

**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 COBRE EM NÍVEIS  
SUPRANUTRICIONAIS EM RAÇÕES DE FRANGOS DE  
CORTE TIPO *GRILLER***

**Delcivan Lima dos Santos**

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2019**

**SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE EM NÍVEIS  
SUPRANUTRICIONAIS EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE  
TIPO *GRILLER***

**Delcivan Lima dos Santos**

Médico Veterinário

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

**Coorientador:** Prof. Dr. Jerônimo Ávito de Brito

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237s

Santos, Delcivan Lima dos.

Suplementação de cobre em níveis supranutricionais em rações de frangos de corte tipo Griller / Delcivan Lima dos Santos. Cruz das Almas, BA, 2019.

44f.; il.

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro.

Coorientador: Jerônimo Ávito de Brito.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

1.Frango de corte – Nutrição animal. 2.Frango de corte – Alimentação e rações. 3.Rações – Análise. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.5

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.

Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).

Os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico.

**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 COBRE EM NÍVEIS  
SUPRANUTRICIONAIS EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE  
TIPO *GRILLER***

Comissão Examinadora da Qualificação

Delcivan Lima dos Santos

Aprovado em: 27 de Fevereiro de 2019

Prof.<sup>o</sup> Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Prof.<sup>a</sup> Dra. Manuela Oliveira de Souza  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Cristina da Rocha  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á minha mãe, Vera Lucia, minhas irmãs, minhas sobrinhas, meus amigos e meus bichos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, por me acompanhar, e nunca me desamparar, onde quer que eu vá, em todos os momentos de minha vida, sejam eles bons ou ruins.

A minha mãe, Vera Lúcia, amor da minha vida, por estar sempre comigo, acreditando em mim, me apoiando, me dando amor, sendo compreensiva, sendo minha amiga. Só nós sabemos o quanto foi difícil essa distância. Só estou aqui hoje por sua causa. Muito obrigado por ser minha mãe.

Agradeço aos meus companheiros felinos, Jade e Nego, por serem tão amorosos, fiéis e companheiros.

A todos os meus outros familiares e amigos, que estiveram comigo em todos esses momentos, acreditando em mim e tornando meus dias mais felizes. Embora a distância por vezes possa atrapalhar, verdadeiras amizades não acabam, não mudam.

Ao professor Alexandre por toda paciência, ajuda, empenho e ensinamento. Muito obrigado por compartilhar seus conhecimentos durante esse processo de orientação.

Ao professor Jerônimo Brito pela coorientação, estando sempre disposto a ajudar e a ensinar.

Agradeço ás meninas do Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária, Brenda, Tatiane, Angela por todo o apoio que me deram.

Aos funcionários do setor de avicultura e aos participantes do Núcleo de Estudos em Avicultura do Recôncavo da Bahia por terem me ajudado nas atividades do galpão.

Ao grupo Bolsistas Capes pela ajuda e pelos momentos de alegria e descontração.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Muito obrigado!

## EPÍGRAFE

“Porque ninguém vai dormir nosso sonho.”  
Dalto

## SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE EM NÍVEIS SUPRANUTRICIONAIS EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE TIPO *GRILLER*

**RESUMO:** O cobre é um micromineral essencial para manter a saúde e as funções do organismo em homeostase, participando em boa parte dos processos fisiológicos e metabólicos dos animais. Na avicultura, este micronutriente é utilizado como aditivo melhorador de desempenho, e sua utilização em níveis supranutricionais é frequentemente associado como um dos principais responsáveis pela obtenção de bons resultados no desempenho, rendimento de cortes e na saúde intestinal de frangos de corte. Objetivou-se avaliar os efeitos do cobre na dieta, em níveis supranutricionais, sobre as características de desempenho, metabolismo mitocondrial e biometria de órgãos. Foram utilizados 270 pintos de 1 dia de idade, fêmeas, da linhagem Cobb 500, sendo estes alojados em 18 boxes. A dieta teve como base o milho e o farelo de soja, formuladas de acordo com as exigências nutricionais para cada fase de criação das aves. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos, dentre os quais, foram: T1: Cobre nutricional- 10 mg/kg de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), T2: Cobre supranutricional- 100 mg/kg de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e por fim o T3: 50 mg/kg de cobre ligado ao ácido 2-hidroxi-4metiltiobutanóico ( $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ ). O experimento foi realizado com a utilização de 6 repetições, e cada box foi composto por 15 aves. Foi avaliado o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar, nas fases de 1 a 10 dias, 11 a 21 dias, 22 a 31 dias e 1 a 31 dias. Além disso foram analisados os índices de eficiência produtiva, a viabilidade e a biometria do baço, fígado, bursa de fabricius, intestino, pâncreas e o metabolismo mitocondrial hepático. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na fase de 1 a 10 dias no consumo de ração e na conversão alimentar. Porém, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no ganho de peso nessa mesma fase utilizando 100 mg/kg de cobre na ração, de fonte inorgânica. O uso de 50 mg/kg de cobre da fonte  $\text{HMTBa}_2$  teve o mesmo ganho de peso do tratamento 2. Em relação ao consumo de ração, ganho de peso e na conversão alimentar nas outras fases de criação, não foi observado diferença significativa. Para o índice de eficiência produtiva, viabilidade, peso das aves e biometria dos órgãos, não houve diferença entre os tratamentos. Na razão de controle respiratório (RCR) e na relação ADP/O não foram observados diferenças significativas. Conclui-se que o uso de 100 mg/kg de cobre de origem inorgânica aumentou o ganho de peso na fase pré-inicial, entretanto, não teve efeito ao final do ciclo de criação. As fontes e os níveis de cobre não influenciaram no metabolismo mitocondrial aos 22 dias. A biometria de órgãos não foi influenciada pelas fontes e pelos níveis de cobre que foram utilizados. O cobre deve ser adicionado a ração pré-inicial de frangos de corte na dose de 100 mg/kg de ração de sulfato de cobre pentahidratado.

**Palavras chave:** Desempenho; frangos de corte, metabolismo; mitocôndria; suplementação



## **COPPER SUPPLEMENTATION AT SUPRANUTRITIONAL LEVELS IN RATIONS OF BROILER TYPE *GRILLER***

**ABSTRACT:** Copper is a micromineral essential for maintaining the health and functions of the body in homeostasis, participating in a good part of the physiological and metabolic processes of the animals. In poultry, this micronutrient is used as a performance enhancing additive, and its use at supranutritional levels is often associated as one of the main responsible for obtaining good results in the performance, cuts yield and intestinal health of broilers. The objective of this study was to evaluate the effects of dietary copper on supranutritional levels on performance characteristics, mitochondrial metabolism and organ biometry. A total of 270 1 day old, female chicks of the Cobb 500 strain were housed in 18 boxes. The diet was based on corn and soybean meal, formulated according to the nutritional requirements for each stage of poultry farming. A completely randomized design was used, with three treatments, among which were: T1: Nutritional copper – 10 mg/kg copper sulphate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), T2: Supranutritional copper - 100 mg/kg copper pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) and finally T3: 50 mg/kg copper bound to 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid ( $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ ). The experiment was performed using 6 replicates, and each box was composed of 15 birds. The feed intake, weight gain and feed conversion were evaluated in the phases of 1 to 10 days, 11 to 21 days, 22 to 31 days and 1 to 31 days. In addition, the production efficiency, viability and biometrics of the spleen, liver, bursa of fabricius, intestine, pancreas and hepatic mitochondrial metabolism were analyzed. There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) in the 1 to 10 days phase in feed intake and feed conversion. However, there was a significant difference ( $P < 0.05$ ) in the weight gain in the same phase using 100 mg/kg of copper in the diet, from an inorganic source. The use of 50 mg/kg of copper from  $\text{HMTBa}_2$  source had the same weight gain as treatment 2. Regarding feed intake, weight gain and feed conversion in the other breeding phases, no significant difference was observed. For the index of productive efficiency, viability, bird weight and organ biometry, there was no difference between the treatments. The respiratory control ratio (RCR) and the ADP/O ratio showed no significant differences. It was concluded that the use of 100 mg/kg of copper of inorganic origin increased the weight gain in the pre-initial phase, however, had no effect at the end of the breeding cycle. Sources and copper levels did not influence mitochondrial metabolism at 22 days. Organ biometry was not influenced by the sources and levels of copper that were used. Copper should be added to the pre-starter broiler feed at a dose of 100 mg/kg copper sulphate feed pentahydrate.

**Keywords:** Performance, broilers, metabolismo, mitochondria, supplementation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de centrifugação das amostras de fígado macerado para a obtenção da fração rica em mitocôndrias.....	27
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição centesimal e níveis nutricionais das rações experimentais.....	25
Tabela 2 Consumo de ração (cr); ganho de peso (gp); conversão alimentar (ca), viabilidade (vb %) e índice de eficiência produtiva (iep) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de cobre.....	29
Tabela 3 Peso absoluto do baço, fígado, bursa, intestino e pâncreas das aves alimentadas com níveis crescentes de cobre na dieta aos 31 dias.....	30
Tabela 4 Relação de controle respiratório (rcr) e razão adp/o do metabolismo mitocondrial de aves alimentadas com níveis crescentes de cobre na ração. .	31

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de literatura</b>	<b>14</b>
2.1	Importância Fisiológica do Cobre (Cu)	14
2.2	Ação do cobre sobre o trato gastrointestinal	16
2.3	Cobre como aditivo melhorador de desempenho	17
2.4	Ação do cobre sobre o metabolismo mitocondrial	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1	Delineamento e Tratamentos Experimentais	24
3.2	Diets e Manejo Experimental	24
3.3	Desempenho	26
3.4	Biometria	26
3.5	Metabolismo mitocondrial	27
3.6	Análise estatística	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
4.1	Características de desempenho e biometria	29
4.2	Metabolismo mitocondrial	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>39</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>45</b>
	Apêndice 1 – Tabelas com os valores da média e o desvio padrão de cada tratamento nos estágios do consumo de oxigênio e os valores da razão de controle respiratório (RCR) e a relação ADP/O de cada tratamento.	45

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte brasileira é um exemplo de atividade de grande importância econômica no setor do agronegócio que mais vem se destacando no cenário brasileiro (BARBOSA *et al.*, 2017).

O Brasil é o maior exportador mundial de frango tipo *Griller*. É criado em um período de 30 dias, sendo 15 dias a menos que o frango comercializado no mercado interno. O peso médio desejado fica entre 800 a 1,300 kg, e é exportado principalmente para Arábia Saudita, Emirados Árabes, África do Sul, Kuwait, Iraque (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2016).

A criação de frango de corte tipo *Griller* que é exportado aos países de religião islâmica possui diversas particularidades, como por exemplo, obedecer rigorosamente às regras de criação e abate dos países islâmicos, maior restrição ao uso de antibióticos, maior densidade de aves por metro quadrado de instalação e exclusividade por fêmeas, devido a maior capacidade de empenamento e menor agitação, obtendo, com isso, uma melhor qualidade da carcaça (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2016).

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento animal, pois está envolvido em um grande número de vias metabólicas (SUTTLE, 2010). É importante para todas as fases de criação de frangos de corte, sobretudo, na fase inicial quando as aves estão em pleno desenvolvimento. É componente de proteínas sanguíneas, como a eritrocupreína, presente nos eritrócitos, também tem função em vários sistemas enzimáticos e é essencial para a formação normal dos ossos (LEESSON; SUMMERS, 2001).

A utilização do cobre em níveis supranutricionais tem efeito positivo sobre o metabolismo mitocondrial, e com isso, os frangos terão melhor performance. A atividade Cu-Zn SOD diminui com dietas pobres em cobre (KLEVAY, 1990). O principal papel do complexo Cu-Zn SOD é catalisar a dismutação de superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Assim, Cu e Zn suplementados acima do recomendado podem ajudar a proteger as células do fígado e mitocôndrias contra o estresse oxidativo (ACETOZE *et al.*, 2017).

Na avicultura e na suinocultura, o cobre também vem sendo utilizado como melhorador de desempenho, já que melhora a saúde intestinal quando adicionado em níveis supranutricionais à ração. O cobre possui efeitos semelhantes aos dos antibióticos (GATTÁS e BARBOSA, 2004).

A biodisponibilidade absoluta do cobre oriundo de fontes inorgânicas é geralmente baixa porque eles possuem alta oxidação e são mais higroscópicos, e uma porção significativa desses nutrientes passa o trato gastrointestinal e acabam nos excrementos (YAN E WALDROUP, 2006).

O cobre de origem orgânica é obtido através de íons quimicamente ligado a uma molécula orgânica, formando assim, estruturas com estabilidade única e alta biodisponibilidade desse mineral (AAFCO, 2005). Tais estruturas orgânicas são estáveis no trato digestivo e são absorvidos porque são protegidos de modo a não formar complexos com outros componentes da ração (AMMERMAN, *et al.*, 1998).

Sendo assim, justifica-se a importância deste trabalho sobre a utilização de cobre (Cu) em níveis supranutricionais, de fonte orgânica e inorgânica, em rações de frangos de corte tipo *Griller*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância Fisiológica do Cobre (Cu)

O cobre é um micromineral essencial para manter a saúde e as funções do organismo em homeostase, possuindo participação em boa parte dos processos fisiológicos e metabólicos dos animais. Esse micromineral tem um papel importante como cofator da citocromo oxidase, lisil oxidase, superóxido dismutase e ceruloplasmina (DAVIS E MERTZ, 1987). Participa no funcionamento do sistema nervoso central, metabolismo ósseo e de diversos músculos, como por exemplo, o cardíaco. A função do cobre está intimamente relacionada a outros minerais, como o ferro, zinco, manganês, molibdênio e diversas proteínas (MCDOWELL, 1999; REEVES, 2004).

A citocromo oxidase é uma enzima que catalisa a oxidação do citocromo C e redução de  $O_2$  para  $H_2O$ , e usa a energia derivada desta reação para bombear prótons através da membrana celular (JOHANSSON *et al.*, 2011).

A lisil oxidase é uma enzima da família das oxidases que tem o cobre como cofator (NRC, 2001). Ela é importante na estabilização da matriz extracelular (VARZANEHA *et al.*, 2017). Ela catalisa a desaminação oxidativa de lisina e hidroxilisina em resíduos de colágenos e elastina, que é o primeiro passo da reticulação covalente da matriz extracelular (VALLET *et al.*, 2018).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais enzimas antioxidantes e é formada por três tipos de enzimas: cobre/zinco SOD (CuZn-SOD, SOD1), que está no citosol, espaço intermembrana e núcleo da mitocôndria; manganês SOD (Mn-SOD, SOD2), encontrada na matrix mitocondrial; e a ferro SOD (Fe-SOD, SOD3), presente no meio extracelular. A SOD1 é o membro mais abundante desse grupo de enzimas antioxidantes, representando cerca de 90% do total (KURUTAS *et al.*, 2016).

A função da SOD1 é catalisar a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que ao final do processo é dissociado em água e oxigênio pelas enzimas glutathione peroxidase e catalase, convertendo as espécies reativas de oxigênio em uma forma menos nociva às células (KURUTAS *et al.*, 2016). Por serem considerados cofatores da SOD1, as concentrações corporais de zinco e cobre podem interferir na atividade desta enzima (KOEKKOEK *et al.*, 2016).

A ceruloplasmina é uma glicoproteína plasmática cobre-dependente que se liga a 6 átomos de cobre. Esta proteína é um membro da família das oxidases, como a ascorbato oxidase. Embora exiba homologia estrutural com as oxidases de cobre, se liga a aproximadamente 95% do total do cobre circulante e está fortemente relacionado à homeostase de ferro e cobre. Entre as diferentes funções da ceruloplasmina, a mais importante é a sua atividade ferroxidásica que promove a oxidação do íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) associada à redução de oxigênio molecular diretamente à água. Esta atividade é conhecida por ser fundamental para incorporação de ferro na transferrina e, portanto, na homeostase do ferro porque converte o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), permitindo sua ligação à transferrina e consequentemente o transporte armazenado na forma de ferritina (GANINI *et al.*, 2012).

O cobre é indispensável para todos os organismos que fazem respiração aeróbia. Sua capacidade de alternar entre dois estados de oxidação ( $\text{Cu}^{+1}$  e  $\text{Cu}^{+2}$ ) favorece uma ampla gama de metaloenzimas que catalisam reações de transferência de elétrons. As necessidades metabólicas para o cobre são coordenadas por uma série complexa de transportadores e glicoproteínas transportadoras que regulam sua acumulação intracelular e sua distribuição em diversos tecidos (cérebro, músculos, fígado) e sua ação em microrganismos patogênicos por gerar espécies reativas de oxigênio (HODGKINSON e PETRIS, 2012).

Vários mecanismos têm sido atribuídos ao cobre por ele ter propriedades antimicrobianas. Estes incluem sua capacidade de receber e doar um elétron nos ciclos entre a oxidação em dois estados citados ( $\text{Cu}^{+1}$  e  $\text{Cu}^{+2}$ ). Sob condições aeróbicas esta propriedade redox permite que o cobre catalise a produção do radical hidroxila através das reações de Fenton (LIOCHEV e FRIDOVICH, 2002).

Elétrons de citocromo C são inicialmente doados a um sítio de cobre composto por dois íons de cobre ( $\text{CuA}$ ) dos quais o elétron é transferido para um grupo heme (heme A), e depois para o sítio catalítico composto de um grupo heme (heme a3), e um íon de cobre, ( $\text{CuB}$ ). Desse modo, a deficiência de cobre terá como resultado a redução na atividade da citocromo oxidase, interferindo na capacidade respiratória das mitocôndrias (JOHANSSON *et al.*, 2011).

Segundo McDonald *et al.* (2002), o Cu está presente em todas as células do corpo, sendo particularmente concentrado no fígado que atua como o principal órgão de armazenamento. A maior parte não é absorvida, mas passa pelo trato digestivo, alcançando seu efeito, alterando a população microbiana da mesma maneira que os promotores de crescimento que são antibióticos. O que é absorvido vai para a corrente sanguínea, chegando até o fígado, onde será armazenado para



fazer trocas com o sangue e ser excretado pela bile, e também pode ser incorporado a ceruloplasmina.

A inclusão de altas quantidades de cobre na dieta tem sido utilizada para melhorar o desempenho produtivo de aves, possivelmente devido a sua ação antimicrobianas (PETTIGREW, 2006; LEESON, 2009; ZHAO *et al.*, 2014). A deficiência de cobre pode causar redução da atividade enzimática (superóxido dismutase, catalase, lisil oxidase), anemia, redução da pigmentação de pelos, plumas, fragilidade dos ossos e redução da espessura da cartilagem (CARLTON e HENDERSON, 1962; HILL E MATRONE, 1961).

## 2.2 Ação do cobre sobre o trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal desempenha um papel importante desde a eclosão até o abate dos frangos. Bactérias intestinais são importantes para preparar e manter a imunidade ativa (KELLY e KING, 2001; KOHL, 2012), modulando a função intestinal e protegendo contra a colonização de patógenos (KELLY e KING, 2001). Após a eclosão, a microbiota se desenvolve rapidamente e uma flora estável se desenvolve em aproximadamente 2 semanas (REHMAN *et al.*, 2007).

Foi observada grande variação na composição da microbiota entre indivíduos dentro da mesma linhagem de frangos de corte, mesmo sendo alimentados com a mesma ração e estando alojados sob as mesmas condições (APAJALAHTI *et al.*, 2001; TOROK *et al.*, 2011). A composição da microbiota pode ser afetada por fatores ambientais, genéticos e pela disponibilidade de substrato dentro do intestino (VAHJEN *et al.*, 1998; APAJALAHTI *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que a composição microbiana no íleo de frangos afeta a função intestinal e a absorção de nutrientes (GONG *et al.*, 2002; HÜBENER *et al.*, 2002), e é composta por *Lactobacillus spp.* (70%), *Clostridiaceae spp* (11%), *Streptococcus spp.* (6,5%) e *Enterococcus spp.* (6,5%) (LU *et al.*, 2003).

Um dos possíveis mecanismos pelos quais o Cu pode beneficiar as aves é agindo de forma positiva na microbiota gastrointestinal, reduzindo assim a susceptibilidade das aves às doenças, tendo efeito direto sobre a redução do recrutamento e infiltração de linfócitos intestinais, uma vez que, essas alterações causam grandes reduções no desempenho dos frangos (ARIAS e KOUTSOS, 2006).

O cobre é tóxico para algumas espécies de bactérias, como *Klebsiella aerogenes*, enquanto que outros desenvolveram mecanismos complexos de resistência

(SILVER e PHUNG, 1996). Além disso, a ação bactericida do Cu é dependente da concentração de ions de cobre livre (ZEVENHUIZEN *et al.*, 1979; MENKISSOGLU e LINDOW, 1991). O sulfato de cobre pentahidratado é a fonte de Cu mais utilizado para os frangos (GUO *et al.*, 2001; PANG e APPLGATE, 2006).

Pang *et al* (2009), utilizaram 125 e 250mg/kg de sulfato de cobre em seu trabalho e chegou a conclusão que utilizando 125mg/kg é suficiente para estimular o aumento da flora de Lactobacilos e inibir o aumento de *E. coli* devido a mudança do pH intestinal e interferindo em sua multiplicação. Essas alterações foram observadas após 24 horas de incubação.

### 2.3 Cobre como aditivo melhorador de desempenho

Durante muitos anos os antibióticos subterapêuticos foram incorporados em dietas de frangos e suínos porque seus efeitos influenciam no crescimento, no consumo de ração e na eficiência alimentar. Agem favorecendo um crescimento ideal, regulando a microflora no intestino delgado porque permitem que apenas bactérias comensais se desenvolvam e, desse modo, mantêm um ambiente intestinal de máxima absorção de nutrientes, reduzindo de forma considerável as bactérias patogênicas que podem produzir toxinas e causar danos ao intestino (ARIAS e KOUTSOS, 2006).

Diante da importância fisiológica do cobre para os frangos, esse mineral é frequentemente adicionado à dieta das aves em concentrações e em níveis que frequentemente excedem suas exigências (ŚWIAŹKIEWICZ *et al.*, 2014). Sabe-se que o cobre quando é utilizado em níveis supranutricionais age como um aditivo melhorador de desempenho, tornando-se uma boa opção por ter propriedades antibacterianas ou bacteriostáticas (MORAIS *et al.*, 2001).

Segundo Suttle (2010), no mercado encontram-se diferentes fontes de cobre de origem inorgânica e biodisponibilidade distintas entre elas. Dentre essas fontes estão o sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), o óxido de cobre ( $\text{CuO}$ ), o carbonato de cobre ( $\text{CuCO}_3$ ), o sulfato de cobre monohidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e o cloreto de cobre tribásico (TBCC) (MILES *et al.*, 1998).

Na busca por melhores resultados de desempenho e uma crescente preocupação com o meio ambiente, foram desenvolvidos diferentes formas de minerais quelatados (orgânicos) e complexados, sendo comercializados como "composto mineral organicamente ligado" ou quelato, dentre eles, estão: complexo metal ami-

noácido específico, complexo metal aminoácido, quelato metal aminoácido, metal proteinato, e metal polissacarídeo (SCOTTÁ *et al.*, 2014).

A fonte de cobre inorgânico usada na dieta de frangos é normalmente o sulfato de cobre pentahidratado ou cloreto de cobre tribásico. Por ser menos higroscópico e ser menos solúvel em água, o TBCC é considerada uma fonte menos reativa e destrutiva de cobre quando comparado ao sulfato de cobre. Além disso, o TBCC é uma forma mais concentrada de cobre em relação ao sulfato de cobre (58 vs. 25%), mesmo assim é considerado mais biodisponível em comparação com o sulfato de cobre (SPEARS *et al.*, 1997).

De acordo com Rostagno *et al.* (2017), a suplementação de cobre nas rações de frangos de corte podem ter variação entre 6,5 e 12,5 mg/kg dependendo da fase de criação, sendo em maior quantidade na fase pré-inicial. Em contra partida, de acordo com o NRC (1994) os níveis nutricionais do cobre recomendado para frangos de corte são de 8mg/kg, independente da fase de criação.

Pesti e Bakalli (1996) concluíram que utilizando 125 ou 250mg/kg de cobre na dieta, o crescimento e a taxa de conversão alimentar dos frangos foram melhores. No entanto, a suplementação com 375mg/kg de cobre não teve benefício.

Em sua pesquisa, Varzaneh *et al.* (2016) utilizaram o cobre em níveis supranutricionais para investigar os efeitos de diferentes níveis de cobre na incidência de ascites e alterações de metaloproteinasas nos pulmões de frangos de corte. A conclusão obtida foi que o cobre em níveis maiores do que os níveis convencionais de suplementação diminuíram a incidência de ascite através da concentração reduzida de metaloproteinasas.

Wang *et al.*, (2011) utilizaram 50 e 100 mg/kg de nanopartículas de cobre em seu estudo. Concluíram que o crescimento e o desempenho de frangos de corte foram melhores utilizando ambos os níveis.

Em seu estudo, Sultana *et al.*, (2015) avaliaram os efeitos de dois inibidores de fungos e do sulfato de cobre sobre o desempenho de frangos de corte. As aves foram alimentadas com dieta controle e dieta suplementada com inibidor de fungos, violeta de genciana e sulfato de cobre. Concluíram que o uso de sulfato de cobre melhorou o crescimento e o consumo de ração, e também chegaram à conclusão de que a suplementação de sulfato de cobre às dietas reduziu o custo de alimentação e aumentou o rendimento e a rentabilidade da carcaça.

Em seu experimento, Arias e Koutsos (2006) demonstraram que o cobre tem efeitos de relevância significativa sobre o ganho de peso na fase inicial. Neste trabalho foi utilizado o cloreto de cobre tribásico e o sulfato de cobre, e compararam

com o uso dos antibióticos subterapêuticos, constatando-se que o uso do cobre adicionado à dieta pode permitir melhores taxas de crescimento e desempenho nos frangos de corte.

#### **2.4 Ação do cobre sobre o metabolismo mitocondrial**

As mitocôndrias desempenham papel fundamental na desintoxicação de substâncias exógenas e endógenas, realiza várias atividades metabólicas necessárias para a homeostase, nutrição e defesa imunológica (MAHALAWAY *et al.*, 2015). São os principais locais de fosforilação oxidativa (KANG e PERVAIZ, 2012).

São organelas de membrana dupla, responsáveis pela produção de energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP). Além de ser a fonte de energia da célula, essas organelas modulam importantes funções incluindo a proliferação, sobrevivência celular, apoptose, sinalização de cálcio e estado redox (DUCHEN, 2004). Desempenham papel fundamental no metabolismo intermediário de aminoácidos, lipídios, colesterol, esteróides e nucleotídeos. Participa da via na  $\beta$  oxidação do ácido graxo, o ciclo da uréia e a via final comum para a produção de ATP na cadeia respiratória (CHINNERY e SCHON, 2003).

A organização das mitocôndrias formam redes complexas que estão sobre estrito controle por dois processos distintos. O primeiro é a fusão mitocondrial, que forma mitocôndrias longas e filamentosas, e a segunda é a fissão mitocondrial, que gera mitocôndrias esféricas e pequenas. Ambos os processos dependem das necessidades metabólicas da célula (MIETTINEN, 2017). A função adequada mitocondrial está associada a um equilíbrio entre esses dois processos. Além disso, outra fonte de controle de qualidade mitocondrial é a degradação seletiva das organelas disfuncionais através de autofagia, que é definida como mitofagia (LEMASTERS, 2014).

As mitocôndrias são responsáveis por cerca de 90% da produção de energia da célula via fosforilação oxidativa, com o restante da energia produzida sendo derivado da glicólise (PIEKARSKI *et al.*, 2014). Segundo Cadenas *et al* (2018), a oxidação de substratos gera cofatores redutores (NADH e FADH<sub>2</sub>) que doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons.

A cadeia respiratória mitocondrial possui cinco complexos enzimáticos localizados na membrana mitocondrial interna. Os cofatores reduzidos (NADH e FADH<sub>2</sub>) gerados a partir do metabolismo intermediário de carboidratos, proteínas e gordu-

ras doam elétrons para o complexo I (NADH oxidoreductase-ubiquinona) e complexo II (succinato-oxidoreductase ubiquinona). São transportados pelos complexos III (ubiquinol-citocromo c oxidase reductase) e IV (citocromo c oxidase) e por dois transportadores de elétrons móveis. A energia liberada é usada pelos complexos I, III e IV para bombear prótons ( $H^+$ ) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Este gradiente de prótons é usada pelo complexo V (ATP sintase) para sintetizar adenosina trifosfato (ATP) a partir da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico. Esse processo é chamado de fosforilação oxidativa, tendo o ATP como fonte de energia usada para todos os processos metabólicos ativos dentro da célula (CHINNERY e SCHON, 2003).

As reações normais que ocorrem na cadeia respiratória mitocondrial promovem a geração de espécies reativas de oxigênio. Esses compostos apresentam propriedades químicas reativas, incluindo radicais livres que contêm elétrons como superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $HO^\cdot$ ) e moléculas não-radicais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (UNGVARI *et al.*, 2008). São formadas principalmente pela interação de moléculas de oxigênio com elétrons que escapam da cadeia respiratória mitocondrial (POYTON *et al.*, 2009).

Os radicais livres podem diminuir a fluidez da membrana mitocondrial, proporcionando a desnaturação das proteínas e das enzimas na membrana, podendo causar a lesão no DNA mitocondrial e induzir a diminuição da função mitocondrial (CADENAS e DAVIES, 2000; IQBAL *et al.*, 2004).

A inibição da ATP sintase aumenta o vazamento de elétrons, bloqueando sua transferência, aumentando assim a produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (DIAS e BAILLY, 2005). As espécies reativas de oxigênio podem ser eliminadas por proteínas antioxidantes, incluindo catalase, superóxido dismutase e tioredoxina, quando isso não acontece, ocorrerá o estresse oxidativo (XU *et al.*, 2006; INOUE *et al.*, 2003).

O acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio causa disfunção dos hepatócitos, apoptose e infiltração de monócitos no fígado devido a progressão do dano hepático (POELSTRA e SCHUPPAN, 2011). Assim, a eliminação de espécies reativas de oxigênio nos hepatócitos é um mecanismo eficaz para proteger o fígado. Espécies reativas de oxigênio são geradas principalmente a partir do retículo endoplasmático e da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias dos hepatócitos. A disfunção mitocondrial é frequentemente associada ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (LIU *et al.*, 2018).

Estudos referentes ao metabolismo mitocondrial são conduzidos utilizando-se a razão de controle respiratório (RCR) e a relação ADP/O porque são os principais índices da função respiratória mitocondrial. O RCR é a medida da certeza do acoplamento entre a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, indicando a capacidade da mitocôndria em acelerar a respiração sob condições de demanda de energia. A razão ADP/O indica a situação da integridade da membrana mitocondrial interna. Se a cinética de vazamento de prótons estiver alterada, será necessário uma maior quantidade de oxigênio para fosforilar a mesma quantidade de ADP. Sendo assim, a razão ADP/O tende a diminuir, indicando maior necessidade de O<sub>2</sub> (ESTABROOK, 1967; MUJKOSOVA *et al.*, 2010).

O vazamento de prótons mitocondriais é um processo que causa a diminuição da eficiência da síntese de ATP (RAMSEY *et al.*, 2004).

Segundo Su *et al* (2011) o fígado é o órgão central no metabolismo do cobre; removendo cobre iônico do sangue, depositando uma parte na bile, sintetizando a ceruloplasmina e armazenando o restante. Fontes diferentes e níveis de cobre na dieta atuam de formas diferentes sobre as concentrações de cobre no fígado. Os efeitos na transição de permeabilidade mitocondrial são dependentes do tempo e da dose, porém, no período inicial, esses efeitos são inexistentes porque o frango mais novo cresce de forma vigorosa e mais cobre é necessário para o seu desenvolvimento, e o cobre presente no fígado não é capaz de causar danos às mitocôndrias.

Cao *et al* (2016) utilizaram diversos níveis de sulfato de cobre pentahidratado (11, 110, 220 e 330 mg/kg) durante 60 dias (12, 24, 36, 48 e 60 dias) para determinar sua influência na respiração mitocondrial hepatocelular e nos complexos da cadeia respiratória (I, II, III, IV e V). Concluíram que a suplementação com 110, 220 e 330 mg/kg aumentou a função mitocondrial e as atividades dos complexos mitocondriais até os 36 dias. Após esse período, o tempo de exposição aos níveis mais altos de cobre na dieta (220 e 330 mg/kg) afetou a função mitocondrial e a atividade dos complexos de maneira mais acentuada.

As alterações mitocondriais causadas por diferentes concentrações de cobre na dieta de frangos de corte acontecem de acordo com a relação dose X tempo, aumentando significativamente o acúmulo de cobre no fígado e a produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial (CAO *et al*, 2016).

Yang *et al* (2017) analisaram a razão de controle respiratório (RCR) e relação ADP/O para determinar a disfunção mitocondrial hepática e a taxa de fosforilação oxidativa induzido pelo alto teor de cobre na dieta de frangos de corte em um

experimento de 60 dias. Foi utilizado o cloreto de cobre tribásico como a fonte de cobre (11, 110, 220 e 330 mg/kg). Os resultados mostraram que houve um aumento na RCR de todos os grupos tratados até o 36º dia. Após isso, houve uma queda acentuada. A taxa de fosforilação oxidativa aumentou e depois diminuiu nos grupos de altas doses de cobre. Este estudo revelou que dietas contendo altas doses de cobre podem diminuir a função mitocondrial do fígado em frangos de corte e que os danos causados são dependentes da dose e do tempo de exposição.

A alta ingestão de cobre pode induzir toxicidade aguda ou crônica, podendo levar a danos oxidativos e morte celular (BOST *et al.*, 2016). As mitocôndrias são um importante local de consumo de oxigênio e também estão intimamente ligados aos radicais produzidos pelo estresse oxidativo, causado pela toxicidade dos metais (XIANG e SHAO, 2003).

Jamal *et al* (2014) concluíram que a adição de cobre a mitocôndrias isoladas do fígado de ratos causou o comprometimento da cadeia transportadora de elétrons nos complexos I, II e IV, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento da produção de ERO mitocondrial leva à falha de fosforilação oxidativa, declínio do ATP celular, queda da relação ATP/ADP, redução da capacidade mitocondrial da atividade da succinato desidrogenase, rápido aumento na peroxidação lipídica da membrana mitocondrial, aumento de volume mitocondrial, perda da integridade da membrana externa da mitocôndria e, por fim, a liberação do citocromo C mitocondrial, que pode então promover a sinalização de morte nos hepatócitos do fígado.

O cobre-zinco superóxido dismutase (Cu-Zn SOD) foi encontrado tanto no citosol como no espaço extracelular, e sua atividade diminuiu com dietas pobres em cobre (KLEVAY, 1990). O principal papel do complexo Cu-Zn SOD é catalisar a dismutação de superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Assim, Cu e Zn suplementados acima do recomendado podem ajudar a proteger as células do fígado e mitocôndrias contra o estresse oxidativo (ACETOZE *et al.*, 2017).

O complexo superóxido dismutase (Cu-Zn SOD) possui propriedades antioxidantes em sua função catalítica, diminuindo os efeitos prejudiciais de espécies reativas de oxigênio (ROS) citosólicos que podem causar danos a membrana mitocondrial, levando ao aumento do vazamento de prótons (BRAND e DIVAKARUNI, 2011).

Diante do papel importante das mitocôndrias, aferir o consumo de oxigênio celular é essencial para avaliar suas funções, tanto na fisiologia como na fisiopatologia. Para isso, técnicas clássicas em que se utiliza um eletrodo polarográfico que

mede a concentração de oxigênio extracelular em um recipiente fechado, requerem o isolamento e a suspensão da célula. Isso se dá porque as funções celulares dependem do meio extracelular, incluindo a matriz extracelular. O isolamento das células cultivadas antes da suspensão pode afetar significativamente o consumo de oxigênio celular (TAKAHASHI e YAMAOKA, 2017).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento e Tratamentos Experimentais

O experimento foi desenvolvido no período de maio a junho de 2018 e foi registrado na CEUA/UFRB (Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRB) com o número 23007.000245/2017-29.

Foram utilizados 270 pintinhos de um dia de idade, fêmeas, linhagem COBB 500, provenientes de incubatório comercial, previamente vacinados, distribuídos em 18 parcelas contendo 15 aves em cada uma.

Foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos, 6 repetições e 15 aves por unidade experimental. Foram avaliados duas fontes distintas de cobre, dentre elas o sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e o cobre complexado ao ácido 2-Hidroxi-4metiltiobutanóico ( $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$ ). Os tratamentos consistiram em: T1-10 mg/kg, T2-100 mg/kg ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (25%) inorgânico e o T3-50mg/kg ( $\text{Cu}(\text{HMTBa})_2$  Mintrex® Cu (15%).

#### 3.2 Dietas e Manejo Experimental

A ração oferecida às aves foi a base de farelo de milho e soja. O cobre foi utilizado em todos os tratamentos e em todas as fases de criação deste experimento. A fitase também foi utilizada (redução em 0,15 pontos percentuais para cálcio e fósforo disponível) seguindo um programa alimentar com rações pré-inicial (1-10 dias), inicial (11-21 dias) e final (22-31 dias), de acordo com as recomendações nutricionais da linhagem Cobb-Vantress 2015.

Com o objetivo de potencializar o desafio microbiológico, não foi utilizados antimicrobianos ou anticoccidianos, aproximando o estudo á situações de submanejo, e com isso, eventuais respostas ao uso do cobre poderiam ser mais representativas.

As aves ficaram alojadas em galpão experimental, em boxes com dimensões de 1,55 x 1,66 m. Neste experimento foram utilizados 18 boxes e em cada um foi usado maravalha, um bebedouro pendular e um comedouro tubular. O aquecimento foi realizado por meio da utilização de campânulas com lâmpadas infravermelhas de 150 watts, e utilizou-se cortinas laterais para proteção e renovação do ar.

Durante todo o experimento a temperatura do galpão e a umidade relativa do ar foram monitoradas às 07:00 e às 16:00, utilizando um termômetro. A média da temperatura e da umidade relativa do ar foram de 24,3° e de 82%, respectivamente. Foi utilizado três fotoperíodos durante todo o período de criação, dentre os quais, foram: 23 horas de 1 a 10 dias, 14 horas de 11 a 18 dias e 18 horas de 19 a 30 dias, para isso foram utilizadas lâmpadas fluorescentes e um timer. A tabela abaixo mostra a composição das rações experimentais.

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

<b>INGREDIENTES</b>	<b>1-10 dias</b>	<b>11-22 dias</b>	<b>23-30 dias</b>
MILHO	57,719	62,373	63,833
FARELO DE SOJA	36,478	31,372	29,106
ÓLEO DE SOJA	2,379	3,082	4,299
FOSFATO. BICÁLCICO	1,060	0,935	0,737
CALCÁRIO	0,806	0,787	0,740
METIONINA MHA 84 <sup>1</sup>	0,361	0,318	0,272
L-LISINA HCL 78	0,262	0,245	0,163
L- TREONINA 98	0,046	0,030	0,020
PX. VITAMINAS <sup>2</sup>	0,100	0,100	0,100
PX. MICROMINERAL <sup>3</sup>	0,100	0,100	0,100
SAL COMUM	0,521	0,498	0,473
BETAÍNA	0,038	0,030	0,026
FITASE- PHOSMOR (10000 FTU) <sup>4</sup>	0,010	0,010	0,010
INERTE <sup>5</sup>	0,120	0,120	0,120
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL CALCULADA</b>			
Energia metabolizável(kcal/kg)	3000	3100	3200
Proteína bruta (%)	21,50	19,50	18,50
Lsina dig (%)	1,180	1,050	0,950
Met + cist.dig (%)	0,880	0,800	0,740
Treonina dig (%)	0,770	0,690	0,690
Triptofano dig (%)	0,243	0,216	0,204
Cálcio (%)	0,75	0,69	0,61
Fósforo disp. (%)	0,30	0,27	0,23
Sódio (%)	0,220	0,210	0,200
<b>Cobre (mg/kg)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

<sup>1</sup>Metionima MHA 84%: Metionina hidroxi análoga

<sup>2</sup>Premix vitamínico (níveis de garantia/kg do produto): Vitamina A (mín): 9.000.000 UI; Vitamina D3 (mín): 2.500.000 UI; Vitamina E (mín): 20.000 UI; Vitamina K3 (mín): 2.500 mg; Vitamina B1 (mín): 2.000 mg; Vitamina B2 (mín): 6.000 mg; Ácido pantotênico (mín): 12 g; Vitamina B6 (mín)3.000,38 mg; Vitamina B12 (mín): 15.000 mg; Ácido nicotínico (mín): 35 g; Ácido fólico (mín): 1.500 mg; Biotina (mín): 100 mg; Selênio (mín): 250 mg.

<sup>3</sup>Premix mineral (níveis de garantia/kg do produto): Ferro- Fe (mín): 100,00 g/kg; Zinco- Zn (mín): 120,00 g/kg; Iodo- I (mín): 2.500,00 mg/kg.

<sup>4</sup>Fitase: 10000 U/g

<sup>5</sup>Areia lavada

As rações foram isonutritivas, com exceção do cobre utilizado nos tratamentos e não foi feito a utilização de antibióticos. Para a obtenção dos tratamentos foi

realizado a substituição do material inerte (areia lavada) pelas fontes de cobre  $\text{Cu-SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Cu(HMTBa)}_2$ .

Para o uso da fonte  $\text{Cu(HMTBa)}_2$  foi realizada a correção para a inclusão de metionina MHA em função da molécula de  $\text{Cu(HMTBa)}_2$  ser um átomo de cobre ligado a duas moléculas de metionina hidroxí-análoga, constituída por 78% de metionina, e após a correção, as dietas apresentaram a mesma concentração deste aminoácido.

### 3.3 Desempenho

Para as análises de desempenho, as características de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar foi avaliada nas fases de 1 a 10 dias, 11 a 21 dias, 22 a 31 dias e de 1 a 31 dias, que foi o período total de criação. A ração oferecida às aves foi pesada no início e no final de cada fase do experimento, incluindo as sobras, o que possibilitou a avaliação do consumo de ração e o cálculo da conversão alimentar em todas as fases de criação.

A viabilidade foi calculada diante da diferença entre as aves alojadas e as retiradas para o abate, em percentagem, fazendo a distinção entre as refugadas e as mortas.

O índice de eficiência produtiva também foi analisado ao final do experimento para mensurar o desempenho zootécnico do lote dos frangos do experimento. Para isso, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$IEP = \frac{\text{Ganho de peso diário (kg)} \times \text{viabilidade (\%)} \times 100}{\text{Conversão alimentar}}$$

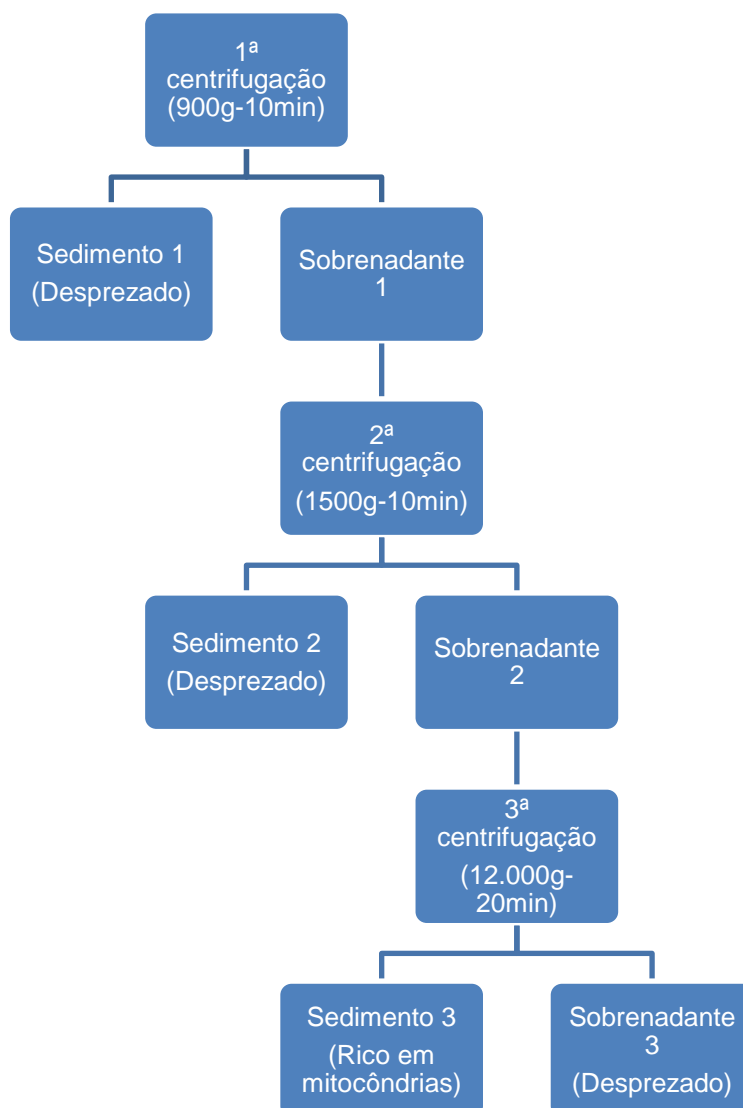
### 3.4 Biometria

A biometria foi realizada utilizando-se 18 animais (6 aves por tratamento). Aos 30 dias de idade, o peso médio dos animais foi mensurado, e as aves foram eutanasiadas. O baço, fígado, bursa de fabricius, pâncreas e intestino (seguimento completo) foram pesados. As características analisadas foram expressas em gramas de peso absoluto dos órgãos.

### 3.5 Metabolismo mitocondrial

Aos 21, 22 e 23 dias do experimento, 4 amostras de fígado foram coletadas de cada tratamento durante os respectivos dias, totalizando 36 amostras (2 amostras por box) e foram utilizadas para analisar o metabolismo mitocondrial no fígado nos estágios II, III e IV da fosforilação oxidativa. Cada amostra foi devidamente identificada, separada e armazenada em solução tampão fosfato, sendo constituído de fosfato dissódico, fosfato monopotássico, tris, EDTA, cloreto de potássio e sacarose ( $25 \times 10^{-2}M$ , pH 7,4 a  $4^{\circ}C$ ).

As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a  $4^{\circ}C$  para separação das organelas (Figura 1).



**Figura 1** Esquema de centrifugação das amostras de fígado macerado para a obtenção da fração rica em mitocôndrias. (Adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2007).

A análise do consumo de oxigênio ocorreu com a utilização de um eletrodo tipo Clark, a 37°. As mitocôndrias isoladas foram ressuspensas no mesmo volume do homogeneizado inicial, utilizando 7,4ml de tampão fosfato da solução tamponada de sacarose ( $25 \times 10^{-2}M$ , pH 7,4 a 4°C) em 1,0 mL de tampão fosfato com 0,8 ml de rotenona (5 $\mu$ M), 0,8 ml de succinato de sódio (5mM). O consumo foi analisado nos estágios II, III e IV. A rotenona foi usada no estágio I. A utilização de 100  $\mu$ M de ADP e 5 mM de succinato de sódio aconteceu no estágio III.

Os estágios III e IV foram utilizados para calcular a razão de controle respiratório (RCR) e relação ADP/O. A razão de controle respiratório foi calculado pela razão entre o estado 3 e o estado 4 da respiração, e a relação ADP/O foi expresso como razão de ADP adicionado e a quantidade de átomos de oxigênio consumidos durante a respiração do estado 3 para fosforilar a mesma quantidade de ADP que foi adicionado.

A dosagem das proteínas totais de cada amostra foi feita pela técnica de Lowry modificada por Komsa-Penkova *et al* (1996), após isso, o consumo de oxigênio mitocondrial foi expresso por nanolitros de oxigênio consumido, por miligrama de proteínas totais, por minuto ( $O_2$  cons./mg de prot./min).

### 3.6 Análise estatística

Os resultados do experimento no que se refere ao desempenho, biometria e metabolismo mitocondrial foram submetidos à análise de variância pelo Modelo Linear Generalizado. Foi utilizado o programa estatístico R e os resultados foram considerados significativos quando o nível de significância fosse  $P < 0,05$ . Para realizar as comparações entre as médias foi utilizado o teste de Tukey.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características de desempenho e biometria

A tabela 2 mostra os resultados da análise do desempenho de acordo com as fases e o tratamento.

**Tabela 2 Consumo de ração (CR); ganho de peso (GP); conversão alimentar (CA), viabilidade (VB %) e índice de eficiência produtiva (IEP) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de cobre.**

	Níveis de cobre (mg/kg de ração)			Valor de P	CV(%)
	T1(10mg/kg)	T2(100mg/kg)	T3(50mg/kg)		
1 a 10 dias					
CR	0,294	0,304	0,300	0,3389 <sup>ns</sup>	3,92
GP	0,245 <sup>b</sup>	0,259 <sup>a</sup>	0,252 <sup>ab</sup>	0,0463 <sup>*</sup>	3,36
CA	1,198	1,175	1,187	0,4782 <sup>ns</sup>	2,66
11 a 21 dias					
CR	0,969	0,961	0,990	0,1281 <sup>ns</sup>	2,47
GP	0,645	0,658	0,673	0,1695 <sup>ns</sup>	3,69
CA	1,502	1,460	1,470	0,2924 <sup>ns</sup>	3,13
22 a 31 dias					
CR	1,292	1,267	1,291	0,8607 <sup>ns</sup>	6,99
GP	0,727	0,729	0,742	0,5657 <sup>ns</sup>	3,57
CA	1,773	1,770	1,750	0,9147 <sup>ns</sup>	5,90
1 a 31 dias					
CR	2,556	2,532	2,581	0,7399 <sup>ns</sup>	4,19
GP	1,619	1,646	1,669	0,1230 <sup>ns</sup>	2,40
CA	1,578	1,537	1,546	0,3387 <sup>ns</sup>	3,12
VB(%)	97,66	98,83	97,66	0,7911 <sup>ns</sup>	3,45
IEP	334,700	353,616	352,183	0,1767 <sup>ns</sup>	5,33

a,b – Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

(\*) Há diferença significativa P<0,05.

ns- Não significativo

IEP- índice de eficiência produtiva

Neste experimento foi observado que houve diferença significativa (P<0,05) no ganho de peso, na fase pré-inicial (1 a 10 dias) entre os tratamentos.

Os frangos do tratamento 2 (100 mg/kg CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) obtiveram o melhor desempenho porque proporcionaram o maior ganho de peso na fase de 1 a 10 dias. Diante dos resultados estatísticos, os frangos do tratamento 3 tiveram o mesmo ganho de peso do tratamento 2. O ganho de peso dos frangos do tratamento 3 foi estatisticamente igual ao ganho de peso do tratamento 1 (Controle). Entretanto, com relação ao consumo de ração e a conversão alimentar no decorrer da fase

pré-inicial, não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) em resposta aos níveis de cobre utilizados.

Na fase inicial (11 a 21 dias) e na fase final (22 a 31 dias) não foram observadas diferenças significativas no consumo de ração (CR), no ganho de peso (GP) e na conversão alimentar (CA) em função dos níveis e da fonte de cobre utilizada.

Analisando o ciclo total de criação dos frangos (1 a 31 dias) foi observado que não houve efeito ( $P>0,05$ ) dos tratamentos avaliados sobre o desempenho (CR, GP e CA), viabilidade e no índice de eficiência produtiva dos frangos.

A tabela 3 mostra o resultado do peso absoluto em gramas (g) dos órgãos coletados ao final do experimento, de acordo com o tratamento a que foram submetidas.

**Tabela 3** Peso absoluto do baço, fígado, bursa, intestino e pâncreas das aves alimentadas com níveis crescentes de cobre na dieta aos 31 dias.

<b>Níveis de cobre (mg/kg de ração) 31 dias</b>					
	<b>T1(10mg/kg)</b>	<b>T2(100mg/kg)</b>	<b>T3(50mg/kg)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>CV(%)</b>
Baço (g)	1,686	2,071	1,975	0,3774 <sup>ns</sup>	25,17
Fígado (g)	30,793	31,368	31,735	0,9494 <sup>ns</sup>	16,29
Bursa (g)	3,473	3,286	3,168	0,8392 <sup>ns</sup>	27,03
Intestino (g)	50,745	51,151	52,926	0,8594 <sup>ns</sup>	14,08
Pâncreas (g)	3,101	3,718	3,276	0,2824 <sup>ns</sup>	19,71

ns: Não significativo

O uso do cobre em níveis nutricionais e supranutricionais adicionado a ração não teve efeito sobre peso dos frangos aos 31 dias de vida. O peso do baço, fígado, bursa, intestino e pâncreas não foi influenciado pelas fontes e pelos níveis de cobre nas aves com 31 dias de idade.

#### **4.2 Metabolismo mitocondrial**

O consumo de oxigênio foi avaliado antes e depois da adição do substrato energético. As análises mostraram que o consumo endógeno foi menor nas amostras de todos os tratamentos quando comparado com o consumo estimulado de oxigênio pela adição do substrato, e que foi aumentado em todas as amostras quando houve demanda de oxigênio para fosforilar a mesma quantidade de ADP que foi adicionada. Isso demonstra a integridade das mitocôndrias isoladas do fígado dos frangos de corte alimentados com fontes e níveis distintos de cobre.

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à razão de controle respiratório (RCR) e a razão ADP/O conforme apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4 Relação de controle respiratório (RCR) e razão ADP/O do metabolismo mitocondrial de aves alimentadas com níveis crescentes de cobre na ração.**

	Níveis de cobre (mg/kg de ração) 31 dias			Valor de P	CV(%)
	T1(10mg/kg)	T2(100mg/kg)	T3(50mg/kg)		
RCR	2,836141	3,824187	2,385148	0,16325 <sup>ns</sup>	48,01
ADP/O	4,217171	2,585176	2,888370	0,19287 <sup>ns</sup>	50,29

ns: Não significativo



## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo houve diferença significativa no período pré-inicial, de 1 a 10 dias, no ganho de peso utilizando o maior nível de sulfato de cobre (tratamento 2). Porém, o resultado acumulado do desempenho (1 a 31 dias) demonstrou que não houve efeito entre os níveis e as fontes de cobre utilizado na dieta no que diz respeito ao consumo de ração, no ganho de peso e na conversão alimentar.

Samanta *et al* (2011) avaliou o desempenho em pintos utilizando o sulfato de cobre em um período de 21 e 42 dias, em níveis de 75, 150 e 250 mg/kg. Os resultados mostraram que o tratamento no qual o nível de cobre foi de 150 mg/kg obteve os melhores resultados no consumo de ração, no ganho de peso e na conversão alimentar.

Esses resultados não estão de acordo com o presente estudo porque as fases foram diferentes e os resultados também, no qual 100 mg/kg de sulfato de cobre proporcionou maior ganho de peso no período de 1 a 10 dias e não foi utilizado níveis de cobre que são considerados tóxicos. Os dados obtidos podem ser uma consequência da redução significativa de microrganismos patogênicos do intestino, já que o cobre é tóxico para algumas espécies de bactérias, e essa toxicidade depende da concentração de íons de cobre livre. Além disso, uma das ações do cobre é modificar o pH, interferindo na multiplicação de agentes patogênicos, interferindo no ganho de peso dos frangos.

De acordo com Luo *et al* (2005), avaliaram os efeitos da suplementação de 450 mg/kg de cobre sobre o desempenho. Os autores concluíram que o desempenho piorou. Estes resultados diferem dos que foram encontrados no presente estudo, uma vez que, o maior nível de cobre (100 mg/kg) não influenciou no consumo de ração. Diversos autores mostraram que níveis acima de 250 mg/kg podem causar efeitos negativos para frangos de corte.

Sirri *et al* (2016) avaliaram os efeitos no desempenho em frangos de corte de 31 e 51 dias de idade, utilizando cobre de origem inorgânica e orgânica, em níveis supranutricionais e nutricionais, nas concentrações de 15, 12,5, 12,5 mg/kg (sulfato de cobre) e 10, 8, 8 mg/kg (Mintrex). Nenhuma característica de desempenho foi afetada pelos níveis e pelas fontes de cobre e não houve diferença significativa na biometria aos 31 dias de idade. Este resultado pode ter ocorrido devido ao fato de que níveis ainda mais baixos de cobre podem atender às necessidades dietéticas do frango, pois são inferiores aos recomendados na prática comercial.

O resultado encontrado na biometria está de acordo com o presente trabalho, em que o peso absoluto dos órgãos não foram influenciados pelas fontes e pelos níveis de cobre utilizado. O peso relativo dos órgãos pode estar relacionado aos níveis do cobre que foi utilizado. As doses foram capazes de agir como agente bactericida e não foram suficientes para causar lesões nos órgãos, uma vez que, processos inflamatórios causam o aumento do peso dos orgãos.

Com relação ao ganho de peso, os resultados de Sirri *et al* (2016) corroboram com os encontrados no presente estudo, porque assim como no trabalho citado, não foi houve efeito do cobre sobre o desempenho dos frangos no período de 1 a 31 dias. Nesse caso, o cobre atendeu ás necessidades dos frangos, não tendo efeitos das fontes e dos níveis de cobre.

Em seu estudo, Manangi *et al* (2012) avaliaram os efeitos da suplementação de cobre no desempenho de frangos de corte com 54 dias, utilizando níveis reduzidos de fonte orgânica (HMTBA)<sub>2</sub> e níveis de cobre mais comumente usados na indústria de fonte inorgânica (CuSO<sub>4</sub>). Os níveis foram 8 mg/kg e 125 mg/kg, respectivamente. Não houve diferença significativa nas características de desempenho entre os níveis e fontes de cobre. Esse resultado pode ser atribuído ao aumento da biodisponibilidade mineral da fonte quelatada do cobre, em comparação com o sulfato.

Os resultados de Manangi *et al* (2012) corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, mesmo que o período experimental tenha sido diferentes. Quando o mineral é ligado a uma molécula orgânica, a probabilidade de que o mineral possa interagir com outros minerais, bem como ligar-se á moléculas antagonistas, é diminuída consideravelmente, melhorando assim, sua biodisponibilidade, e conseqüentemente, seu aproveitamento pelo organismo. Diante disso, justifica-se o melhor desempenho no ganho de peso no período pré-inicial utilizando 100 mg/kg de sulfato de cobre pentahidratado, uma vez que a necessidade de cobre nas fases iniciais tendem a ser maiores porque os frangos estão na curva de crescimento ascendente.

Devido à baixa e variável disponibilidade e baixo custo dos oligoelementos inorgânicos, é comum a prática pela indústria de produção de carne usar altos níveis de minerais na dieta como uma margem de segurança. Entretanto, minerais inorgânicos são mais suscetíveis a perdas na dieta por vias antagonistas antes da absorção intestinal (LEESON e SUMMERS, 2001).

El-Husseiny *et al* (2012) investigaram os efeitos da suplementação do Mintrex cobre (8 mg/kg) e do sulfato de cobre (16 mg/kg) em conjunto com o zinco e o

manganês sobre o desempenho de frangos de corte com 35 dias de idade. Foi possível concluir que as características de desempenho foram melhores quando foi utilizado o cobre de fonte orgânica. Porém, o efeito obtido não pode ser atribuído apenas ao cobre.

Esses resultados diferem do que foi obtido no presente estudo. Isso pode ser resultado dos níveis de cobre usados, uma vez que o sulfato foi capaz de ser mais eficiente do que a fonte orgânica. O nível supranutricional de Cu inorgânico utilizado foi capaz de agir como um aditivo melhorador de desempenho e garantiu um maior ganho de peso na fase pré-inicial porque os frangos tem uma demanda maior de cobre nessa fase.

O mercado de frangos de corte excede as suplementações em níveis muito mais elevados do que aqueles que são recomendados pelo NRC, com o objetivo de se ter uma margem de segurança, no que diz respeito à ação do cobre, já que pode ocorrer a formação de complexos do cobre com outros minerais, já que eles competem pelo mesmo sítio de ligação porque possuem propriedades físicas e químicas semelhantes com outros minerais, e, portanto, o excesso de um prejudicará a utilização do outro, e também por causa da biodisponibilidade do cobre oriundo de fontes diferentes.

Wang *et al* (2007) determinaram o desempenho em frangos de corte com 35 dias utilizando uma fonte de cobre orgânico (Mintrex) e uma fonte de cobre inorgânica (sulfato). Os níveis de cobre para as duas fontes foram 0, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/kg. Aos 14 dias não houve diferença significativa no ganho peso dos frangos. Concluíram que quanto maior os níveis de cobre, mas prejudicial será para os frangos. Com relação à fonte, as inorgânicas são mais nocivas do que as fontes orgânicas, e com isso, o desempenho será afetado diretamente devido às lesões oxidativas causadas pelas fontes de cobre de origem inorgânica na mucosa gastrointestinal dos frangos.

Os achados de Wang *et al* (2007) não corroboram com os resultados do estudo. O ganho de peso inicial foi maior no tratamento 2 (100 mg/kg) utilizando o sulfato de cobre em níveis supranutricionais. A biodisponibilidade do cobre de fonte orgânica é melhor do que o de fonte inorgânica. Entretanto, não houve diferença nas características de desempenho acumulado durante o período (1 a 31 dias) do experimento.

Nesse estudo não houve diferença significativa no consumo de oxigênio e também não houve diferença na razão de controle respiratório (RCR) e na razão ADP/O.

Yang *et al* (2017) investigaram os efeitos do cobre em níveis nutricionais e supranutricionais na disfunção mitocondrial hepática e uma falha na cadeia transportadora de elétrons em frangos de corte. O cobre foi utilizado em vários níveis (controle=11, grupo 1= 110, grupo 2= 220, e grupo 3= 330 mg/kg), e a função mitocondrial foi registrada nos dias 12, 36 e 60. A fonte de cobre usada foi o cloreto de cobre tribásico. Os resultados mostraram que o RCR foi significativamente aumentado em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle nos dias 36 e 60. Após 60 dias, o RCR diminuiu no grupo 3. A taxa de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias do fígado aumentou e depois diminuiu em aves submetidas a 330 mg/kg de cloreto de cobre tribásico.

Os resultados obtidos no trabalho de Yang *et al* (2017) indicam que houve lesões hepáticas e mitocondriais, diminuindo a função mitocondrial do fígado em frangos de corte. No entanto, esses efeitos diferem dos que foram encontrados na pesquisa. As doses utilizadas não foram suficientes para causar lesão hepática, e conseqüentemente, mitocondrial. O tempo de experimento também é um fator importante, já que uma maior concentração de cobre acumula além da capacidade compensatória do corpo após determinado tempo, e pode levar à disfunção mitocondrial.

Acetoze *et al* (2017) analisaram os efeitos da suplementação de cobre e zinco no desempenho, no consumo de oxigênio mitocondrial hepático e no vazamento de prótons, em níveis de controle (15 mg/kg TBCC), acima dos requerimentos (245 mg/kg) e submetidos a um desafio de coccidiose em frangos com 14 dias

As taxas de RCR foram maiores para o controle negativo. Nenhuma diferença no consumo de oxigênio no estado 3 foram observadas entre os tratamentos do controle negativo. Porém, no controle positivo, em que foi feito o desafio com a coccidiose, no estado 3, as taxas de RCR foi menor, podendo ser um resultado do desafio da clostridiose. Os resultados indicam que o desafio imune diminuiu a RCR e aumentou a cinética de vazamentos de prótons, indicando que houve alterações em um ou mais componentes da cadeia respiratória e dano oxidativo nos grupos de controle positivo.

Com relação ao controle negativo do trabalho de Acetoze *et al* (2017), estes resultados corroboram com o presente estudo, onde não tiveram diferença significativa no consumo de oxigênio e na RCR, e assim como o presente estudo, os níveis de cobre utilizados não foram suficientes para causar lesões hepáticas, já que as alterações são dependentes da dose e do tempo de exposição ao cobre.

Em seu trabalho Cao *et al* (2016) avaliaram os efeitos do sulfato de cobre na função mitocondrial do fígado utilizando níveis de cobre crescentes (11-Control, 110, 220 e 330 mg/kg). A função mitocondrial foi registrada aos 12, 24, 36, 48 e 60 dias de idade dos frangos.

Os resultados mostraram que valores funcionais (RCR e ADP/O) nas mitocôndrias não diferiu no grupo controle suplementado com 11 mg Cu/kg quando o succinato era fornecido como substrato energético. O grupo suplementado com 110 mg/kg apresentou valores crescentes (RCR e ADP/O) e apresentaram diferenças significativas após 36 dias em relação aos demais grupos. Os valores de RCR e ADP/O nos grupos suplementados com 220 e 330 mg/kg aos 12, 24 e 36 dias de idade foram aumentados, mas os valores diminuíram aos 48 e 60 dias.

A diminuição dos valores de RCR e ADP/O indicaram que o acoplamento entre a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa estavam prejudicados, e as mitocôndrias foram perdendo sua capacidade em acelerar a respiração sob condições de demanda de energia. Os maiores níveis de cobre aos 48 e 60 dias de idade dos frangos se acumularam além da capacidade de metabolização do cobre pelo organismo, tornando-se tóxico e, conseqüentemente, causando lesões.

Esses resultados não estão de acordo com o presente estudo, uma vez que o tempo do estudo foi menor (30 dias) do que o estudo de Cao *et al* (2016), logo, as doses utilizadas não foram capazes de causar lesões nas mitocôndrias. E nesse caso, o tempo de criação do frango de corte tipo *Griller* é menor, logo, terá ação como aditivo melhorador de desempenho porque o tempo de criação não é suficiente para o cobre causar alterações na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias do fígado dos frangos de corte.

O cobre é um metal de transição que possui mais de um estado de oxidação, tornando-o altamente reativo, e participa de muitas reações de transferência de elétrons induzidas por enzimas. Entretanto, em altas quantidades, o Cu catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio ao radical hidroxila, que irão causar a peroxidação lipídica das membranas celulares (CAO *et al.*, 2016).

As alterações causadas por altas quantidades de cobre causam o estresse oxidativo e outras lesões hepáticas e mitocondriais, e com isso, haverá alteração no estado energético celular, uma vez que, o organismo tende a direcionar seus mecanismos de defesa e reparação de danos a esses locais, e isso irá interferir diretamente no desempenho dos frangos de corte.

Su *et al* (2011) examinaram em 4 tratamentos os efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre na transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) de hepatócitos de frangos de corte. O cobre utilizado tinha diferentes concentrações (I controle= 11, II= 110, III= 220 e IV= 330 mg/kg. Foi utilizado o sulfato de cobre, cloreto de cobre tribásico e metionina de cobre. A coleta do material (fígado) para análise foi realizada nos dias 12, 24, 36, 48 e 60.

O TPM de frangos de corte do tratamento I foi significativamente diferente em relação aos frangos do tratamento IV em todos os momentos, mas não foi diferente em comparação com os frangos do tratamento II e III durante o período inicial do experimento. Aos 60 dias a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior nos frangos do tratamento III e IV.

A TPM de frangos de corte alimentados com metionina de cobre foi o maior, seguido pelo TBCC e em seguida pelo sulfato de cobre. Os efeitos de cobre na TPM foram dependentes do tempo e da dose. O TBCC é uma fonte de cobre inorgânica, mas é considerada menos reativa e destrutiva quando comparado ao sulfato de cobre.

Esses resultados diferem do que foi encontrado no presente estudo, uma vez que, foram utilizadas diferentes fontes e níveis de cobre, porém, os níveis de cobre não foram suficientes para causar alterações na cadeia respiratória.

## 6 CONCLUSÕES

O uso de 100 mg/kg de sulfato de cobre pentahidratado aumentou o ganho de peso na fase pré-inicial, entretanto, não teve efeito ao final do ciclo de criação de frangos de corte tipo *Griller*. A biometria de órgãos não foi influenciada pelas fontes e pelos níveis de cobre que foram utilizados.

O cobre em nível supranutricional, nas fontes utilizadas, não influenciou no acoplamento e na eficiência da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias isoladas do fígado de frangos de corte tipo *Griller*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACETOZE, G.; KURZBARD, R.; KLASING, K. C.; RAMSEY, J.J.; ROSSOW, E. H. A. 2017: Liver mitochondrial oxygen consumption and proton leak kinetics in broilers supplemented with dietary copper or zinc following coccidiosis challenge. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 101: 210–215.
- AMMERMAN, C.B.; HENRY, P. R.; MILES, R. D. 1998. Supplemental organically-bound mineral compounds in livestock nutrition. Recent advances in animal nutrition. **Nottingham University Press** pp 67–97.
- APAJALAHTI, J. A.; KETTUNEN, A.; BEDFORD, M. R.; HOLBEN, W. E. 2001. Percent g+c profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 5656–5667.
- ARIAS, V. J.; KOUTSOS, E. A. 2006. Effects of copper source and level in intestinal physiology and growth of broiler chickens. **Poultry Science** 85: 999-1007.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. 2005. AAFCO. **Official Publication**. Atlanta, GA, pp 307–308.
- BARBOSA, R. C.; DALÓLIO, F. S.; AMORIM, M. L.; SILVA, J. N. GONZAGA, D. A. Análise de viabilidade econômica de sistemas de aquecimento de instalações agropecuárias para criação de frangos de corte. **Revista Engenharia na Agricultura** 25: 212-222, 2017.
- BOST, M.; HOUDART, S.; OBERLI, M.; KALONJI, E.; HUNEAU, J. F.; MARGARITIS, I. 2016. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 35:107–115.
- BRAND, M. D.; DIVAKARUNI, A. S. 2011. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. **Physiology**. 2: 192–205.
- CARLTON, W. W.; HENDERSON, W. 1962. Histopathological lesions observed in the long bones of chickens fed a copper-deficient diet. **Poultry Science** 41: 1634-1641.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine** 29: 222–230.
- CADENAS, S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics** 1859: 940–950.
- CAO, H.; SU, R.; HU, G.; LI, C.; GUO, J.; PAN, J.; TANG, Z. 2016. In vivo effects of high dietary copper levels on hepatocellular mitochondrial respiration and electron transport chain enzymes in broilers. **British Poultry Science** 1668: 1466-1493.
- CARLTON, W.W.; HENDERSON, W. 1962. Histopathological lesions observed in the long bones of chickens fed a copper-deficient diet. **Poultry Science** 41: 1634-1641.
- CHINNERY, P. F.; SCHON, E. A. 2003. Mitochondria. **Journal of Neurology Neurosurgery, and Psychiatry** 74: 1188–1199.
- CHRISTOPHER, R. P.; CHRISTOPHER, J. F.; VINZENZ, M. U. 2013. Cellular distribution of copper to superoxide dismutase involves scaffolding by membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1-6.
- CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D.; MONEGUE, H. J.; HALL, D. D.; ORR, J. D. E. 1998. Tribasic copper chloride and copper sulfate as copper sources for weanling pigs. **Journal Animal Science**. 76: 118–123.
- DAVIS, G. K.; MERTZ, W. 1987. Copper in Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 5.ed. Vol. 1. W. Mertz, ed. **Academic Press**, New York. P. 301–364.



- DIAS, N.; BAILLY, C. 2005. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochemical Pharmacology** 70: 1-12.
- DUCHEN, M. R. 2004. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. **Molecular Aspects of Medicine**. 25: 365–451.
- ESTABROOK, R. W. 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. **Methods Enzymol. Wiley** 10: 41–47.
- EL-HUSSEINY, O. M.; HASHISH, M. S.; ALI, A. R.; ARAFA, A. S.; EL- SAMEE, A. D. L.; OLEMY, A.A. 2012. Effects of Feeding Organic Zinc, Manganese and Copper on Broiler Growth, Carcass Characteristics, Bone Quality and Mineral Content in Bone, Liver and Excreta. **International Journal of Poultry Science** 11: 368-377.
- EL-MAHALAWAY, A. M.; SELIM, A. A.; MAHBOUB, F. A. R. 2015. The potential protective effect of propolis on experimentally induced hepatitis in adult male albino rats. Histological and immunohistochemical study. **Journal of Histology and Histopathology**. 2: 10-14.
- GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicol. Poultry Science** 189: 147-163.
- GANINI, D.; CANISTROB, D.; JANGA, J.; STADLER, K.; MASONA, R. P.; KADIISKA, M. B. 2012. Ceruloplasmin (ferroxidase) oxidizes hydroxylamine probes: deceptive implications for free radical detection. National Institutes of Health USA- **Free Radical Biology and Medicine**. 53: 1514–1521.
- GATTÁS, G.; BARBOSA, F. F. 2004. Cobre na nutrição de aves e suínos **Revista Eletrônica Nutri-time**, v.1, n3, p.117-133.
- GUO, R.; HENRY, P. R.; HOLWERDA, R. A.; CAO, J.; LITTELL, R. C.; MILES, R. D.; AMMERMAN, C. B. 2001. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry. **Journal Animal Science**. 79: 1132–1141.
- HILL, C. H.; MALTRONE, G. 1961. Studies on copper and iron deficiency in growing chickens. **Journal of Nutrition** 73: 425-431.
- HOSSEINI; M. J.; SHAKI; F.; KHANSARI, M. G.; POURAHMAD, J. 2014. Toxicity of Copper on Isolated Liver Mitochondria: Impairment at Complexes I, II, and IV Leads to Increased ROS Production. **Cell Biochemistry and Biophysics** 70: 367–381.
- INOUE, M.; SATO, E. F.; NISHIKAWA, M. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry** 10: 2495-2505.
- IQBAL, M.; PUMFORD, N. R.; TANG, Z. X.; LASSITER, K.; WING, T.; COOPER, M.; BOTTJE, W. 2004. Low feed efficient broilers within a single genetic line exhibit higher oxidative stress and protein expression in breast muscle with lower mitochondrial complex activity. **Poultry Science**. 83: 474–484.
- JENSEN, L. S.; MAURICE, D. V. 1978. Effect of high dietary copper on the caeca of chicks. **Poultry Science** 57: 166–170.
- JOHANSSON, A.; CHAKRABARTY, S.; BERTHOLD, C. L.; HÖGBOM, M.; WARSHEL, A.; BRZEZINSKI, P. 2011. Proton-transport mechanisms in cytochrome c oxidase revealed by studies of kinetic isotope effects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics** 1807: 1083–1094.
- KANG, J.; PERVAIZ, S. 2012. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. **Biochemistry Research International** 45: 123-129.
- KELLY, D.; KING, T. P. 2001. Luminal bacteria: Regulation of gut function and immunity. **Nottingham University Press**. P 113–131.
- KOEKKOEK, W. A.; VAN ZANTEN, A. R. 2016. Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness. **Nutrition in Clinical Practice**. 31: 457-74.

- KURUTAS, E. B. 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**. 2016: 15: 1- 71.
- KLEVAY, L. M. 1990: Ischemic heart disease as copper deficiency. In: C. Kies, (ed.) Copper Bioavailability and Metabolism. (AdvExp Med Biol, Vol 258). **Plenum Press**, New York, pp. 197–208.
- KOH, T. S.; PENG, R. K.; KLASING, K. C. 1996: Dietary copper level affects copper metabolism during lipopolysaccharide-induced immunological stress in chicks. **Poultry Science** 75: 867-872.
- KOHL, K. D. 2012. Diversity and function of the avian gut microbiota. **Journal of Comparative Physiology**. 182: 591–602.
- KOMSA-PENKOVA, R.; SPIROVA, R.; BECHEV, B. 1996. Modifications of Lowry's method for collagen concentration measurement. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 32, 33–43.
- LEE, I. C.; KO, J. W.; PARK, S. H.; LIM, J. O.; SHIN, I. S.; MOON, C.; KIM, J. C.; LEESON, S. 2009. Copper metabolism and dietary needs. **World's Poultry Science**. 65: 353–366.
- LEESON, S.; SUMMERS, J. D. S. 2001. Nutrition of the chicken. 4 Ed. **Guelph: University Books**. 413p.
- LEESON, S. 2005. Trace mineral requirements of poultry—validity of the NRC recommendations. Redefining mineral nutrition. **Nottingham University Press**, Nottingham, pp 107–117.
- LEESON, S. 2009. Copper metabolism and dietary needs. **World's Poultry Science** 65: 353–366.
- LEMASTERS, J. J. 2014. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micro-mitophagy (Type 3). **Redox Biology** 2: 749-754.
- LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. 2002. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. **Redox Report**. 7: 55–57.
- LIU, J. X.; SHEN, S. N.; TONG, Q.; WANG, Y. T.; LIN, L. G. 2018. Honokiol protects hepatocytes from oxidative injury through mitochondrial deacetylase SIRT3. **European Journal of Pharmacology** 834: 176–187.
- LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; LEE, M. D. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 6816–6824.
- LUO, X. G.; JI, F.; LIN, Y. X.; STEWARD, F. A. 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.
- MANANGI, M. K.; VAZQUEZ-AÑÓN, M.; RICHARDS, J. D.; CARTER, S.; BURESH, R. E.; CHRISTENSEN, K. D. 2012. Impact of feeding lower levels of chelated trace minerals versus industry levels of inorganic trace minerals on broiler performance, yield, footpad health, and litter mineral concentration. **Poultry Science** 21 :881–890.
- MALTAIS, D.; DESROCHES, D.; AOUFFEN, M.; MATEESCU, M. A.; WANG, R.; PAQUIN, J. 2013. The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: A potential modulator of nervous system organization. **Journal of Neuroscience** 121: 73–82.
- MC. DONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G. 2002. **Animal Nutrition** 6ed. 693p.
- MCDOWEL, L. R. 1992. Copper and molybdenum – minerals in animal and human. **Nutrition. Academy Press Inc**. San Diego – California, p. 178-204.
- MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. 1991. Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of organic compounds. **Phytopathology** 81: 1258–1263.
- MIETTINEN, T. P.; BJORKLUND, M. 2017. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. **Trends Journal of Cell Biology** 27: 393-402.

- 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.
- MORAIS, S. C. D.; MENTEN, J. F.M.; BRAINER, M. M. A.; VALE, M. M. 2001. Altos níveis dietéticos de cobre no desempenho e no colesterol sérico e muscular de frangos de corte. **Scientia Agricola** v.58, n.1, p.1-5.
- MUJKOSOVA, J.; ULICNA, O.; WACZULIKOVA, I.; VLKOVICOVA, J.; VANCOVA, O.; FERKO, M.; POLAK, S.; ZIEGELHOFFER, A. 2010. Mitochondrial function in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats: influence of captopril treatment. **General Physiology and Biophysics** 29: 203–207.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9.ed. Washington, D.C.: **National Academy Press** 176p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed., **National Academy Press** 381p.
- OGNIK, K.; STEPNIOWSKA, A.; CHOLEWINSKA, E.; KOZLOWSKI, K. 2016. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in drinking water on estimated intestinal absorption of iron, zinc, and calcium. **Poultry Science**. 95: 2045–2051.
- PANG, Y.; APPLGATE, T. J. 2006. Effects of copper source and concentration on in vitro phytate phosphorus hydrolysis by phytase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 1792–1796.
- PANG, Y.; PATTERSON, J. A.; APPLGATE, T. J. 2009. The influence of copper concentration and source on ileal microbiota. **Poultry Science** 88: 586–592.
- PESTI, G. M.; BAKALLI, R. I. 1996. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. **Poultry Science** 75: 1086–1091.
- PETTIGREW, J. E. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: Dietary tools, Part 1. **Animal Biotechnology**. 17: 207–215.
- PETTIGREW, J. E. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: Dietary tools. **Animal Biotechnology** 17: 207–215.
- PIEKARSKI, A. L.; KONG, B. W.; LASSITER, K.; HARGIS, B. M.; BOTTJE, W. G. 2014. Cell bioenergetics in Leghorn male hepatoma cells and immortalized chicken liver cells in response to 4-hydroxy 2-nonenal-induced oxidative stress. **Poultry Science** 93: 2870–2877.
- POELSTRA, K.; SCHUPPAN, D. 2011. Targeted therapy of liver fibrosis/cirrhosis and its complications. **Journal of Hepatology**. 55: 726–728.
- POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism** 20: 332-340.
- RAMSEY, J. J.; HAGOPIAN, K.; KENNY, T. M.; KOOMSON, E. K.; BEVILACQUA, L.; WEINDRUCH, R.; HARPER, M. E. 2004. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy restricted rats. **American Journal of Physiology** 286: 31–40.
- 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.
- REHMAN, H. U.; VAHJEN, W.; AWAD, W. A.; ZENTEK, J. 2007. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Archives of animal nutrition** 61: 319–335.
- REZABAKHSHD, A. H.; MALEKI-DIZAJII, N.; RAHBARGHAZID, R. J.; NAMDARIAN, R. 2017. Copper sulfate pentahydrate reduced epithelial cytotoxicity induced by lipopolysaccharide from enterogenic bacteria. **Journal of Biomedicine and Pharmacotherapy** 89. 454–461.

RODRIGUES, L. E. A.; Santos, C. V. C.; Albuquerque, M. L.; Silva, A. M.; Martinelli, G.; Martinelli, R. 2007. Efeito in vivo do enalapril sobre a respiração mitocondrial do fígado e do rim do rato. **Laes & Haes** 28: 98-106.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, E. R. F. 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. **Departamento de Zootecnia. UFV**. Viçosa, MG. 252 p.

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. **Animal Science**. 7: 1001-1006.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: New surprises. **Annual Review of Microbiology**. 50: 753–789.

SIRRI, F.; MAIORANO, G.; TAVANIELLO, S.; CHEN, J.; PETRACCI, M.; MELUZZI, A. 2016. Effect of different levels of dietary zinc, manganese, and copper from organic or inorganic sources on performance, bacterial chondronecrosis, intramuscular collagen characteristics, and occurrence of meat quality defects of broiler chickens. **Poultry Science** 95: 1813–1824.

SOSNOWSKA, M.; LUKASIEWICZ, N.; WNUK, A.; SAWOSZ, E.; NIEMIEC, J.; SKOT, A.; JAWORSKI, S.; CHWALIBOG, A.; 2016. In ovo administration of copper nanoparticles and copper sulfate positively influences chicken performance. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 96: 3058–3062.

SU, R.; WANG, R.; CAO, H.; PAN, J.; CHEN, L.; LI, C.; SHI, D.; TANG, Z. 2011. High Copper Levels Promotes Broiler Hepatocyte Mitochondrial Permeability Transition In Vivo and In Vitro. **Biological Trace Element Research** 144: 636–646.

SUTTLE, N. F. 2010. The mineral nutrition of livestock. 4. ed. Wallingford: **CABI**. P 579-587

SCOTTÁ, A. B.; VIEIRA, A. R.; GOMIDE, C. P. A.; CAMPOS, F. P.; BARROCA, C. C.; FORMIGONI, S. A. 2014. Influência dos minerais quelatados e inorgânicos no metabolismo, desempenho, qualidade da carcaça e da carne de frangos de corte. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia** V. 8, N. 9, Ed. 258, Art. 1710.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B.; MULLIS, L. A.; WISE, T. A. 2004. Bioavailability of copper chloride in cattle. **Animal Feed Science and Technology** 116: 1–13.

SUTTLE, N. F. 2010. The mineral nutrition of livestock. 4. ed. Wallingford: **Centre for Agriculture and Bioscience International**. p. 579-587.

SULTANA, S.; RAHMAN, M. D. M.; ZULFEKAR ALI, M. D. 2015. Evaluation of Gentian Violet and Copper Sulphate as Fungi Inhibitor in Broiler Diet. **International Journal of Animal Biology** 4: 146-149.

ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WŁOSEK, A.; JÓZEFIAK, D. 2014. The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: Review and implications of recente studies. **Poultry Science** 70: 475–486.

TAKAHASHI, E.; YAMAOKA, Y. 2017. Simple and inexpensive technique for measuring oxygen consumption rate in adherent cultured cells. **Journal Of Physiological Sciences** 67: 731–737.

THOMPSON, J. K. R.; APPLGATE, T. J. 2004. Effects of Copper Source on Phosphorus Retention in Broiler Chicks and Laying Hens. 2004 **Poultry Science** 83: 990–996.

TOROK, V. A.; HUGHES, R. J.; MIKKELSEN, L. L.; MALDONADO, R. P.; BALDING, K.; MACALPINE, R.; PERCY, N. J.; OPHEL-KELLER, K. 2011. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. **Applied and Environmental Microbiology**. 77: 5868–5878.

UNGVARI, Z.; KRASNIKOV, B. F.; CSISZAR, A. 2008. Testing hypotheses of aging in long-lived mice of the genus *Peromyscus*: association between longevity and mitochondrial stress resistance, ROS detoxification pathways, and DNA repair efficiency. **Age** 30: 121-133.

- VAHJEN, W.; GLÄSER, K.; SCHÄFER, K.; SIMON, O. 1998. Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. **Journal of Agricultural Science** 130: 489–500.
- VALLET, S. D.; MIELE, A. E.; UCIECHOWSKA-KACZMARZYK, U.; LIWO, A.; DUCLOS, B.; SAMSONOV, S. A.; BLUM, S. R. 2018. Insights into the structure and dynamics of lysyl oxidase propeptide, a flexible protein with numerous partners. **Scientific Reports** 8: 117-168.
- VARZANEHA, M. B. 2017. The influence of oral copper-methionine on matrix metalloproteinase-2 gene expression and activation in right-sided heart failure induced by cold temperature: A broiler chicken perspective. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** 39: 71–75.
- VARZANEH, M. B.; RAHMANI, H.; JAHANIAN, R.; MAHDAVI, H. A.; PERREAU, C.; PERROT, G.; BRÉZILLON, S.; MAQUART, F. X. 2016. Effects of Dietary Copper-Methionine on Matrix Metalloproteinase-2 in the Lungs of Cold-Stressed Broilers as an Animal Model for Pulmonary Hypertension. **Biological Trace Element Research** 172: 504–510.
- 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, Z.; CERRATE, S.; COTO, C.; YAN, F.; WALDROUP, P. W. 2007. Evaluation of Mintrex Copper as a Source of Copper in Broiler Diets. **International Journal of Poultry Science** 6: 308-313.
- WARD, T. L.; WATKINS, K. L.; SOUTHERN, L. L. 1994. Interactive effects of dietary copper and water copper level on growth, water intake, and plasma and liver copper concentrations of poults. **Poultry Science**. 73: 1306–1311.
- XIANG, L. X.; SHAO, J. Z. 2003. Role of intracellular Ca<sup>2+</sup>, reactive oxygen species, mitochondria transmembrane potential, and antioxidant enzymes in heavy metal-induced apoptosis in fish cells. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 71: 114–122.
- XU W, N. G. O. L.; DOKMANOVIC, P. G.; MARKS, M. P. A: 2006. Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 103: 15540-15545.
- YANG, F.; CAO, H.; SU, R.; GUO, J.; LI, C.; PAN, J.; TANG, Z. 2017. Liver mitochondrial dysfunction and electron transport chain defect induced by high dietary copper in broilers. **Poultry Science** 96: 3298–3304.
- YAN, F.; WALDROUP, P.W. 2006. Evaluation of Mintrex® manganese as a source of manganese for young broilers. **International Journal of Poultry Science** 5:708–713.
- ZEVENHUIZEN, L. P. T. M.; DOFING, J.; ESHUIS, E. J.; SCHOLTENKOERSELMAN, I. J. 1979. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. **Microbial Ecology** 5: 139–146.
- ZHAO J, SHIRLEY, R. B, VAZQUEZ-AÑÓN, M.; DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; FISHER, P. 2010. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield, and footpad health in commercial meat broilers. **The Journal of Applied Poultry Research** 19: 365–372.
- ZHAO, J, G.; ALLEE, G.; GERLEMANN, L. M. A. M.; GRACIA, I.; PARKER, D.; VAZQUEZ-ANON, M.; HARRELL, R. J. 2014. Effects of a chelated copper as growth promoter on performance and carcass traits in pigs. Asian-Australas. **Journal Animal Science** 27: 965–973.
- ZHAO, J.; SHIRLEY, R. B.; HAMPTON, T. R.; RICHARDS, J. D.; HARRELL, R. J.; DIBNER, J. J. 2008. A dose titration comparison of MINTREX® versus ZnSO<sub>4</sub> on performance in broilers with high dietary copper supplementation. **Poultry Science** 87: 51–52.
- ZHAO, J.; SHIRLEY, R. B.; VAZQUEZ, A. B.; DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; FISHER, P. 2010. Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield, and footpad health in commercial meat broilers. **Journal of Applied Poultry Research** 19: 365–372.

## APÊNDICES

**Apêndice 1 – Tabelas com os valores da média e o desvio padrão de cada tratamento nos estágios do consumo de oxigênio e os valores da razão de controle respiratório (RCR) e a relação ADP/O de cada tratamento.**

<b>TRATAMENTO 1</b>	ESTÁGIO II	ESTÁGIO III	ESTÁGIO IV
MÉDIA	0,823	2,311	0,907
DESVIO PADRÃO	0,547	0,823	0,3417
<b>TRATAMENTO 2</b>	ESTÁGIO II	ESTÁGIO III	ESTÁGIO IV
MÉDIA	0,840	4,512	1,412
DESVIO PADRÃO	0,437	2,475	0,832
<b>TRATAMENTO 3</b>	ESTÁGIO II	ESTÁGIO III	ESTÁGIO IV
MÉDIA	1,087	4,524	1,905
DESVIO PADRÃO	0,392	2,867	1,048

TRATAMENTO	RCR	ADP/O
T1	2,836	4,217
T2	3,824	2,585
T3	2,385	2,888