg) e controle negativo (isento de aditivo melhorador de desempenho) sobre o desempenho, biometria, morfometria intestinal e parâmetros imunológicos. Os resultados do desempenho demonstraram que a utilização de 100mg/kg de cobre proporcionou maior consumo de ração. A utilização do Cu em NS melhorou o ganho de peso e a conversão alimentar ($P<0,05$). Ao utilizar a fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ com nível mais baixo houve aumento do peso relativo do jejuno ($P<0,05$). A utilização do Cu em NS aumentou a profundidade de cripta e a superfície de absorção no jejuno e íleo ($P<0,05$). Os resultados de imunidade aos 21 dias demonstraram que a dosagem de óxido nítrico (ON) foi superior nas aves suplementadas com CuSO_4 , controle negativo e utilizando 30mg/kg de Cu. O maior NS de Cu reduziu a dosagem de ON aos 38 dias. A dosagem de MTT aos 21 dias foi superior nas aves do controle negativo e aos 38 dias utilizando 100mg/kg de CuSO_4 e 30mg/kg de $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$. Os resultados do experimento indicam que a suplementação de Cu em NS supranutricional afeta positivamente o desempenho de frangos de corte, podendo ser uma alternativa aos antimicrobianos convencionais. As características intestinais também são influenciadas pela utilização do Cu afetando diretamente a superfície de absorção dos nutrientes e podem ser a explicação para a melhoria do desempenho. A suplementação de Cu em NS reduz a produção de ON demonstrando menor ativação do sistema imune.

Palavras chave: imunidade, intestino delgado, microminerais, suplementação, vilosidades intestinais.

INTRODUÇÃO

A utilização do cobre em nível supranutricional na dieta de frangos de corte é frequente, sendo caracterizado por melhorar o desempenho devido seu

efeito antimicrobiano, assim como, pela alteração da microbiota intestinal das aves (Pesti e Bakalli, 1996; NRC, 1994). Acredita-se que a forma como o cobre atua sobre o desempenho esteja relacionada com a redução da microbiota patogênica no trato gastrointestinal (Arias e Koutsos, 2006). A presença de patógenos pode provocar alterações na mucosa intestinal, sendo relacionada a mudanças na morfologia intestinal, reduzindo o comprimento ou altura das vilosidades e aumentando a profundidade das criptas (Xu et al., 2003) afetando o processo de digestão e absorção dos nutrientes (Kawai e Morotomi, 1978). A utilização do cobre como agente antimicrobiano, provoca a redução da microbiota patogênica e das substâncias tóxicas produzidas por estes patógenos reduzindo a atividade metabólica da mucosa intestinal e consequentemente os requisitos de energia para as células do epitélio intestinal, permitindo que a energia poupada no processo de renovação celular esteja disponível para o ganho de peso e consequentemente melhoria no desempenho (Radecki, 1992).

Na mucosa intestinal encontram-se linfócitos e macrófagos pertencentes ao sistema imunológico inato e (eventualmente) adquirido, responsáveis por manter o ambiente intestinal regulado e pela produção de citocinas e óxido nítrico (Shao et al, 2001). Alterações na microbiota intestinal podem estimular a uma resposta imunológica sistêmica (Tlaskalova-Hogenova et al., 2004).

Em resposta a invasão de patógenos ocorre à produção de metabólitos reativos ao oxigênio em excesso tais como H_2O_2 , radicais livres, óxido nítrico, estes oxidantes podem danificar o tecido saudável (Kogut et al., 2011; Weiss e Socha, 2005). O cobre atua como co-fator da superóxido dismutase e ceruloplasmina, enzimas que atuam como antioxidantes responsáveis pela eliminação de patógenos protegendo as membranas celulares dos radicais de oxigênio ativos (Lukasewycz e Prolaska, 1990).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de diferentes fontes de cobre em níveis supranutricionais sobre o desempenho aos 38 dias, biometria e morfometria intestinal e características imunológicas de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB/UFRB) localizada no município de Cruz das Almas no período de maio a julho de 2015.

Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 1440 pintos de um dia (distribuídos em 36 parcelas contendo 40 aves cada uma), machos, da linhagem Cobb-500, provenientes de incubatório registrado no MAPA, vacinados contra principais desafios/doenças de incidência regional. As aves foram alojadas em um galpão experimental sendo utilizados 36 boxes com área de 3,13 m² (1,78 x 1,88) onde foram distribuídos um comedouro tubular, um bebedouro pendular e foi utilizado cama, proveniente de criação comercial (reutilizada) visando potencializar a possibilidade de ocorrer desafio microbiológico. O aquecimento foi realizado com uso de campânulas a gás. Todos os procedimentos realizados neste estudo seguiram padrões e normas vigentes de acordo com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com distribuição dos tratamentos em esquema fatorial 2x2+2, no qual foram avaliadas duas fontes de cobre, sendo o sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄ x 5H₂O) e o cobre complexado ao ácido 2-Hidroxi-4-metiltiobutanóico (Cu(HMTBa)₂), que representa em outras palavras um átomo de cobre ligado a duas moléculas de metionina hidroxí-análoga (78% equivalente metionina) sendo realizada a correção para que as dietas apresentassem a mesma concentração deste aminoácido. As duas fontes foram associadas a dois níveis de cobre 30mg/kg e 100mg/kg nas rações e com dois tratamentos adicionais, um controle positivo utilizando Enramicina como aditivo melhorador de desempenho (AMD) e um controle negativo onde as rações eram isentas de AMD.

Rações experimentais

As aves foram alimentadas com rações à base de milho, farelo de soja com uso farinha de carne e ossos nas primeiras fases (visando potencializar o desafio microbiológico) com suplementação de fitase (com redução de 0,1 ponto percentual para cálcio e fósforo), seguindo um programa alimentar com rações pré-inicial (1-10 dias), inicial (11-22 dias), engorda (23-38 dias) baseado nas recomendações nutricionais descritas no Guia da linhagem Cobb (2012) (Tabela 1). A obtenção dos tratamentos ocorreu em função da substituição dos ingredientes teste pelo material inerte (areia lavada).

As rações referentes aos tratamentos adicionais (controle positivo e controle negativo) apresentaram cobre com nível nutricional (10mg/kg) sendo atendido através do uso do premix de microminerais.

Com exceção dos níveis de cobre, assim como o uso de AMD, as rações entre os grupos experimentais foram isoenergéticas, isoproteicas e apresentaram mesmos níveis para os macronutrientes cálcio, fósforo, e sódio, assim como para os aminoácidos metionina, lisina, treonina e triptofano.

Tabela 1. Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Pré-inicial	Inicial	Engorda
	(1 a 10 dias)	(11 a 22 dias)	(23 a 38 dias)
Milho	60,236	63,978	64,202
Farelo de Soja	33,397	29,256	27,918
Farinha Carne ossos 42	3,698	3,342	-
Fósforo bicálcico	-	-	0,900
Óleo de Soja	0,750	1,633	4,891
Calcário	0,427	0,434	0,832
Sal	0,459	0,439	0,457
Met-Hidroxi-Analoga ¹ 84	0,365	0,315	0,286
L-Lisina HCl 78	0,186	0,154	0,143
L-Treonina 98	0,048	0,029	0,040
Premix Vitamínico ²	0,120	0,100	0,100
Premix Mineral ³	0,050	0,050	0,050
Cl-Colina 60%	0,096	0,086	0,077
Fitase 10.000ftu/g	0,005	0,005	0,005
Narasina 10%	0,050	0,070	-
Tratamentos + Inerte	0,113	0,109	0,113
Total	100	100	100
Composição Nutricional Calculada			
Proteína Bruta (%)	21,8	20,0	18,0
EMAn ⁴ (Kcal/kg)	2950	3050	3250
Calcio (%)	0,80	0,74	0,66
Fósforo Disp. (%)	0,35	0,32	0,28
Sódio (%)	0,22	0,21	0,20
Lisina digestível (%)	1,18	1,05	0,95
Metionina+Cistina digestível (%)	0,88	0,80	0,74
Treonina digestível (%)	0,77	0,69	0,65

¹MHA Metionina Hidroxi Análoga;

²Premix vitamínico - Níveis de garantia/kg do produto: Vitamina A 10.000.000 UI; Vitamina D 3.000.000 UI/kg; Vit. E 40.000 UI; Vit. K₃ 3.000mg; Vit B₁ 2.000mg; Vit B₂ 7.000mg; Vit. B₆ 5.000mg; Vit. B₁₂ 20.000µg; Ac. Fólico 1.500mg; Ac. Pantotênico 15.000 mg; Niacina 50.000mg; Biotina 100mg; Selênio 250mg, Anti-oxidante 125mg.

³Premix micromineral - Níveis de garantia/kg do produto: Mn 160g; Zn 100g; Fe 100g; Cu 20g; I 2.000mg. Nos tratamentos do ensaio fatorial foi usado um premix micromineral isento de cobre, porém com mesmos níveis dos demais microminerais.

⁴EMAn- Energia metabolizável

Análises experimentais

Desempenho

Para avaliação do desempenho zootécnico foram realizadas pesagens das aves ao alojamento, aos 10, 22 e 38 dias de idade. A ração ofertada foi pesada antes do fornecimento de acordo com cada fase e as sobras foram pesadas com 10, 22 e 38 dias para a determinação do consumo de ração e posterior cálculo da conversão alimentar. A mortalidade foi monitorada diariamente e usada para correção no consumo de ração conforme Sakomura e Rostagno (2007).

Biometria intestinal

Aos 23 dias uma ave por parcela (previamente selecionada na pesagem aos 22 dias representando o peso médio da parcela \pm 2%) foi pesada e submetida à eutanásia e então retirado todo o tubo gástrico intestinal. O comprimento do intestino delgado foi determinado considerando o início do duodeno até a junção íleo-cecal. Foi feita a separação entre as regiões duodeno, jejuno e íleo. Os três segmentos foram medidos, retirado o conteúdo alimentar e então pesados.

Foram estudadas as seguintes variáveis relacionadas a biometria: comprimento e peso relativo do duodeno, jejuno, íleo e comprimento relativo do intestino delgado íntegro. Os resultados das características mensuradas foram expressos em: gramas por kg peso vivo (g/kg) para peso relativo dos órgãos; e centímetros por kg peso vivo (cm/kg) para comprimento relativo do intestino.

Morfometria intestinal

Para avaliação morfométrica um pequeno segmento (2 cm de comprimento) do jejuno e do íleo foram coletados e cuidadosamente foram lavados com solução fisiológica. Os segmentos foram fixados em formalina 10% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, por 24 horas. Posteriormente foi realizada a clivagem dos fragmentos de tecido e em seguida foi realizada a fixação em álcool a 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 30 minutos cada e em Xilol I e Xilol II por 20 minutos cada. Após a fixação foi realizado o embocamento em Parafina I e Parafina II por 01 hora cada.

Dos blocos foram obtidos cortes seriados em micrótomo semi-automático ajustado para 5 μ m, os cortes obtidos foram colocados em lâmina de vidro, sendo corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina. Para realização das análises histométricas as lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD® acoplado a uma câmera digital, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem através do software de captura Leica LAS EZ® (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA).

A fotomicrografia foi analisada por um programa do software Image J®. A calibração do programa foi realizada utilizando uma fotomicrografia no

mesmo aumento (4 x) de uma régua micrométrica onde 69 pixels corresponderam a 100 micrômetros.

A análise histométrica se deu através de medições realizadas em imagens digitais obtidas em objetiva de 4x. Foram mensurados de cada animal: 10 alturas das vilosidades intestinais, 10 médias de largura de vilosidades (média aritmética entre as medidas proximal, média e distal da vilosidade em relação à base das mesmas) e 10 profundidades de criptas, para determinação da relação vilo/cripta foi dividido a altura da vilosidade pela profundidade da cripta (Alvarenga et al. 2004).

Através das medidas das vilosidades (largura e altura do vilo), foi realizado o cálculo da superfície de absorção (SA) segundo a metodologia de (Sakamoto et al., 2000) de acordo com a fórmula:

$$SA \text{ (mm}^2\text{)} = [(2\pi) \times (\text{largura das vilosidades} / 2) \times (\text{altura das vilosidades})]$$

Características imunológicas

Aos 23 e 38 dias uma ave com peso vivo representativo dentro da parcela foi imobilizada, foi realizada assepsia prévia e então colhido sangue por perfuração da veia ulnar cutânea. Foram utilizadas agulhas heparinizadas o sangue foi dispensado em tubos sem anticoagulante para posterior separação das células mononucleares.

As amostras foram diluídas em PBS na proporção de 1:3 (1mL de sangue para 3mL de PBS) 2 mL desta diluição foi dispensada delicadamente sobre a mesma quantidade de Percoll pH 8,5-9,5 (25°) testado em cultura (Sigma) diluído (Percoll, NaCl 1,5M e água destilada). As amostras então foram centrifugadas por 30 minutos a 400g em seguida retirou-se o anel de células polimorfonucleares e lavou-se com 1 mL de PBS por 7 minutos a 400g.

As células foram ressuspensas com 1 mL de meio de cultura (meio RPMI) suplementado com 10% (v/v) com soro fetal bovino contendo 2% de penicilina e estreptomicina. Foi realizada a contagem das células na Câmara de Neubauer e utilizado volume final de 5×10^5 células por mL, a quantidade de meio RPMI variou de acordo com o volume celular de cada poço de modo que o volume final por poço fosse de 500 μ L. As placas foram incubadas em estufa com temperatura de 37° e com atmosfera úmida a 5% de CO₂ por 60 horas.

Avaliação do metabolismo mitocondrial

Após a obtenção das células mononucleares em sangue periférico, o metabolismo mitocondrial das respectivas células foi avaliado pelo método de conversão do MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo em formazan] (Carmichael et al., 1987). Este se baseia na redução do sal tetrazolato e foi utilizado para verificar o metabolismo mitocondrial. Passadas 60 horas da incubação das culturas de células mononucleares foi retirado o meio e foi adicionado 400 µL de meio contendo MTT em cada poço para realização do metabolismo mitocondrial, as placas foram novamente incubadas por 2 horas. Após 2 horas foi adicionado 400 µL de DMSO por poço. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570nm e os resultados apresentados por meio de densidade óptica.

Avaliação do metabolismo oxidativo

Para posterior análise de óxido nítrico foi retirado o sobrenadante das culturas de células mononucleares amostras e centrifugado, lavou-se duas vezes com PBS e o conteúdo obtido foi congelado em ependorffs identificados.

A quantidade de nitrito (NO^{-2}) formado no sobrenadante das culturas foi usado como um marcador para a produção de óxido nítrico (NO) de acordo com o método de Griess (Won et al., 2004). Resumidamente, alicotas dos meios de culturas (50µL), foram adicionados com igual volume 1:1 (v/v) em uma mistura de 1% sulfanilamida, 5% de ácido fosfórico e 0,1% N-etilenodiamina (1-naftil). A leitura foi realizada em uma absorbância de 490 nm usando um leitor de microplacas. As curvas padrões foram geradas em diluições seriadas do nitrito de sódio em meio de cultura e os resultados foram expressos em µg de proteína.

Dosagem de proteína

O teor de proteína das culturas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951) (Bio-Rad, Hercules, CA). Após a retirada do sobrenadante foi adicionado 200 µL de tampão de extração de proteína contendo 2% (v/v) SDS, 2mM EGTA, 4M de uréia, 0,5% (v/v) de Triton X-100, 62.5mm de Tris -HCl (pH 6,8) suplementado com 0,1% (v/v) de um coquetel de inibidores de protease (Sigma, St. Louis, MO). A leitura foi realizada em uma absorbância de 620 nm

usando um leitor de microplacas Universal Elx 800 (Biotek, Inc, EUA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANOVA avaliando-se as pressuposições para o atendimento da mesma. Foi utilizado o pacote estatístico SISVAR, onde inicialmente foi realizada análise estatística global na qual foi considerado o quadrado médio do erro para decompor e testar a interação, fatores isolados e os tratamentos adicionais. Utilizou-se o teste de F e contrastes de interesse entre os tratamentos adotando-se a probabilidade para significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do desempenho (1-38 dias) demonstram que não houve interação ($P>0,05$) entre os fatores estudados (fonte x nível de cobre) para consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar. Da mesma maneira, não houve efeito dos níveis ou das fontes de cobre utilizadas para ganho de peso e conversão alimentar ($P>0,05$). Em outra via, houve efeito de nível de cobre para o consumo de ração, onde o grupo de aves suplementadas com maior nível de cobre (100mg/kg) tiveram maior consumo de ração que o grupo de aves que recebeu 30 mg/kg de cobre.

Houve diferença entre o controle negativo (rações isentas de AMD) e o controle positivo (rações com enramicina como AMD) para conversão alimentar ($P<0,05$), onde o grupo de aves do controle negativo apresentou uma pior conversão alimentar. O contraste entre o grupo de aves do ensaio fatorial versus os tratamentos adicionais foi significativo ($P<0,05$) indicando que as aves suplementadas com cobre apresentaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar que aquelas que receberam a suplementação com enramicina como aditivo melhorador de desempenho (AMD) e as aves que não receberam nenhum AMD (Tabela 2).

Não houve interação, efeito dos fatores isolados ou dos tratamentos adicionais sobre a viabilidade ($P>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Fonte	Nível (mg/kg)	CR 1-38d, g	GP ² 1-38d, g	CA ^{1,2} 1-38d, kg/kg	Viab. 1-38d, (%)
CuSO ₄	30	4311,5	2694,3	1,60	96,19
	100	4327,9	2714,7	1,59	97,62
Cu(HMTBa) ₂	30	4258,1	2677,1	1,59	96,19
	100	4370,6	2720,6	1,61	97,14
Fonte x Nível (Média)		4317,1	2701,7*	1,60*	96,78
Fonte					
CuSO ₄		4319,7	2704,5	1,60	96,90
Cu(HMTBa) ₂		4314,3	2698,9	1,60	96,67
Nível (mg/kg)					
30		4284,8 B	2685,6	1,60	96,19
100		4349,3 A	2717,7	1,60	97,38
Tratamentos adicionais (TA)					
Controle negativo (CN)		4288,0	2641,1	1,62A	96,19
Controle positivo (CP)		4287,8	2679,4	1,60B	98,57
Média TA		4287,9	2660,2*	1,61*	97,38
Erro Padrão da Média		28,33	18,14	0,006	1,24
Coeficiente de Variação		1,61	1,65	0,92	3,15
Probabilidades					
Fonte (F)		0,8488	0,7588	0,8588	0,85
Nível (N)		0,0297	0,0881	0,4255	0,3477
F x N		0,099	0,5278	0,0771	0,85
Tratamentos adicionais		0,9952	0,1459	0,0104	0,1874
Fatorial x TA		0,2422	0,0131	0,0119	0,5858

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente (P<0,05). ² Médias seguidas asterisco (*) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (média do fatorial e do adicional) (P<0,05). CN- Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP)-Rações contendo Enramicina 8% 10g/t como AMD. CR-Consumo de ração; GP- Ganho de peso; CA- Conversão alimentar; Viab- Viabilidade.

Os resultados do presente estudo corroboram com os obtidos por Arias e Koutsos (2006) onde as aves alimentadas com 188mg/kg de sulfato de cobre apresentaram maior ganho de peso do que as aves do controle negativo (isentas de AMD).

Wang et al. (2014) também encontraram efeitos positivos da suplementação do cobre utilizando o cloreto de cobre tribásico, com nível de 200 mg/kg de cobre observando-se um ganho de peso superior e uma melhor conversão alimentar corroborando com o presente estudo os autores também não encontraram efeito da suplementação de cobre sobre a viabilidade de criação.

De acordo com Xia et al. (2004) o cobre além de efeito antimicrobiano tem demonstrado grande efeito sobre crescimento e conversão alimentar de frangos de corte quando administrado em níveis supranutricionais.

Semelhante ao que foi obtido no presente estudo Pesti e Bakalli (1996) observaram maior ganho de peso de frangos de corte ao se utilizar 125 e 250 mg/kg de ração e em outro estudo utilizando 65-125 mg/kg. Os autores observaram uma melhor conversão alimentar em aves alimentadas com citrato de cobre nas doses de 125 mg/kg, no entanto ao aumentar a dose para 250 mg/kg de cobre a conversão alimentar das aves piorou, demonstrando que o cobre pode ter tanto efeitos positivos quanto negativos sobre o desempenho a depender da fonte e especialmente do nível utilizado.

Diferindo dos resultados do presente estudo Lim et al. (2006) verificaram que ao utilizar cobre com uma fonte quelatada (cobre-metionina) houve efeito positivo sobre o desempenho das aves com melhoria na conversão alimentar. A suplementação com cobre-metionina proporcionou maior ganho de peso e melhor conversão alimentar às aves quando comparado as aves do controle negativo onde as rações eram isentas de AMD.

Em acordo com o presente experimento Paik et al. (1999) verificaram em pesquisas com quelatos de cobre e relataram que a suplementação de cobre metionina com níveis de 100-125 mg/kg de cobre promoveu melhor desempenho de frangos de corte. Hong et al. (2002) também concluíram que a suplementação de 100mg/kg de cobre como cobre-metionina atuou positivamente sobre desempenho de frangos de corte.

Com relação às análises de biometria intestinal foram avaliados o comprimento e peso relativo do duodeno, jejuno, íleo e do intestino delgado total. Para o comprimento do duodeno não houve interação ($P > 0,05$), efeito dos níveis de cobre supranutricional e dos tratamentos adicionais ($P > 0,05$), no entanto houve efeito de fonte, onde as aves suplementadas com $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ apresentaram maior comprimento ($P < 0,05$) de duodeno que as aves suplementadas com CuSO_4 (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimento relativo de segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Fonte	Nível (mg/kg)	CD ¹ , cm/kg	CJ, cm/kg	CI, cm/kg	CID, cm/kg
CuSO ₄	30	20,26	44,97	45,07	110,30
	100	20,82	44,16	44,99	109,97
Cu(HMTBa) ₂	30	22,53	47,94	45,03	115,52
	100	22,06	41,77	44,29	108,12
Fonte x Nível (Média)		21,42	44,71	44,85	110,98
Fonte					
CuSO ₄		20,54B	44,57	45,03	110,14
Cu(HMTBa) ₂		22,30A	44,86	44,66	111,82
Nível (mg/kg)					
30		21,40	46,46	45,05	112,91
100		21,44	42,96	44,64	109,04
Tratamentos adicionais (TA)					
Controle negativo (CN)		21,97	43,95	46,43	115,71
Controle positivo (CP)		19,95	47,30	45,31	109,21
Média TA		20,96	45,62	45,87	112,46
Erro Padrão da Média		0,85	2,15	2,10	4,10
Coeficiente de Variação		9,79	11,71	11,43	9,02
Probabilidades					
Fonte (F)		0,0472	0,8919	0,8603	0,9149
Nível (N)		0,9605	0,1149	0,8468	0,6994
F x N		0,5447	0,2217	0,8757	0,8628
Tratamentos adicionais		0,1030	0,2797	0,7082	0,4049
Fatorial x TA		0,5390	0,6275	0,5781	0,8160

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente (P<0,05). (CN) Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP)- Rações contendo Enramicina 10g/t como AMD. CD- Comprimento do duodeno; CJ- Comprimento do jejuno; CI- Comprimento do íleo; CID- Comprimento do intestino delgado

Não houve interação significativa (P>0,05) para comprimento do jejuno, íleo, e do intestino delgado total, assim como não houve efeito de nível e/ou de fonte (fatores isolados), e dos tratamentos adicionais (P>0,05) (Tabela 3).

De acordo com Ito et al. (2004) o comprimento do intestino pode ser influenciado por diferentes fatores como componentes da dieta, a presença de aditivos melhoradores de desempenho, alteração na microbiota intestinal, incidência patologias entéricas e intensidade do ganho de peso da fase inicial.

Com relação ao peso relativo do intestino delgado, no duodeno não houve interação, efeito de nível e/ou de fonte (P>0,05), no entanto houve diferença entre o peso do duodeno das aves dos tratamentos adicionais, onde

as aves que receberam antibiótico como AMD tiveram menor peso relativo do duodeno que as aves do controle negativo ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Peso relativo de segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Fonte	Nível (mg/kg)	PD ¹ , g/kg	PJ ¹ , g/kg	PI ¹ , g/kg	PID, g/kg
CuSO ₄	30	8,21	14,42	11,54	34,18
	100	7,99	13,51	10,89	32,40
Cu(HMTBa) ₂	30	8,98	15,67	12,58	37,24
	100	8,64	14,15	12,26	35,06
Fonte x Nível (Média)		8,44	14,44	11,82	34,72
Fonte					
CuSO ₄		8,10	13,97	11,22B	33,29
Cu(HMTBa) ₂		8,81	14,91	12,42A	36,15
Nível (mg/kg)					
30		8,60	15,05A	12,06	35,71
100		8,31	13,83B	11,57	33,73
Tratamentos adicionais (TA)					
Controle negativo (CN)		9,19A	14,45	11,98	35,63
Controle positivo (CP)		7,70B	13,31	11,73	32,76
Média TA		8,44	13,88	11,85	34,19
Erro Padrão da Média		0,47	0,50	0,55	1,27
Coeficiente de Variação		13,79	8,71	11,56	9,06
Probabilidades					
Fonte (F)		0,1481	0,0714	0,0394	0,0626
Nível (N)		0,5585	0,0233	0,3873	0,3343
F x N		0,9033	0,5475	0,7657	0,5754
Tratamentos adicionais		0,0352	0,1226	0,7563	0,221
Fatorial x TA		0,8689	0,2148	0,95	0,4853

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente ($P < 0,05$). (CN) Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP) Rações contendo Enramicina 8% 10g/t como AMD.

PD- Peso do duodeno; PJ- Peso do Jejuno; PI- Peso do íleo; PID- Peso do intestino delgado.

Não houve interação entre os fatores estudados para o peso relativo do jejuno também não houve efeito de nível e dos tratamentos adicionais ($P > 0,05$). Por outra via as aves que receberam suplementação com nível mais elevado de cobre (100mg/kg) apresentaram menor peso relativo do jejuno quando comparado às aves que receberam a suplementação com o nível mais baixo ($P < 0,05$) (Tabela 4).

O peso relativo dos segmentos intestinais pode estar relacionado ao processo de renovação celular possivelmente em decorrência da lesão provocada por patógenos intestinais e toxinas produzidas por estes agentes. Logo no jejuno o maior nível de cobre, bem como a utilização de antimicrobiano convencional pode ter reduzido a microbiota patogênica e seus efeitos, alterando peso deste segmento intestinal.

Estes resultados podem ser explicados por Pang e Applegate (2009), os autores concluíram que utilização do cobre em níveis supranutricionais pode ser responsável pela alteração no perfil de microrganismos presentes no trato gastrointestinal, provocando aumento do pH ileal. Estes autores observaram que a utilização do cobre supranutricional na dieta pode inibir seletivamente algumas bactérias patogênicas como a *Escherichia coli* (consequentemente as toxinas produzidas por estas bactérias) e estimular bactérias benéficas como os lactobacilos.

Não houve interação entre os fatores estudados para o peso relativo do íleo, da mesma forma não houve efeito de nível isoladamente e dos tratamentos adicionais ($P>0,05$), no entanto houve diferença entre as fontes de cobre utilizadas, onde as aves que receberam a dieta com $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ apresentaram maior peso relativo do íleo ($P<0,05$) (Tabela 4).

Tekeli et al. (2010) sugerem que as alterações no peso do intestino estejam relacionadas à redução no número de bactérias patogênicas, reduzindo consequentemente o processo inflamatório provocado por toxinas produzidas por estas bactérias, levando a redução da espessura e a um menor peso órgão.

O peso relativo do intestino delgado total não apresentou interação entre fonte e nível de cobre, da mesma forma não houve efeito de nível isoladamente e dos tratamentos adicionais ($P>0,05$) (Tabela 4).

As análises da morfometria intestinal demonstraram que no jejuno não houve interação, efeito dos fatores isolados e dos tratamentos adicionais sobre a altura das vilosidades ($P>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Características da morfometria do jejuno de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre

Fonte	Nível (mg/kg)	AV, μm	LV ¹ , μm	PC ^{1,2} , μm	AV:PC	SA, mm^2
CuSO ₄	30	1586	171	216	7,39	0,84
	100	1554	175	179	8,78	0,85
Cu(HMTBa) ₂	30	1491	181	226	6,97	0,85
	100	1447	181	206	7,58	0,81
Fonte x Nível (Média)		1520	177	207*	7,68	0,84*
Fonte						
CuSO ₄		1570	173	197	8,09	0,85
Cu(HMTBa) ₂		1467	181	216	7,28	0,83
Nível (mg/kg)						
30		1539	176	221	7,18	0,85
100		1500	178	193	8,18	0,83
Tratamentos adicionais (TA)						
Controle negativo (CN)		1522	133B	201A	7,63	0,64
Controle positivo (CP)		1383	176A	156B	8,88	0,75
Média TA		1452	155	178*	8,26	0,70*
Erro Padrão da Média		66	12	15	0,68	0,05
Coeficiente de Variação		10,8	18,58	19,45	21,42	18,30
Probabilidades						
Fonte (F)		0,5457	0,5389	0,2345	0,2493	0,7486
Nível (N)		0,5683	0,8823	0,0826	0,1584	0,8344
F x N		0,9263	0,9050	0,5875	0,5803	0,7234
Tratamentos adicionais		0,1472	0,0262	0,0484	0,2083	0,1699
Fatorial x TA		0,2504	0,0547	0,0463	0,3424	0,0092

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente ($P < 0,05$). ² Médias seguidas por asterisco (*) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (média do fatorial e dos adicionais) ($P < 0,05$). (CN) Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP) Rações contendo Enramicina 8% 10g/t como AMD

AV- Altura de vilosidade; LV- Largura de vilosidade; PC- Profundidade de cripta; AS- Superfície de absorção.

Radecki et al. (1992) também não observaram efeito da suplementação de 250mg/kg sulfato de cobre sobre a altura das vilosidades no jejuno.

A análise da morfometria do íleo demonstrou que não houve interação, efeito dos fatores isolados e dos tratamentos adicionais sobre a altura das vilosidades ($P > 0,05$), no entanto entre os tratamentos adicionais as aves que receberam suplementação com enramicina (controle positivo) apresentaram maior altura de vilosidades e o contraste entre o grupo de aves do ensaio

fatorial versus os tratamentos adicionais foi significativo, a média dos diferentes tratamentos com cobre supranutricional foi superior à média dos tratamentos adicionais ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Características da morfometria do íleo de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Fonte	Nível (mg/kg)	AV ^{1,2} , μm	LV ¹ , μm	PC ² , μm	AV:PC	SA, mm^2
CuSO ₄	30	1033	178	226	4,78	0,58
	100	1039	154	214	4,87	0,49
Cu(HMTBa) ₂	30	960	180	247	4,11	0,53
	100	1037	188	226	4,71	0,60
Fonte x Nível (Média)		1017*	175	228*	4,62	0,55*
Fonte						
CuSO ₄		1036	166	220	4,83	0,54
Cu(HMTBa) ₂		997	184	237	4,41	0,57
Nível (mg/kg)						
30		996	184	236	4,45	0,56
100		1035	171	220	4,79	0,54
Tratamentos adicionais (TA)						
Controle negativo (CN)		834A	205A	186	4,63	0,53
Controle positivo (CP)		984B	144 B	183	5,36	0,44
Média TA		909*	175	185*	4,99	0,48*
Erro Padrão da Média		51	14	17	0,40	0,03
Coeficiente de variação		12,86	20,33	20,1	20,66	17,98
Probabilidades						
Fonte (F)		0,4585	0,2255	0,3487	0,3045	0,7486
Nível (N)		0,4364	0,5907	0,3570	0,3905	0,8344
F x N		0,5080	0,2915	0,8129	0,5372	0,7234
Tratamentos adicionais		0,0476	0,0059	0,8874	0,2047	0,1699
Fatorial x TA		0,0221	0,9763	0,0077	0,2857	0,0092

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente ($P < 0,05$). ² Médias seguidas asterisco (*) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (média do fatorial e do adicional) ($P < 0,05$). (CN) Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP) Rações contendo Enramicina 8% 10g/t como AMD.

AV- Altura de vilosidade; LV- Largura de vilosidade; PC- Profundidade de cripta; AS- Superfície de absorção.

Corroborando com os dados deste trabalho Arias e Koutsos (2006) não encontraram efeito da suplementação de cobre supranutricional sobre a altura das vilosidades do jejuno e no íleo.

Diferindo Semelhante aos resultados obtidos no presente estudo Xia et al. (2004) observaram o aumento de altura das vilosidades do íleo de aves suplementadas com cobre metionina. De acordo com os resultados encontrados no presente experimento uma maior altura das vilosidades está diretamente relacionado aos resultados de desempenho, pois o ganho de peso superior e melhor conversão alimentar estão associados à integridade da mucosa intestinal, logo quanto maior a altura dos vilos, maior é a capacidade de digestão e absorção de nutrientes, em virtude de uma maior área de contato e atividade enzimática superior no nível de mucosa e lúmen intestinal.

Com relação à largura das vilosidades no jejuno não houve interação, efeito dos níveis ou das fontes de cobre utilizadas ($P>0,05$). Em outra via houve diferença entre o controle positivo e o controle negativo ($P<0,05$), onde as aves que receberam ração com antibiótico como AMD apresentaram vilosidades mais largas (Tabela 5).

Os resultados referentes à largura das vilosidades no íleo demonstraram que a interação não foi significativa e não houve efeito dos níveis ou das fontes de cobre ($P>0,05$), no entanto houve diferença entre os tratamentos adicionais ($P<0,05$), onde as aves que receberam ração com enramicina como AMD tiveram vilosidades mais estreitas diferindo dos resultados obtidos no jejuno (Tabela 6).

As análises da profundidade de cripta do jejuno não demonstraram interação, efeito dos níveis ou das fontes ($P>0,05$), no entanto foi observada diferença entre controle positivo e o controle negativo, onde as aves que receberam enramicina como AMD apresentaram menor profundidade de cripta ($P<0,05$) (Tabela 5). Também houve diferença entre a média dos tratamentos com cobre em níveis elevados e a média dos tratamentos adicionais ($P<0,05$), onde as aves que receberam a suplementação com cobre supranutricional apresentaram maior profundidade de cripta.

Este mesmo comportamento na resposta ocorreu com a profundidade de cripta no íleo, a interação não foi significativa, não houve efeito dos níveis ou das fontes ($P>0,05$), por outra via o contraste entre o grupo de aves do ensaio

fatorial e os tratamentos adicionais foi significativo ($P < 0,05$), onde as aves suplementadas com cobre apresentaram maior profundidade de cripta do que as aves dos tratamentos adicionais (Tabela 6).

Corroborando com os resultados do presente estudo Arias e Koutsos (2006) observaram que no jejuno as aves do controle positivo com uso do antibiótico demonstraram menor profundidade das criptas comparação ao controle negativo. De acordo com os autores uma cripta profunda indica maior renovação celular e conseqüentemente uma grande demanda de energia e nutrientes para este fim.

De acordo com Xu et al. (2003) a estrutura da mucosa intestinal pode oferecer informações sobre a saúde do trato gastrointestinal. Diferentes agentes presentes na digesta podem provocar rapidamente alterações na mucosa intestinal devido o contato direto com a superfície da mucosa. Xia et al. (2004) observaram que criptas mais profundas têm sido associadas à presença de toxinas bacterianas.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo Arias e Koutsos (2006) observaram que aves alimentadas com sulfato de cobre tiveram maior profundidade de criptas no íleo em comparação com aquelas que suplementadas com o controle positivo com uso antibiótico como AMD.

A suplementação com antibióticos como AMD tende a reduzir a microbiota intestinal patogênica potencial e os compostos tóxicos produzidos, deste modo pode ocorrer menor lesão tecidual, exigindo menor renovação celular. Sugere-se que por este motivo tenha sido observada menor profundidade de cripta no grupo aves pertencente ao controle positivo e maior profundidade de criptas das aves que receberam rações isentas de AMD no presente experimento.

Apesar do cobre apresentar efeito antimicrobiano, sua utilização em níveis mais elevados foi relacionada ao aumento da profundidade de criptas. Este efeito pode estar associado à lesão tecidual provocada pela alteração da homeostase devido o aumento dos níveis de cobre no meio intracelular, levando a perda da função e a morte das células, estimulando assim o processo de renovação celular como foi descrito por Radisky e Kaplan (1999).

Os resultados da relação vilo (altura)/cripta (profundidade) no jejuno e no íleo demonstraram que não houve interação, efeito dos fatores isolados ou dos tratamentos adicionais ($P>0,05$) (Tabelas 5 e 6).

Corroborando com o presente estudo Radecki et al. (1992) não encontraram diferença na relação vilo/cripta de aves suplementadas com cobre supranutricional no jejuno e no íleo. No entanto, diferindo dos resultados do presente estudo Xia et al. (2004) observaram que a suplementação de cobre supranutricional provocou aumento da relação vilo/cripta no jejuno e no íleo quando comparado ao controle negativo isento de AMD.

Com relação à superfície de absorção do jejuno e do íleo não houve interação, efeito de nível ou da fonte e dos tratamentos adicionais ($P>0,05$), no entanto houve diferença entre a média dos tratamentos com cobre supranutricional e a média dos tratamentos adicionais, onde a superfície de absorção das aves suplementadas com cobre supranutricional foi superior ($P<0,05$) (Tabela 5 e 6).

Os dados referentes à dosagem do óxido nítrico (NO) corrigido para proteínas (normatização dos resultados) e de MTT em culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) aos 23 e 38 dias estão apresentados na tabela 7. Os resultados de NO aos 23 dias demonstraram que não houve interação ($P>0,05$), no entanto houve diferença entre as fontes, os níveis e os tratamentos adicionais ($P<0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Características imunológicas de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Fonte	Nível (mg/kg)	ON/ μ g de prot 23d ¹	ON/ μ g de prot 38d ^{1,4}	MTT 23d ¹	MTT 38d ^{1,2,3,4}
CuSO ₄	30	42,70	6,36	0,22	0,38by
	100	25,32	4,07	0,25	0,83a
Cu(HMTBa) ₂	30	27,94	7,94	0,25	0,60x
	100	15,37	4,38	0,26	0,73
Fonte x Nível (Média)		27,83	5,69*	0,25	0,64*
Fonte					
CuSO ₄		34,01A	5,22	0,24	0,61
	Cu(HMTBa) ₂	21,66B	6,16	0,26	0,67
Nível (mg/kg)					
30		35,32A	7,15A	0,24	0,49A
100		20,345B	4,22B	0,25	0,78B
Tratamentos adicionais (TA)					
	Controle negativo (CN)	40,78A	4,62	0,25A	0,74
	Controle positivo (CP)	14,48B	3,13	0,20B	0,72
	Média TA	27,63	3,87*	0,23	0,73*
	Erro Padrão da Média	4,403	0,58	0,015	0,05
	Coefficiente de Variação	38,85	28,13	15,45	18,87
Probabilidades					
	Fonte (F)	0,0087	0,1119	0,1243	0,2271
	Nível (N)	0,0019	0,0000	0,2004	0,0000
	F x N	0,5889	0,2984	0,6257	0,0038
	Tratamentos adicionais	0,0002	0,0820	0,0353	0,8300
	Fatorial x TA	0,9574	0,0012	0,246	0,0364

¹ Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes (A,B) na coluna para fatores isolados, diferem estatisticamente (P<0,05). ² Médias seguidas por letras minúsculas (a,b) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (desdobramento de nível dentro de cada fonte de cobre(P<0,05)). ³ Médias seguidas por letras minúsculas (x,y) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (desdobramento de fonte dentro de cada nível de cobre(P<0,05)). ⁴ Médias seguidas asterisco (*) diferentes na coluna, diferem estatisticamente (média do fatorial e do adicional) (P<0,05) (CN) Rações isentas de aditivo melhorador de desempenho (AMD), (CP)- Rações contendo Enramicina 8% 10g/t como AMD. ON/ μ g de prot21d- óxido nítrico / μ g de proteína 23 dias; ON/ μ g de prot 38d- óxido nítrico / μ g de proteína 38 dias; MTT 23 d- Metabolismo mitocondrial 23dias; MTT 38 d Metabolismo mitocondrial 38dias.

A produção de óxido nítrico pelas CMSP de aves submetidas à fonte CuSO₄ foi 57% superior (34,01 x 21,66) que as CMSP de aves submetidas a fonte Cu(HMTBa)₂. Dentro dos níveis de cobre utilizados as CMSP das aves que foram suplementadas com o 30mg/kg de cobre apresentaram dosagem de NO 74% maior (35,32 x 20,35) do que as aves que receberam o nível mais elevado de cobre (100mg/kg). Entre os tratamentos adicionais a produção de NO em CMSP de aves que receberam rações isentas de AMD foi superior à dosagem observada CMSP de aves que receberam suplementação com enramicina como AMD

Aos 38 dias os dados de NO não apresentaram interação e efeito de fonte ($P > 0,05$). Por outra via houve diferença entre os níveis de cobre utilizados e entre a média do ensaio fatorial e dos tratamentos adicionais ($P < 0,05$). Com relação aos níveis, foi observada maior dosagem de NO em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de aves suplementadas com o nível mais baixo de cobre (30mg/kg). Entre as médias dos tratamentos com cobre supranutricional e a média dos tratamentos adicionais as CMSP de aves submetidas aos tratamentos com cobre supranutricional apresentaram maior dosagem de NO (Tabela 8).

O NO é uma molécula produzida pelo sistema imune que tem recebido destaque por parte dos pesquisadores, devido sua função mediadora citotóxica de células imunes efetoras ativadas. Ela atua como mensageiro, é um radical livre modulador em diversos processos biológicos (Beckman e Koppenol, 1996).

No presente experimento os dados de NO foram mais elevados quando se utilizou um à fonte inorgânica de cobre, uma dosagem mais reduzida (30 mg/kg) e no controle negativo sem o uso de antibiótico como AMD. Estes dados sugerem um efeito protetor do cobre como antimicrobiano quando usado em maior nível (100mg/kg), semelhante ao obtido no tratamento com o controle positivo, resultando em menor ativação da resposta imunológica e consequentemente a produção de NO.

Este suposto efeito protetor (menor produção de NO) pode estar relacionado ao fato do cobre atuar como co-fator enzimático auxiliando a ceruloplasmina e a superóxido dismutase na eliminação de patógenos capazes de estimular a produção óxido nítrico e provocar danos em células do sistema imunológico (Lukasewycz e Prolaska, 1990).

Chin et al. (2008) observaram que a produção de NO pelos macrófagos e por células endoteliais foi uma medida de defesa do organismo contra antígenos, corroborando com este experimento onde tanto aos 21 quanto aos 38 dias houve elevação na dosagem de NO nos tratamentos que utilizaram uma dosagem mais baixa de cobre (30 mg/kg), nos tratamentos que não utilizaram antibiótico como AMD (controle negativo). Nestes tratamentos, pode ter ocorrido menor proteção frente aos desafios microbiológicos em nível intestinal para as aves.

Os dados de MTT aos 23 dias demonstraram que não houve interação, efeito dos níveis ou das fontes de cobre utilizadas ($P>0,05$). No entanto foi observada diferença entre a produção de MTT em CMSP de aves do controle positivo e do controle negativo, onde a dosagem de MTT foi mais elevada em CMSP de aves que receberam ração isenta de AMD (Tabela 7).

O aumento do metabolismo mitocondrial (aumento da dosagem de MTT) podem acontecer em decorrência de uma resposta imunológica provocada no campo quando as aves podem ter sido submetidas ao desafio bacteriano e da consequente memória celular. Os resultados do MTT encontrados no presente estudo sugerem que as aves que receberam a ração contendo antibiótico como AMD (controle positivo) tenham reduzido a resposta imunológica, pelo menor metabolismo mitocondrial observado, por serem submetidas a um menor desafio.

Yang et al. (2008) utilizaram o MTT para avaliar a proliferação de linfócitos em culturas CMSP. Os autores observaram que houve o aumento da proliferação de linfócitos em CMSP (conseqüentemente do MTT) após o desafio com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). De acordo com Liu et al. (2003) o aumento da proliferação de linfócitos está associada a com uma resposta imunológica de fase aguda.

Aos 38 dias houve interação para a dosagem de MTT ($P<0,05$). Quando as aves foram submetidas à fonte CuSO_4 a dosagem de MTT em CMSP de aves suplementadas com o nível mais elevado de cobre (100mg/kg) foi superior a dosagem em CMSP de aves suplementadas 30mg/kg. Quando as aves foram suplementadas com o nível mais baixo de cobre (30mg/kg) houve maior dosagem de MTT em CMSP de aves submetidas a fonte $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ em comparação a fonte CuSO_4 (Tabela 7).

Não foi observado efeito de fonte e dos tratamentos adicionais ($P>0,05$), por outro lado os níveis de cobre supranutricional utilizados provocaram diferença na dosagem de MTT, onde as CMSP de aves suplementadas com 100mg/kg de cobre apresentaram maior dosagem de MTT. Também foi observada diferença entre a média dos tratamentos com cobre supranutricional e dos tratamentos adicionais, a dosagem de MTT em CMSP de aves dos tratamentos adicionais foi superior ($P<0,05$).

Diferente dos resultados obtidos no presente estudo Yang et al. (2008) não observaram efeito da suplementação de cobre sobre a proliferação de linfócitos e conseqüente sobre a dosagem de MTT em CMSP frangos de corte.

No presente experimento foi observado que o nível mais elevado de cobre foi responsável por uma maior dosagem de MTT, este efeito pode ter ocorrido devido aumento do cobre intracelular e maior lesão em mitocôndrias estimulando a proliferação celular compensatória e um maior metabolismo, outra hipótese é que as células onde houve maior dosagem de MTT sejam mais eficientes e tenham um metabolismo mais elevado. Para elucidação destas hipóteses são necessários mais estudos que avaliem o efeito do cobre sobre a resposta imunológica de frangos de corte.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o desempenho de frangos de corte é eficientemente melhorado (ganho de peso e conversão alimentar) com o uso de AMD e cobre em dosagem supranutricional e assim consolida-se a estratégia do uso de cobre em níveis mais elevados para fins de melhoria de rendimento na avicultura de corte.

O aumento na superfície de absorção e a profundidade de cripta (renovação celular) do jejuno e íleo com o uso de cobre em altos níveis explicam em parte as respostas obtidas sobre o desempenho e o modo de ação do cobre em nível intestinal.

A fonte orgânica de cobre ($\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$) aumentou comprimento relativo do duodeno, peso relativo do íleo e gerou menor produção de óxido nítrico (menor ativação do sistema imune) e assim mostrou-se potencialmente mais efetiva.

O maior nível de cobre estudado (100 mg/kg) proporciona menor ativação do sistema imune observada por meio da menor produção de óxido nítrico em células mononucleadas do sangue periférico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga, B. O.; Beletti, M. E.; Fernandes, E. A.; Silva, M. M.; Campos, L. F. B.; Ramos, S. P. 2004. Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte. *Bioscience Journal* 20: 55-59.
- Arias, V.J.; Koutsos, E.A. 2006. Effects of Copper Source and Level on Intestinal Physiology and Growth of Broiler Chickens. *Poultry Science* 85: 999-1007.
- Beckman, J.S.; Koppenol, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology* 271: 1424- 1437.
- Carmichael, J.; DE Graff, W.G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a Tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47: 936.
- Chin, M.P.; Schauer, D.B.; Deen, W.M. 2008. Prediction of nitric oxide concentrations in colonic crypts during inflammation. *Nitric Oxide* 19: 266-275.
- Hong, S. J.; Lim, H. S.; Paik, I. K. 2002. Effects of Cu and ZnMethionine chelates supplementation on the performance of broiler chickens. *The Journal of Animal Science and Technology* 44: 399-406.
- Ito, N. M. K.; Mijayi, C. I.; Lima, E. A.; Okabayaski, S. 2004. Saúde gastrointestinal, manejos e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. p. 207-215. In: Mendes, A.A.; Nääs, I.A.; Macari, M. *Produção de frangos de corte*. FACTA. Campinas, SP.
- Kawai, Y.;Morotomi, M. 1978. Intestinal enzyme activities in germfree, conventional, and gnotobiotic rats associated with indigenous microorganisms. *Infection and Immunity* 19: 771-778.
- Kogut, M.H.; He, L.H.; Genovese, K.J.; 2011. Bacterial toll-like receptor agonists induce sequential NF- κ B-mediated leukotriene B4 and prostaglandin E2 production in chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145: 159-170
- Lim, H. S.; Paik I. K.; Sohn, T.; Kim, W.Y. 2006. Effects of supplementary copper chelates in the form of methionine chitosan and yeast on the performance of broilers. *Asian-australasian Journal Animal Science* 9: 1322–1327.
- Liu, Y.L.; Li, D.F.; Gong, L.M.; Yi, G. F.; Gaines, A. M.; Carroll, J. A. 2003. Effects of fish oil supplementation on the performance and the immunological, adrenal, and somatotropic responses of weaned pigs after an *E. coli* lipopolysaccharide challenge. *Journal of Animal Science* 81: 2758–2765.
- Lowry, O.H.; Rosenbroug, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lukasewycz, O.A, Prohaska, J. R. 1990. The immune response in copper deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* 87: 147–159.
- National Research Council [NRC]. 1994. *Nutrient requirements of poultry*. 9ed. Washington.
- 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-Australasian Journal of Animal Sciences* 12: 794-798.
- Pang, Y.; Patterson, J.A.; Applegate, T. J.; 2009. The influence of copper concentration and source on ileal microbial. *Poultry Science* 88: 586-592.

- Pesti, M. G.; R. I. Bakalli. 1996. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. *Poultry Science* 75:1986-1091.
- Radecki, S.V.; Ku, P.K.; Bennink, M. R.; Yokoyama, M.T.; Miller, E. R. 1992 Effect of dietary copper on intestinal mucosa enzyme activity, morphology, and turnover rates in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 70: 1424-1431.
- Radisky, D.; Kaplan. 1999. regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 4481–4484.
- Sakomura, N. K.; Rostagno, H. S. 2007. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. Jaboticabal, SP, Brasil.
- Shao, L.; Serrano, D.; Mayer, L.; 2001. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Seminars in Immunology* 13: 163–176.
- Sakamoto, K.; Hirose, E, H.; Onizuka, A.; Hayashi, M.; Futamura, N.; Kawamura, Y.; Ezaki, T. 2000. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *Journal of Surgical Research* 94: 99-106.
- Tekeli, A.; Kutlu, H. R. C.; Elik, L.; Doran, F. 2010. Determination of the effects of *Z. officinale* and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. *International Journal of Poultry Science* 9: 898-906.
- Traskalova-Hogenova, H.; Stepankova, R.; Hudcovic, T.; Tuckova, L.; Cukrowska, B.; Lodinova-Zadnikova, R.; Kozáková, H.; Rossmann, P.; Bártová, J.; Sokol, D.; Funda, D.P.; Borovská, D.; Reháková, Z.; Sinkora, J.; Hofman, J.; Drastich, P.; Kokesová, A. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* 93: 97-108.
- Wang, H. Zhang, C.; Mi, Y.; Kidd, M.T. 2014. Copper and lysine amino acid density responses in commercial broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* 23: 470-477.
- Weiss, W.P.; Socha, M.T. 2005. Dietary manganese for dry and lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 88: 2517–2523.
- Won, J. S.; Im, Y. B.; Singh, A. K.; Singh, I. 2004. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1834-1844.
- Xia, M.S.; Hu, C.H.; Xu, Z.R. 2004. Effects of copper bearing montmorillonite on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science* 83: 1868-1875.
- Xu, Z.R.; Hu, C.H.; Xia, M.S.; Zhan, X.A.; Wang, M.Q. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science* 82: 648–654.
- Yang, X. J.; Guo, Y. M.; He, X.; Yuan, J. M.; Yang, Y.; Wang, Z. 2008. Growth performance and immune responses in chickens after challenge with lipopolysaccharide and modulation by dietary different oils. *Animal* 2: 216– 223.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente experimento permitem concluir que a utilização de diferentes fontes e níveis de cobre na dieta de frangos de corte proporciona efeitos positivos sobre o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar na fase inicial de criação (1-22 dias). Ao avaliar o efeito das fontes de cobre utilizadas no presente experimento foi possível observar que a fonte (Cu(HMTBa)₂) com nível mais reduzido de cobre (30mg/kg) afetou negativamente o consumo de ração e por consequência o ganho de peso.

A partir dos resultados do desempenho final conclui-se que o cobre pode ser utilizado de forma eficiente como AMD em substituição aos antimicrobianos convencionais, pois proporciona melhor ganho de peso e conversão alimentar.

O cobre demonstrou não afetar a mineralização óssea (cinzas, cálcio e fósforo na tíbia), no entanto alterações observadas no do peso e densidade da tíbia indicam que podem ocorrer interações entre microminerais impactando o desenvolvimento ósseo.

Avaliando dados da biometria intestinal foi possível concluir que a fonte de cobre normalmente considerada mais biodisponível (Cu(HMTBa)₂) aumentou comprimento relativo do duodeno e o peso relativo do íleo.

Os resultados da morfometria intestinal demonstraram que níveis mais elevados de cobre podem afetar a profundidade de cripta e a superfície de absorção influenciando diretamente a absorção de nutrientes e os resultados do desempenho de frangos de corte.

A resposta imunológica foi influenciada pela utilização de cobre em níveis supranutricionais, pois este reduziu a produção de óxido nítrico pelas CMSP, demonstrando menor ativação do sistema imune.

Deste modo sugere-se mais estudos que possibilitem o entendimento do efeito de diferentes fontes e níveis de cobre sobre o desempenho, a mineralização óssea, as características intestinais e imunológicas de frangos de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGEL, R. 2007. Metabolic disorders: limitations to growth of and mineral deposition into the broiler skeleton after hatch and potential implications for leg problems. **The Journal of Applied Poultry Research** 16: 138-149.
- ARIAS, V.J.; KOUTSOS, E.A. 2006. Effects of Copper Source and Level on Intestinal Physiology and Growth of Broiler Chickens. **Poultry Science** 85: 999-1007.
- BAIERLE, M.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; MORO, A.; BARBOSA JUNIOR, F.; GARCIA, S.C. 2010. Possible effects of blood copper on hematological parameters in elderly, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 46: 463-470.
- BAKER, D.H.; ODLE, J.; FUNK, M.A.; WIELAND, T.M. 1991. Research note: bioavailability of copper in cupric oxide, cuprous oxide and in a copper-lysine complex. **Poultry Science** 70: 177-179.
- BANKS, K.M.; THOMPSON, K.L.; JAYNES, P.; APPLGATE, T.J. 2004. The effects of copper on the efficacy of phytase, growth, and phosphorus retention in broiler chicks. **Poultry Science** 83: 1335-1341.
- BANKS, W.J. 1991. **Tecidos de sustentação - osso**. p. 137-165. In: Banks, W.J. *Histologia veterinária*. 2ª ed. Manole. São Paulo.
- BELLONI, M.; ALMEIDA PAZ, I.C.L.; NÄÄS, I.A.; GARCIA, R.G.; BALDO, G.A.A.; CAVICHILO, F.; ALVES, M.C.F.; CALDARA, F.R. 2012. Morfometria intestinal de poedeiras suplementadas com própolis. **Agrarian** 5: 174-180.
- BENSON, B.N.; CALVERT, C.C.; ROURA, E.; KLASING, K.C. 1993. Dietary energy source density modulate the expression immunologic stress in chicks. **Journal of Nutrition** 123: 1714-1723.
- BHASKARAM, P. Immunobiology of mild micronutrient deficiencies. 2001. **British Journal of Nutrition** 85: 75-80.
- BUNCH, R.J.; MCCALL, J.T.; SPEER, V.C.; HAYS, V.W. 1965. Copper supplementation for weanling pigs. **Journal Animal Science** 24: 995-1000.
- CADENAS, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review of Biochemistry** 58: 79-110.
- CARLTON, W.; HENDERSON, W. 1965. Chickens fed a copper-deficient diet supplemented with ascorbic acid, reserpine, and diethylstilbestrol. **Journal of Nutrition** 85: 67-72.
- CARLTON, W.W.; HENDERSON, W. Histopathological lesions observed in the long bones of chickens fed a copper-deficient diet. **Poultry Science** 41: 1634-1962.
- CHOI, Y. J.; I. K. PAIK. 1989. The effect of supplementing copper sulfate on the performance of broiler chicken. **Journal of Animal Nutrition**. 13: 193-200.
- ERDMAN, J. W., Jr. 1979. Oilseed phytates: Nutritional implications. **Journal of the American OilChemists'Society** 56: 736-741.
- EVANS, G.; GRACE, C.; VOTAVA, H. 1975. Proposed mechanism of zinc absorption in the rat. **American Journal of Physiology** 228: 501-505.
- EWING, H.P.; PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I.; MENTEN, J.F.M. 1998. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate, cupric citrate and copper oxychloride to broiler chickens. **Poultry Science** 77: 445-448.
- FISHER, C.; LAURSEN-JONES, A.P.; HILL, K.J.; HARDY, W.S. 1973. The effect of copper sulphate on performance and the structure of the gizzard in broilers. **British Poultry Science** 14: 55-68.

- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. 2002. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica Brasileira** 46: 265-271.
- GEORGIEVSKII, V.I. 1982. **General information on minerals**. p. 11-56. In: V. I. Georgievskii, B. N. Annenkov and V. I. Samokhin Mineral nutrition of animals. Butterworths, London.
- HAHN, J.D.; BAKER, D.H. 1993. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacological levels of zinc. **Journal Animal Science** 71: 3020-3024.
- HALLIWELL, B. 1997. Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology** 38: 3-20.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 5 ed. Clarendon Press: Oxford.
- HAWBAKER, J.A., SPEER, V.C.; HAYES, V.W.; CATRON, D.V. 1961. Effects of copper sulfate and other chemoprophylactics in growing swine rations **Journal Animal Science** 20: 163-167.
- HERBERT, V.; JAYATILLEKE, E. 1996. Vitamin C-driven free radical generation from iron. **Journal of Nutrition** 126: 1213-1220.
- HILL, C.H.; MATRONE, G. 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. **Federation Proceedings** 29: 1474-1481.
- HILL, C.H.; MALTRONE, G. 1961. Studies on copper and iron deficiency in growing chickens. **Journal Nutrition** 73: 425-431.
- HODGKINSON, V.; PETRIS, M.J. 2012. Copper homeostasis at the host pathogen interface. **The Journal of Biological Chemistry** 287: 13549-13555.
- HUMPHREY, B.D.; KLASING, K.C. 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. **World's Poultry Science Journal** 60: 90-100.
- JENKINS, N. K., MORRIS, T. R.; VALAMOTIS, D. 1970. The effect of diet and copper supplementation on chick growth. **British Poultry Science**. 11: 241-248.
- JENSEN, L. S.; MAURICE, D. Y. 1979. Influence of sulfur amino acids on copper toxicity in chicks. **Journal of Nutrition** 09: 91-91.
- JENSEN, L. T.; WINGE, D. R. 1998. Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces Cerevisiae*. **The Embo Journal** 17: 5400-5408.
- KEYER, K.; IMLAY, J. A. 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free iron levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93: 13635-13640.
- KIM, G. B., SEO, Y. M., SHIN, K. S., RHEE, A. R., HAN, J., PAIK, I. K. 2011. Effects of supplemental copper-methionine chelate and copper-soy proteinate on the performance, blood parameters, liver mineral content, and intestinal microflora of broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research** 20: 21-32.
- KLASING, K.C. 2007. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science** 48: 525-537.
- KNIGHT, S. A.; LABBE, S.; KWON, L. F.; KOSMAN, D. J.; THIELE, D. J. 1996. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. **Genes & Development** 10: 1917-1929.
- KOLLER, L. D.; MULHERN, S. A.; FRANKEL, N. C.; STEVEN, M. G.; WILLIAMS, J. R. 1987. Immune dysfunction in rats fed a diet deficient in copper. **The American Journal of Clinical Nutrition** 45: 997-1006.
- LAURIN, D. E.; KLASING, K. C. 1987. Effects of repetitive immunogen injections and fasting versus feeding on iron, zinc, and copper metabolism in chicks. **Biological Trace Element Research** 14: 153-165.
- LEDOUX, D.R.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B.; MILES R.D. 1991. Estimation of the relative bioavailability of inorganic copper sources for chicks using tissue up take of copper. **Journal Animal Science** 69: 215-222.

- LEESON, S.; SUMMERS, J. 2001. **Nutrition of the chicken**. 4. ed. Ontario: University Books.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: SARVIER, 1995. 839p.
- LESER T.D.; MOLBAK L. 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. **Environmental Microbiology** 9: 2194-2206.
- LIM, H. S.; PAIK I. K.; SOHN, T. KIM, W.Y. 2006. Effects of supplementary copper chelates in the form of methionine chitosan and yeast on the performance of broilers. **Asian-australasian Journal Animal Science** 9: 1322–1327.
- LINDER, M. C. HAZEGH-AZAM, M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. **The American Journal of Clinical Nutrition** 63: 797-811.
- LIU, Z.; BRYANT, M. M.; ROLAND, D. A. 2005. Layer performance and phytase retention as influenced by copper sulfate pentahydrate and tribasic copper chloride. **Journal of Applied Poultry Research** 14: 499–505.
- LUKASEWYCZ, O. A.; PROHASKA, J. R. 1990. The immune response in copper deficiency. In: Micronutrients and immune functions. Cytokines and metabolism. New York: **The New York Academy of Sciences** 381p.
- 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. **Poultry Science** 84: 888–893.
- MACOMBER, L.; IMLAY, J. A.; 2009. The iron sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106: 8344–8349.
- MAENZ, D. D.; ENGELE-SCHAAN C. M.; NEWKIRK R. W.; CLASSEN, H. L. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. **Animal Feed Science and Technology**. 81: 177–192.
- McDONALD, P.; EDWARDS R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L.A.; WILKINSON, R.G. 2002. **Animal nutrition**. 6ed. Pearson: Edinburgh, 693p.
- McDOWEL, L. R. Copper and molybdenum – minerals in animal and human nutrition. Academy Press Inc. San Diego – California, p. 178-204, 1992.
- 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. **Poultry Science**. 77: 416–425.
- MOHANNA, C.; NYS, Y. 1998. Influence of age, sex and cross on body concentrations of trace elements (zinc, iron, copper and manganese) in chickens. **British Poultry Science**. 39: 536–543.
- NATHAN, C. F.; XIE, Q.W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry** 269: 13725–13728.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9.ed. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 176p.
- NOY, Y.; SKLAN, D. , 1998. Metabolic Responses to Early Nutrition. **Journal Applied Poultry Research** 7: 437-451.
- OBERLEAS, D. 1973. **Phytates**. p.363-371 in: Toxicants Occurring Naturally in Foods, 2 ed. Ctte. Food Protect. Food Nutr. Board Nat. Res. Council, ed. National Academy of Sciences: Washington, DC.
- OPSAHL, W.; ZERONIAN, H.; ELLISON, M.; LEWIS, D.; RUCKER, R.B.; RIGGINS, R.S. 1982. Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon. **Journal of Nutrition** 112: 708-716.

- ORTOLANI, E.L. 2002. **Macro e microelementos**. p.641-651 In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. 3.ed. Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. São Paulo: Guanabara.
- PANG, Y.; PATTERSON, J.A.; APPLGATE, T. J.; 2009. The influence of copper concentration and source on ileal microbial. **Poultry Science** 88: 586-592.
- PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, M. R.; RACANICCI, A. M. C.; LONGO, F. A.; SORBARA, J. O. B. , 2006. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poultry Science** 85: 747-752.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; FIGUEIREDO, D.F.;BOIAGO, M.M.; CARVALHO. S.R.; BORDON, V.F. 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science** 7: 221-229.
- PERCIVAL, S. S. Copper and immunity. 1998. **The American Journal of Clinical Nutrition** 67: 1064-1068
- PERSSON, H.; TURK, M. NYMAN, M.; SANDBERG, A. S. 1998. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri, tetra, penta, and hexaphosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46: 3194–3200.
- PESTI, M. G.; R. I. BAKALLI. 1996. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. **Poultry Science**. 75: 1986-1091.
- PIZAURO JÚNIOR, J.M. 2002. **Estrutura e função do tecido ósseo**. p. 247-265. In: Macari, M., Furlan, R.L.;Gonzales, E. Fisiologia aviária aplicada a frango de corte. FUNEP. Jaboticabal-São Paulo.
- POUPOULIS, C.; JENSEN, L.S. 1976. Effect of high dietary copper on gizzard integrity of the chick. **Poultry Science** 55: 113-121.
- PROCHASKA, J.; DI CLEMENTE, C. 1983. Stages and processes of self-change in smoking: toward an integrative model of change. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**. 5: 390–395.
- RADECKI, S. V.; KU, P.K.; BENNINK, M. R.;YOKOYAMA, M. T.; MILLER, E.R. 1992. Effect of dietary copper on intestinal mucosa enzyme activity, morphology, and turnover rates in weanling pigs. **Journal Animal Science** 70: 1424-1431.
- RADISKY, D.; KAPLAN. 1999. Regulation of Transition Metal Transport across the Yeast Plasma Membrane. **The Journal of Biological Chemistry** 274: 4481–4484.
- RAVINDRAN V.; BRYDEN W.L.; KORNEGAY E.T. 1995. Phytates: occurrence, and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews** 6: 125–143.
- REEVES, P. G.; DEMARS, L. C. 2004. Copper deficiency reduces iron absorption and biological half-life in male rats. **Journal of Nutrition** 134: 1953-1957.
- REN, G.;HU,D.; CHENG, E.W.; VARGAS-REUS, M.A.; REIP, P.; ALLAKER, R. P. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **International Journal of Antimicrobial Agents** 33: 587-590.
- RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L. K.; CANAL, C. W.; LAGANÁ, C.; STRECK, A. F. , 2008. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37: 636 – 644.
- 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; E EUCLIDES, R.F. 2011. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Departamento de Zootecnia. UFV. Viçosa, MG. 252 p.
- RUCKER, R. B.; RIGGINS, R. S.; LAUGHLIN, R.; CHAN, M. M.;CHEN, M.;TOM, K. 1975. Effects of nutritional copper deficiency on the biomechanical properties of bone and arterial elastin metabolism in the chicks. **Journal of Nutrition** 105: 1062-1070.

- SAMANTA, B.; GHOSH, P. R.; BISWAS, A.; DAS, S.K.; 2011. The effects of copper supplementation on the performance and hematological parameters of broiler chickens **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 7: 1001-1006.
- SARNI, R. O. S.; FABÍOLA, I. S. S.; RENATA, R. C.; MÁRCIA, C. M.; DIRCEU, S. , 2010. Micronutrientes e sistema imunológico. **Revista Brasileira de Imunopatologia** 33: 08-13.
- SCHMIDT, H. H,WALTER, U. 1994. NO at work.**Cell** 78: 919-925.
- SCHMIDT, M.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; CUPERTINO, E. S. 2005. Copper nutritional levels for male and female broilers in the initial phases. **Revista Brasileira de Zootecnia** 34: 1599-1605.
- SCHMIDT, M.;GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F.; CUPERTINO, E. S. 2005. Níveis nutricionais de cobre para frangos de corte machos e fêmeas na fase inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34: 1599-1605.
- SCHOULTEN, N.A.; TEIXEIRA, A.S.; CONTE, A.J.; SILVA, H.O;BERTECHINI, A.G.; E FIALHO, E.T. 2003. Efeito dos níveis de cálcio da ração suplementação com fitase sobre a deposição de minerais na tíbia de frangos de corte de 22 a 42 dias. **Ciência e Agrotecnologia** 27: 201-210.
- SEIFERT, M.F.; WATKINS, B.A. 1997. Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism. **Nutrition Research** 17: 1209-1228.
- SEN, S.;INGALE, S.L.;KIM, Y.W., KIM, J.S., KIM, K.; LOHAKARE, J.D.; KIM E.K.; KIM H.S.; RYU M.H.; KWON I.K.; CHAE B.J. 2012. Effect of supplementation of Bacillus subtilis LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science** 93: 264-268.
- SHAHZAD, M. N.; JAVED, M. T.; SHABIR, S.; IRFAN, M. AND HUSSAIN, R. 2012. Effects of feeding urea and copper sulphate in different combinations on live body weight, carcass weight, percent weight to body weight of different organs and histopathological tissue changes in broilers. **Experimental and Toxicologic Pathology** 64: 141-147.
- SICHER, S.C.; VAZQUEZ, M.A.; LU, C.Y. 1994. Inhibition of macrophages Ia expression by nitric oxide. **Journal Immunology** 153: 1293-1300.
- SOLIOZ, M.; ODERMATT, A.; KRAPF, R. 1994. Copper pumping ATPases: Common concepts in bacteria and man.**Federation of European Biochemical Societies** 346: 44-47.
- SOLIS, de los SANTOS, F.; FARNELL, M.B.; TELLEZ, G.; BALOG, J.M.; ANTHONY, N.B.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HIGGINS, S.; B.M.; DONOGHUE, A.M. , 2005. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. **Poultry Science** 84: 1092-1100.
- STARCHER, B.; HILL, C. H.; MATRONE, G.; 1964. Importance of dietary copper in the formation of aortic elastin. **Journal of Nutrition** 82: 318-322.
- SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 4.ed. Wallingford, UK: CABI International, 2010. 579p.
- SUWALSKY, M.; UNGERER, B.; QUEVEDO, L.; AGUILAR, F.; SOTOMAYOR, C.P. 1998. Cu²⁺ ions interact with cell membranes. **Journal of Inorganic Biochemistry** 70: 233-238.
- UAUY, R.; OLIVARES, M.; GONZALEZ, M. 1998. Essentiality of copper in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition** 67: 952- 959.
- UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE N. F. 2001. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3rd ed. CAB Int., London, U
- UNI, Z. 2000. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chickens small intestine. **Poultry Science** 41: 410-415.
- UNI, Z.; GANOT, S.; SJLAN, D. 1998. Posthach development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science** 77: 75-82.
- VASQUEZ, E.F.A.; HERRERA, A.P.N.; SANTIAGO, G.S. 2001. Interação cobre molibdênio e enxofre em ruminantes. **Ciência Rural**, 31: 1101-1106.

- WALDROUP, P.W. 1996. Bioassays remain necessary to estimate phosphorus, calcium bioavailability, **Feedstuffs** 68: 13-20.
- WANG, C.; WANG, M. Q.; YE, S. S.; TAO, W. J.; DU, Y. J.; 2011 Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on growth and immunity in broilers. **Poultry Science** 90: 2223–2228.
- WANG, H. ZHANG, C.; MI, Y.; KIDD, M.T. 2014. Copper and lysine amino acid density responses in commercial broilers. **The Journal of Applied Poultry Research** 23: 470-477.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. (2004). Copper in drinking water. WHO Guidelines for Drinking Water Quality.
- XIE, O. W.; CHO, H.J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K.M. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science** 256: 225-228.
- XU, Z.R.; HU, C.H.; XIA, M.S.; ZHAN, X.A.; WANG, M.Q. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry Science** 82: 648–654.
- YE, Y.; ZHOU, Y. H.; XIA, M. S.; HU, C. H. 2003. A new type of inorganic antibacterial material: Cu-bearing montmorillonite and discussion on its mechanism. **Journal of Inorganic Materials**. 18: 569– 574.
- ZHAO, J.; SHIRLEY, R. B.; VAZQUEZ-ANON, M.; DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D.; FISHER, P.; HAMPTON, T.; CHRISTENSEN, K. D.; ALLARD, J.P; GIESEN, A.F. 2010. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield and foot pad health in commercial meat broilers. **International Journal of Poultry Science** 19: 365-372.
- ZHU, Z.; LABBE, S.; PENA, M. M.; THIELE, D. J. 1998. Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry** 273: 1277–1280.

APÊNDICES

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Tabela 1. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre

Fonte	Nível (mg/kg)	CR	GP	CA	CR	GP	CA
		11-22d g	11-22d, g	11-22, kg/kg	23-38 g	23-38, g	23-38 kg/kg
CuSO ₄	30	1195,9	825,17	1,45	2833,9	1626,3	1,74
	100	1196,3	836,31	1,43	2853,0	1634,0	1,74
Cu(HMTBa) ₂	30	1171,9b	818,06	1,43	2822,5	1631,5	1,73
	100	1210,6a	846,14	1,43	2874,2	1624,8	1,76
Fonte x Nível (Média)		1192,1	836,96	1,44	2845,9	1629,15*	1,74*
Fonte							
CuSO ₄		1196,1	830,7	1,40	2843,5	1630,2	1,74
Cu(HMTBa) ₂		1191,3	832,1	1,40	2848,4	1628,2	1,75
Nível (mg/kg)							
30		1183,9B	821,6B	1,44	2828,2	1628,9	1,74
100		1203,4A	841,2A	1,43	2863,6	1629,4	1,75
Tratamentos adicionais (TA)							
Controle negativo (CN)		1186,7	826,33	1,43	2828,7	1570,53	1,79
Controle positivo (CP)		1197,5	847,59	1,41	2808,5	1588,66	1,76
Médias TA		1192,1	836,96	1,42	2813,6	1579,6*	1,78*
Erro padrão da média		9,2	8,98	0,011	20,67	14,46	0,011
Coeficiente de Variação		1,9	2,62	1,91	1,79	2,2	1,58
Probabilidades							
Fonte (F)		0,59917	0,8797	0,4297	0,8162	0,8933	0,6925
Nível (N)		0,04286	0,0354	0,3305	0,0969	0,9750	0,0777
F x N		0,04678	0,3485	0,4172	0,4371	0,6204	0,1181
Tratamentos adicionais		0,41136	0,1015	0,1400	0,7285	0,3825	0,1010
Fatorial x TA		0,81601	0,4777	0,2582	0,0814	0,0004	0,0015

Tabela 2. Peso absoluto dos segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com diferentes fontes de cobre em níveis supranutricionais

Fonte	Nível (mg/kg)	PA, kg	PD ¹ , g	PJ, g	PI, g	PID, g
CuSO ₄	30	1,293	10,66	18,7	14,95	44,32
	100	1,289	10,29	17,42	14,04	46,59
Cu(HMTBa) ₂	30	1,252	11,22	19,6	15,75	41,75
	100	1,309	11,32	18,53	16,05	45,9
Fonte x Nível (Média)		1,285	10,87	18,56	15,2	44,64
Fonte						
CuSO ₄		1,291	10,48	18,06	14,5	45,46
Cu(HMTBa) ₂		1,280	11,27	19,07	15,9	43,83
Nível						
30		1,273	10,94	19,15	15,35	43,04
100		1,299	10,8	17,97	15,04	46,24
Tratamentos adicionais (TA)						
Controle negativo (CN)		1,268	11,61	18,31	15,15	45,09
Controle positivo (CP)		1,289	9,92	17,13	15,1	42,16
Media TA		1,279	10,77	17,72	15,13	43,62
EPM			0,59	0,67	0,72	1,65
Probabilidades						
Fonte (F)			0,1955	0,1466	0,0622	0,0626
Nível (N)			0,8177	0,0909	0,6745	0,3343
F x N			0,6963	0,8794	0,4157	0,5754
Tratamentos adicionais			0,0541	0,2244	0,9615	0,221
Fatorial x TA			0,8401	0,161	0,9142	0,4853

PA- Peso das aves; PD- Peso do duodeno; PJ- Peso do jejuno; PI- Peso do íleo; Peso do intestino delgado

Tabela 3. Comprimento absoluto dos segmentos intestinais de frangos de corte suplementados com diferentes fontes de cobre em níveis supranutricionais

Fonte	Nível (mg/kg)	PA, kg	CD, cm	CJ, cm	CI, cm	CID, cm
CuSO ₄	30	1,293	26,25	58,25	58,33	142,83
	100	1,289	26,83	56,91	58,00	141,75
Cu(HMTBa) ₂	30	1,252	28,16	59,75	56,33	144,25
	100	1,309	28,83	54,58	58,00	141,41
Fonte x Nível (Média)		1,285	27,52	57,37	57,67	142,56
Fonte						
CuSO ₄		1,291	26,54	57,58	58,17	142,29
Cu(HMTBa) ₂		1,280	28,5	57,17	57,17	142,83
Nível						
30		1,273	27,21	59,00	57,33	143,54
100		1,299	27,83	55,74	58,00	141,58
Tratamentos adicionais (TA)						
Controle negativo (CN)		1,268	27,83	59,91	58,83	146,58
Controle positivo (CP)		1,289	25,66	56,58	58,33	140,58
Media TA		1,279	26,75	58,24	58,58	143,58
EPM			1,04	2,55	2,73	5,01
Probabilidades						
Fonte (F)			0,0707	0,8714	0,7175	0,9149
Nível (N)			0,5543	0,2128	0,8093	0,6994
F x N			0,9684	0,4586	0,7175	0,8628
Tratamentos adicionais			0,153	0,3632	0,898	0,4049
Fatorial x TA			0,4011	0,6951	0,7017	0,816

PA- Peso das aves; CD- Comprimento do duodeno; CJ-Comprimento do jejuno; CI- Comprimento do íleo; CID- Comprimento do intestino delgado.

Tabela 4. Temperatura e umidade relativa máxima e mínima de acordo com as semanas de alojamento.

SEMANAS	T °C MIN	T °C MAX	UR MIN %	UR MAX%
1ª SEMANA	26,5	31,0	58,3	70,6
2ª SEMANA	24,0	28,8	66,6	79,6
3ª SEMANA	23,5	29,7	74,4	84,0
4ª SEMANA	22,0	29,3	62,8	83,8
5ª SEMANA	21,2	26,0	70,7	87,0

T °C MIN- Temperatura mínima; T °C MAX- Temperatura máxima, UR MIN %- Umidade relativa mínima %; UR MAX%- Umidade relativa máxima.