

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ROGÉRIO VENTURA DA SILVA JÚNIOR**

**MINERAIS COMPLEXADOS COM AMINOÁCIDOS EM DIETAS DE POEDEIRAS**  
**DA FASE DE CRIA AO PERÍODO FINAL DE PRODUÇÃO**

**RECIFE-PE**

**2021**

**ROGÉRIO VENTURA DA SILVA JÚNIOR**

**MINERAIS COMPLEXADOS COM AMINOÁCIDOS EM DIETAS DE POEDEIRAS  
DA FASE DE CRIA AO PERÍODO FINAL DE PRODUÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco para obtenção de título de Doutor em  
Zootecnia

Área de concentração: Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Bôa-Viagem Rabello

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mércia Rodrigues  
Barros; Dr.<sup>a</sup>. Alba Kyonara Barbosa Tenório  
Fireman

**RECIFE**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S586m Silva junior , Rogério Ventura da Silva Junior  
MINERAIS COMPLEXADOS COM AMINOÁCIDOS EM DIETAS DE POEDEIRAS DA FASE DE CRIA AO PERÍODO FINAL DE PRODUÇÃO: minerais complexados com aminoácidos em dietas de poedeiras da fase de cria ao período final de produção / Rogério Ventura da Silva Junior Silva junior . - 2021.  
104 f. : il.
- Orientador: Carlos Boa-Viagem Rabello.  
Coorientadora: Mercia Rodrigues Barros.  
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Recife, 2021.
1. Desempenho. 2. Qualidade dos ovos. 3. Complexo mineral. 4. Concentração mineral. 5. Qualidade óssea. I. Rabello, Carlos Boa-Viagem, orient. II. Barros, Mercia Rodrigues, coorient. III. Título



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**MINERAIS COMPLEXADOS COM AMINOÁCIDOS EM DIETAS DE POEDEIRAS  
DA FASE DE CRIA AO PERÍODO FINAL DE PRODUÇÃO**

**Tese elaborada por**

**ROGÉRIO VENTURA DA SILVA JÚNIOR**

**Aprovado em 29/10/ 2021**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Carlos Bôa-Viagem Rabello  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
(Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia da Costa Lopes  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Dr. Marcos Jose Batista dos Santos  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Alba Kyonara Barbosa Alves Tenorio Fireman  
Zinpro Corporation

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sem Ele nada disso seria possível.

À minha família, pelo apoio e motivação, em particular à minha esposa e companheira Waleska Rocha, à qual me concedeu a honra de ser pai e descobrir um sentimento incomparável e inexplicável.

Ao meu filho Bernardo Medeiros Ventura, que apesar de muito pequenino, teve a paciência de muitas vezes ir brincar sozinho (não foram poucas vezes), e me proporciona motivação para continuar lutando e alcançando objetivos.

Ao meu orientador, professor Carlos Bôa-Viagem Rabello, que me acompanhou desde o início da graduação com muita paciência e dedicação nas orientações.

Aos grandes amigos, Heraldo Bezerra, Andresa Farias, Bruno, Camila Gomes, Ana Carolina Ferreira, Dayane e Apolônio, pela grande ajuda durante a condução da pesquisa e análises laboratoriais.

À empresa Zinpro, pelo financiamento da pesquisa, e, em particular, à Alba Fireman, pelo comprometimento, contribuição e direcionamento nos estudos.

À Granja Ovo Novo, por permitir a condução da pesquisa ao longo de quase dois anos.

Ao grupo de avicultura, com o qual sempre podemos contar nos momentos em que necessitamos de ajuda.

## RESUMO

Representando de 3 a 4% do peso vivo das aves, os minerais são os constituintes orgânicos que desempenham diversas funções no organismo animal. Nas práticas comerciais, a suplementação das dietas avícolas é realizada com sais inorgânicos, que apresentam baixa biodisponibilidade e altas taxas de excreção. Sendo assim, o uso de fontes minerais ligados a moléculas orgânicas surge como uma alternativa para aumentar a eficiência de utilização e reduzir os impactos da idade sobre o desempenho produtivo, qualidade das cascas dos ovos e poluição ambiental. No período de um dia de vida até as 30 semanas de idade, dois grupos de aves foram alimentadas com duas fontes minerais: inorgânicas (70, 70 e mg/kg de Zn, Mn e Cu) ou inorgânicas reduzidas (40, 40, 2,75 mg/kg Zn, Mn e Cu) associadas com minerais complexados a aminoácidos (30, 30, e 5,25 mg/kg). E durante o período de 30 às 93 semanas de idade, 640 galinhas poedeiras, 320 de cada grupo inicial, foram redistribuídas em quatro grupos, definindo o arranjo fatorial 2 x 4 com oito repetições de 10 aves. Os tratamentos consistiram em: 1) MI – contendo 70, 70, 8 mg/kg de Zn, Mn, Cu provenientes de fontes minerais inorgânicas; 2) MCA-AMC – substituição parcial das fontes minerais inorgânicas por 30, 30 e 5,25 mg de Zn, Mn e Cu complexados a aminoácidos; 3) MCA-ZMCFe – substituição parcial das fontes inorgânicas por 30, 30, 5, 25 e 40 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe; 4) MCA-Fe - substituição parcial da fonte de ferro inorgânico por 40 mg/kg de Fe complexado a aminoácido. Foram avaliados os efeitos das fontes minerais sobre as variáveis de desempenho produtivo, características ósseas, qualidade dos ovos, composição mineral dos tecidos (óssea e hepático), gema dos ovos e excretas, assim como variáveis sanguíneas (fosfatase alcalina, corticosterona e triiodotironina) e os efeitos das fontes sobre a microestrutura das cascas dos ovos e distribuição dos elementos minerais sobre a casca. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Houve efeito de interação para as variáveis de qualidade dos ovos, óssea, sanguínea e para as camadas paliçada, mamilar e largura dos botões mamilares da casca dos ovos das aves suplementadas com MCA. O uso de MCA-ZMC desde a FC em substituição parcial às fontes inorgânicas e a manutenção desta suplementação em associação ao MCA-Fe retardou os impactos da idade sobre as características ósseas e qualidade da casca dos ovos durante a FP, influenciando positivamente a atividade da fosfatase, manutenção da integridade óssea e espessura da casca e suas microestruturas, promovendo cascas de melhor qualidade no final do período de produção, sem afetar o desempenho produtivo das aves. A suplementação parcial das aves com MCA-ZMC do nascimento até 93 semanas de idade não determinaram maiores concentrações minerais nos tecidos ósseo, hepático, gema dos ovos e excretas das aves. Apenas a suplementação das aves durante a fase final de produção, independente da suplementação durante a fase de crescimento, proporcionaram maiores concentrações de Fe e Cu no fígado, além do Mn na gema e nas excretas das aves.

**Palavras-chave:** Desempenho, Qualidade dos ovos, Complexo mineral; Concentração mineral; Qualidade óssea.

## ABSTRACT

Representing 3 to 4% of the live weight of birds, minerals are the organic constituents that act by performing various functions in the animal organism. In commercial practices, poultry diets are supplemented with inorganic salts, which have low bioavailability and high excretion rates. Thus, the use of mineral sources linked to organic molecules appears as an alternative to increase the efficiency of use and reduce the impacts of age on production performance, eggshell quality and environmental pollution. In the period from one day of life to 30 weeks of age, two groups of birds were fed with two mineral sources: inorganic (70, 70 and mg/kg of Zn, Mn and Cu) or reduced inorganic (40, 40, 2.75 mg/kg Zn, Mn and Cu) associated with minerals complexed to amino acids (30, 30, and 5.25 mg/kg). And during the period from 30 to 93 weeks of age, 640 laying hens, 320 from each initial group, were redistributed into four groups, defining a 2 x 4 factorial arrangement with eight replicates of 10 birds. The treatments consisted of: 1) MI– containing 70, 70, 8 mg/kg of Zn, Mn, Cu from inorganic mineral sources; 2) MCA-AMC – partial replacement of inorganic mineral sources by 30, 30 and 5.25 mg of Zn, Mn and Cu complexed to amino acids; 3) MCA-ZMCFe – partial replacement of inorganic sources by 30, 30, 5, 25 and 40 mg/kg of Zn, Mn, Cu and Fe; 4) MCA-Fe - partial replacement of the inorganic iron source by 40 mg/kg Fe complexed to amino acid. The effects of mineral sources on the variables of productive performance, bone characteristics, egg quality, tissue mineral composition (bone and liver), egg yolk and excreta, as well as blood variables (alkaline phosphatase, corticosterone and triiodothyronine) were evaluated and the effects of sources on the microstructure of eggshells and distribution of mineral elements on the shell. The data obtained were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey's test ( $P < 0.05$ ). There was an interaction effect for the variables of quality of eggs, bone, blood and for the palisade, nipple layers, and width of the nipple buds of the eggshells of birds supplemented with MCA. The use of MCA-ZMC from CF in partial replacement of inorganic sources, and the maintenance of this supplementation in association with MCA-Fe delayed the impacts of age on bone characteristics and eggshell quality during PF, influencing positively the activity of phosphatase, maintenance of bone integrity and thickness of the shell and its microstructures, promoting better quality shells at the end of the production period, without affecting the productive performance of the birds. Partial supplementation of birds with MCA-ZMC from birth to 93 weeks of age did not determine higher mineral concentrations in bone tissue, liver, egg yolk and bird excreta. Only supplementation of birds during the final production phase, independent of supplementation during the growth phase, provided higher concentrations of Fe and Cu in the liver, in addition to Mn in the yolk and excreta of the birds.

**Keywords:** Performance; Egg quality; Mineral complex; Mineral concentration; Bone quality.

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>Pág</b>
Tabela 1. Composição calculada e analisada dos minerais das dietas experimentais.....	49
Tabela 2. Composição calculada e analisada das dietas experimentais (2).....	50
Tabela 3. Média do peso corporal (PC, kg), consumo de ração (CR, g/ave/dia), peso do ovo (PO, g), massa de ovos (MO, g/ave/ dia), conversão alimentar (CA, kg/kg de ovos, CAD kg/dúzia de ovos) e percentual de postura (PP%) de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas com fontes minerais complexadas a aminoácidos das 50 às 93 semanas de idade.....	57
Tabela 4. Valores médios dos escores de coloração (SC), peso do ovo (PO, g), peso de albúmen (PA, g), altura de albúmen (AA, mm), peso de gema (PG, g), cor de casca (CC), peso de casca (PC, g), espessura de casca (EC, mm), Unidade Haugh (HU), percentual de gema (GE), albúmen (AL), casca (CA) e resistência de casca (RSC, kgf) de galinhas poedeiras suplementadas com fontes minerais complexadas a aminoácidos.....	59
Tabela 5. Média do peso relativo das tíbias (PR), comprimento (CP), espessura (ES) e resistência óssea (RO) de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção.....	60
Tabela 6. Valores médios de radiodensidade das diferentes regiões da tíbia de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção.....	60
Tabela 7. Valores médios dos níveis de corticosterona (CT), triiodotironina (T3) e atividade da fosfatase alcalina (FA) no plasma sanguíneo de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção.....	61
Tabela 8. Composição mineral da tíbia de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção.....	63
Tabela 9. Composição mineral do fígado de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção.....	64



Tabela 10.	Composição mineral da gema dos ovos de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção.....	65
Tabela 11.	Composição mineral das excretas de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção.....	66

## **CAPÍTULO II**

Tabela 1.	Composição mineral calculada e analisada das dietas experimentais (mg/kg).	91
Tabela 2.	Composição calculada e analisada das dietas experimentais.....	92
Tabela 3.	Médias da espessura das camadas mamilar e paliçada da casca dos ovos de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção.....	95

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>Pág</b>
Figura 1	47
Figura 2	53
 <b>CAPÍTULO II</b>	
Figura 1	92
Figura 2	93
Figura 3	96
Figura 4	97
Figura 5	98
Figura 6	98

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	12
2.	FONTES MINERAIS .....	13
3.	DIGESTÃO DOS METABOLISMOS MACROMINERAIS .....	18
3.1	Fontes convencionais .....	18
3.1.2	Zinco.....	21
3.1.3	Cobre .....	22
3.1.4	Manganês .....	23
3.1.5	Ferro .....	24
3.2	Complexos minerais.....	25
4.	COMPLEXOS MINERAIS NA NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS.....	26
	REFERÊNCIAS .....	30
	CAPÍTULO I.....	42
	Efeito da suplementação parcial de complexos mineral-aminoácido na dieta de galinhas de postura semipesadas após 50 semanas de idade.....	42
	RESUMO .....	43
	ABSTRACT.....	44
	INTRODUÇÃO .....	445
	MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
	RESULTADOS.....	55
	DISCUSSÃO .....	66
	CONCLUSÃO .....	76
	REFERÊNCIAS.....	76
	CAPÍTULO II .....	84
	Ultraestrutura da casca do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com dietas contendo metais-aminoácidos a base de zinco, manganês, cobre e ferro .....	84
	RESUMO .....	85
	ABSTRACT.....	86
	INTRODUÇÃO .....	87
	MATERIAIS E MÉTODOS .....	88
	RESULTADOS .....	93
	DISCUSSÃO.....	99
	CONCLUSÃO .....	101
	REFERÊNCIAS .....	101

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de ovos, sendo produzidos no ano de 2019 cerca de 49 bilhões de unidades, onde a maior parte dessa produção (99,59%) foi destinada ao mercado interno e uma pequena fração (0,41%) destinada às exportações. Em 2020, verificou-se uma produção de 53 bilhões de unidades, elevando o consumo per capita de ovos no Brasil para 251 ovos, superando em 8,5% o consumo de 2019 (ABPA, 2021).

O aumento na capacidade produtiva, observado dentro da avicultura de postura, é o resultado de trabalhos conjuntos que envolvem melhoramento genético, aperfeiçoamento da nutrição e melhorias das técnicas de manejo e ambiência. Dentro da nutrição, todos os nutrientes que compõem a ração das aves exercem fundamental importância, os quais serão responsáveis por garantir o fornecimento de substratos necessários para crescimento, produção e manutenção dos animais e, dentre esses nutrientes, destacam-se os minerais.

Os minerais são constituintes inorgânicos do corpo dos animais, os quais representam cerca de 3 a 4% do peso vivo das aves e atuam desempenhando diversas funções no organismo animal, que variam desde a função estrutural até outras mais específicas, como catalizadores em sistemas enzimáticos e regulação da replicação e diferenciação celular (SUTTLE, 2010a).

Podem ser classificados de acordo com suas quantidades empregadas na dieta e suas concentrações nos tecidos, sendo classificados como: macrominerais, quando requeridos em concentrações relativamente grandes (> 100 ppm), como o cálcio, potássio, sódio, fósforo e magnésio. E microminerais, quando requeridos pelo organismo em concentrações muito pequenas, muitas vezes são suplementados em concentrações abaixo de 100ppm e até mesmo em ppb, entrando nessa classificação elementos como o cobalto, cromo, iodo, molibdênio, zinco, manganês, cobre e ferro (MCDOWELL, 1992).

Habitualmente, sais minerais inorgânicos (óxidos, cloretos, carbonatos e fosfatos) são utilizados nas dietas comerciais avícolas para fornecer os níveis de minerais que satisfaçam as necessidades das aves (SIRRI *et al.*, 2016). Entretanto, essas fontes, ao alcançarem o trato gastrointestinal, precisam ser inicialmente solubilizadas para que liberem íons metálicos que ficarão disponíveis para absorção; porém, na forma iônica, os minerais podem se complexar com outros componentes da dieta, como, por exemplo, com ácido fítico, levando à formação de precipitados que dificultam a absorção ou os tornam indisponíveis para os animais (ARAÚJO *et al.*, 2008; VIEIRA, 2008).

Associado a isso, as indústrias, como forma de garantir o atendimento das necessidades minerais, acabam suplementando as dietas com níveis acima das necessidades das aves, níveis

estes que podem chegar a 10 vezes mais minerais do que os requeridos pelos animais (INAL *et al.*, 2001), sendo todo o excesso excretado no meio ambiente, sem contar que o excesso de microminerais pode acarretar em toxidez, que resulta em redução no consumo de ração, lesões pancreáticas e de moela, e na atividade enzimática do fígado, pâncreas e sangue (WIGHT *et al.*, 1986).

Nesse contexto, novas tecnologias no âmbito da nutrição animal foram desenvolvidas, levando à criação de moléculas orgânicas ligadas a íons metálicos, as quais são habitualmente denominadas de minerais “orgânicos”. São uma fonte mineral apontada como de alta estabilidade química ao alcançarem o trato gastrointestinal, que apresentam baixa capacidade de interação com outros componentes da dieta, e, a partir disso, garantem uma maior disponibilidade de minerais quando comparados às fontes de sais inorgânicos comumente utilizadas (FAVERO *et al.*, 2013; STEFANELLO *et al.*, 2014). Entre os fatores que proporcionam maior capacidade de aproveitamento das fontes orgânicas destaca-se a de serem absorvidas pelos sítios de absorção das moléculas que encontram-se ligados (peptídeos/aminoácidos) (GAO *et al.*, 2014); desse modo, não necessitam de carreadores específicos para que os minerais sejam absorvidos pelo enterócito.

Por apresentarem maior biodisponibilidade em relação aos sais inorgânicos, podem suprir a necessidade das aves a partir de níveis mais baixos de suplementação e, conseqüentemente, reduzir a quantidade de elementos excretados (NOLLET *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2016a). Embora, uma ampla variedade de fatores possa interferir no aproveitamento dos minerais presente na dieta, melhorar a disponibilidade das fontes parece ser uma estratégia promissora para garantir um melhor desempenho das aves, qualidade dos ovos e conseqüentemente reduzir a poluição ambiental.

Sendo assim, esta revisão tem como objetivo apresentar os efeitos das fontes minerais orgânicas sobre o desempenho produtivo, qualidade dos ovos, óssea, e retenção mineral nos órgãos e tecidos de galinhas de postura comercial.

## **2. FONTES MINERAIS**

Com o passar dos anos, o sistema de produção intensiva, caracterizado pela criação confinada de animais com alta capacidade produtiva, levou à necessidade da suplementação de alguns nutrientes na dieta, em particular dos minerais, que, apesar de serem constituintes dos ingredientes comumente utilizados nas rações (ex. milho e farelo de soja) suas concentrações não são suficientes para atender os requerimentos de aves de alta produção (INAL *et al.*, 2001).

Desse modo, as fontes minerais passaram a ser suplementadas nas rações com objetivo de corrigir problemas ósseos e de desempenho produtivo (ARAÚJO *et al.*, 2008). Sendo os primeiros estudos com aves desenvolvidos na década de 20 por Kennard *et al.* (1922), no qual demonstraram a essencialidade da suplementação mineral para garantir o perfeito desenvolvimento e produtividade das aves.

Historicamente, o sistema de produção avícola utiliza como principal fonte mineral sais inorgânicos que apresentam baixo custo e são de fácil aquisição no mercado. Os sais inorgânicos não são frequentemente submetidos a avaliações técnicas que garantam sua qualidade, e como são produtos derivados da indústria siderúrgica podem trazer consigo altos níveis de contaminantes, tais como: cádmio (Cd), flúor (F) e chumbo (Pb) que, conseqüentemente, serão incorporados às rações (VIEIRA, 2008). Com isso, a Comissão da Comunidade Europeia (CEC, 2000) impôs, por meio do documento *White Paper on Food Safety*, regulamentações que visam, entre outros fatores, a rastreabilidade dos produtos destinados tanto para alimentação humana como para a animal, o qual apresenta limitações com relação aos metais pesados e outros contaminantes presentes nos ingredientes destinados às rações.

Apesar das regulamentações para utilização de suplementos destinados à alimentação animal, ainda se verificam altas concentrações de metais pesados nos dejetos de diferentes espécies de animais, que são atribuídos ao uso dos aditivos nas rações, sendo observado com maior frequência os elementos: Níquel (Ni), Cromo (Cr), Chumbo (Pb) e Mercúrio (Hg) em concentrações que variam, respectivamente, entre 4 a 83,9 mg/kg/MS (Ni), 2 a 46 mg/kg/MS (Cr), 3 a 20 mg/kg/MS (Pb) e 771 a 788,3 mg/kg/MS (Hg) para diferentes espécies animais (vacas, suínos, aves e búfalos) em diferentes países do mundo (Holanda, Inglaterra, País de Gales, Paquistão e China) (HEJNA *et al.*, 2018).

Uma das principais características desejáveis de uma fonte mineral é a sua biodisponibilidade, definida como: fração ingerida que tem o potencial de suprir demandas fisiológicas em tecidos-alvo. Sendo essa característica influenciada por alguns fatores, que de com Cozzolino (1997) são: **Especiação** – Forma química em que o mineral encontra-se no alimento ou na dieta, importante para determinar seu aproveitamento pelo organismo; **Ligação molecular** – Dependendo da estrutura atômica, ou seja, dos tipos de ligações (covalente, iônica, pontes de hidrogênio, etc.) poderemos ter solubilidades diferentes em água, meio ácido ou básico, influenciando diretamente a biodisponibilidade; **Quantidade ingerida** – O organismo tenta manter sua homeostase e geralmente absorve mais quando suas reservas estão diminuídas e menos em condições adequadas ou de excesso; entretanto, a quantidade excessiva de um

determinado nutriente poderá interferir no aproveitamento de outro; **Matrix alimentar** – Pode conter compostos que impedem a absorção dos minerais; entre esses compostos destaca-se o ácido fítico que pode se ligar ao ferro, zinco, cálcio e magnésio, ocasionando a formação de precipitados que tornam os minerais indisponíveis para absorção; **Atenuadores da absorção e bioconversão** – As dietas podem apresentar ligantes antagônicos (fitatos, taninos e oxalatos) ou facilitadores (ácidos orgânicos e aminoácidos) que poderão influenciar a absorção e bioconversão para forma ativa ou forma funcional do elemento; **Fatores relacionados ao indivíduo** – Correspondem ao sexo, idade e etapa de desenvolvimento fisiológico. Nesse contexto, indivíduos em desenvolvimento necessitam de maiores quantidades de minerais para seu crescimento, sendo assim, aumentam a capacidade de absorção e utilização, o mesmo acontece com indivíduos em produção. Porém, não se observa o mesmo comportamento em indivíduos idosos, os quais podem apresentar deficiência na secreção ácido clorídrico (HCl) importante para manutenção do pH estomacal e solubilização dos minerais; **Interações entre minerais** - Podem ser diretas, ocorrendo quando diferentes minerais competem pelo mesmo sítio de absorção por possuírem propriedades químicas semelhantes, desse modo o excesso de um prejudicará a utilização de outro (ex. excesso de Fe, interferindo na absorção de Zn.) e indireta, ocorrendo quando um mineral está envolvido no metabolismo de outro, ou quando a deficiência ou toxicidade de um dos minerais afeta o metabolismo de outro mineral (COUZY *et al.*, 1993), um exemplo dessa interação pode ser observada entre o selênio (Se) e o iodo (I), em que o selênio é importante para ativação da enzima deiodinase, necessária para conversão do hormônio T4 em T3.

Os principais sais inorgânicos utilizados nas rações das aves como fonte de Zn, Mn e Cu são os sulfatos ( $ZnSO_4$ ,  $MnSO_4$  e  $CuSO_4$ ) e os óxidos ( $ZnO$ ,  $MnO$  e  $CuO$ ), sendo aqueles os que apresentam uma das maiores biodisponibilidade entre as fontes de sais inorgânicos (MILES; HENRY, 2006). Até o ano de 2000, altas concentrações de microminerais foram empregadas nas dietas, sendo que os fatores que levavam a essa prática foram a garantia do atendimento nutricional dos animais, associado ao custo relativamente baixo com a suplementação (menos de 0,2% do custo total da ração) e a consideração usual de que ‘quanto mais minerais, melhor’ (NYS *et al.*, 2018).

Mohanna e Nys (1998) estimaram que, da quantidade de Zn, Mn, Cu e Fe fornecido acima das necessidades das aves (frangos de corte 0 a 40 dias), uma pequena proporção era retida (6, 10, 0,2 e 6%, respectivamente para Zn, Fe, Mn e Cu), e cerca de 90 a 99 acabam sendo excretados. Somados a esse quantitativo encontram-se também as frações endógenas ou seja, a fração que é “originado dentro corpo” (ex. secreção pancreática e secreção biliar), frações essas

de difícil determinação, pois não se consegue separar a fração de minerais dietéticos não absorvidos da fração endógena (MILLER, 1975).

Considerando as altas concentrações utilizadas nas rações, a União Europeia limitou a concentração máxima de Zn nas rações em 120 mg/kg (EU, 2016/1095) e solicitou ao Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) um parecer (EFSA; j.efsa.2016.4563) no qual determina a concentração máxima de Cu em rações completas para aves em 25 mg/kg, e de Mn em 150 mg/kg (EFSA;j.efsa.2013;11(10):3435).

Diante do exposto, o que se observa é uma busca pela harmonização entre níveis de suplementação ideais que proporcionem desempenho produtivos satisfatórios com impactos ambientais mínimos. Sendo assim, a melhoria da capacidade de utilização das fontes minerais é uma das medidas mais eficazes para se garantir uma menor poluição ambiental, saúde dos animais (WANG *et al.*, 2019a) e, conseqüentemente, maior eficiência produtiva.

A utilização de fontes minerais ligadas a moléculas orgânicas, comumente denominados de minerais ‘orgânicos’, é uma das estratégias promissora dentro da nutrição animal que vem sendo estudada para compor as dietas das aves e outras espécies de animais. Embora íons metálicos ligados a moléculas orgânicas venham sendo estudadas com maior frequência nos últimos anos, essas não são fontes ‘novas’.

No final do século XVII, muitos conceitos da química de quelação estavam evoluindo. Desse modo, os químicos começaram a entender que certos átomos poderiam existir em mais de um estado de valência, porém não compreendiam como átomos com mais de uma valência poderiam formar um composto com alta estabilidade. Alfred Werner, um químico alemão, foi o primeiro a propor uma estrutura molecular inteiramente nova para descrever essas moléculas de alta estabilidade. Ele observou que certas estruturas, as quais chamou de “complexos”, permaneciam intactas após passar por uma série de transformações químicas. Em 1920, o termo “quelato” foi usado por dois pesquisadores, Morgan e Drew, para descrever a estrutura molecular descoberta por Alfred Werner. A palavra quelato vem do grego “chele” que significa garra. Desse modo, como o ligante (garra) segurava o íon metálico, o mineral não ficava mais livre para participar de outras reações. Apesar do conhecimento sobre os efeitos da quelação na estabilidade do íon metálico, foi apenas nos anos 60 que se pensou na utilização da molécula para fins nutricionais, onde já se tinha a ideia de que, se um íon de metal pudesse ser quelado antes de ser fornecido ao animal, a molécula formada evitaria reações que pudessem levar a inibição da absorção, que conseqüentemente levariam a uma maior absorção dos íons metálicos. Essa teoria impulsionou novos estudos, levando à criação de escolas pioneiras, uma das quais (Albion Laboratories, Inc.) propôs que os quelatos de aminoácidos seriam os mais adequados



para aumentar a absorção intestinal, os quais passariam a ser chamados de proteínatos metálicos em vez de quelatos. Porém, uma definição oficial só foi criada em 1970, em que a Albion Laboratórios, Inc. solicitou a American Association of Feed Control Officials (AAFCO), órgão que define as normas e padrões dos alimentos destinados a produção animal, uma definição que descrevesse de forma precisa um quelato de aminoácido. Este foi definido como produto resultante da reação de um íon metálico com aminoácidos em uma razão molar de um mol de metal para um a três, preferencialmente dois, mols de aminoácidos, para formar ligações covalentes coordenadas. Para isso, o peso médio dos aminoácidos hidrolisados deve ser de aproximadamente 150 daltons e o peso molecular do quelato formado não deve exceder 800 (ASHMEAD, 1992).

Além do quelato de aminoácidos, outras moléculas foram desenvolvidas ao longo dos anos e receberam as seguintes definições de acordo com a AAFCO:

**Complexo metal aminoácido** – Produto resultante da complexação de sal de metal solúvel com um aminoácido (ex. complexo de aminoácidos de Cu ou Zn);

**Complexo metal aminoácido específico** – Produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico (ex. Zn-metionina, Cu-lisina);

**Metal proteínatos** – Produto resultante da quelação entre um sal solúvel com aminoácidos ou proteínas parcialmente hidrolisadas (ex. proteínato de Mn, proteínato de Fe);

**Complexo metal polissacarídeo** – Produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com uma solução de polissacarídeos (ex. complexo de polissacarídeo de Zn, Mn ou Co).

Os principais minerais utilizados na alimentação animal complexados a moléculas orgânicas são o Se, Co, Zn, Cu, Fe e Mn. O selênio compartilha propriedades químicas e físicas com enxofre, essa similaridade permite que o Se substitua o enxofre (S), promovendo interações Se-S nos sistemas biológicos (FARINA, 2000); os demais elementos são classificados como minerais de transição, os quais apresentam características química intermediárias entre metal e elementos não metálicos. Tais elementos possibilitam a formação de ligações covalentes coordenadas com aminoácidos e peptídeos, proporcionando a capacidade única de formar complexos biologicamente estáveis (CFNP, 2002; RUTZ; MURPHY, 2009).

A formação de moléculas estáveis proporcionam ao mineral resistir a dissociação no trato digestivo superior (inglúvio, proventrículo e moela), permitindo que o mineral chegue ao epitélio absorptivo intestinal, sendo assim, evitam a perda por antagonistas (RUTZ; MURPHY, 2009) e proporcionam uma maior disponibilidade das fontes quando comparado aos sais inorgânicos (FAVERO *et al.*, 2013).

### 3. DIGESTÃO E METABOLISMOS DOS MICROMINERAIS

#### 3.1 Fontes convencionais

Após a ingestão dos sais minerais inorgânicos, o estômago das aves e de outras espécies de animais desempenham papel fundamental na preparação dos íons metálicos para absorção, o qual, devido ao seu baixo pH (2,5 - 4,8), promove a solubilização e liberação dos íons metálicos que posteriormente poderão ser absorvidos. O processo digestivo atua alterando as formas em que os minerais serão absorvidos, ou seja, eles não são decompostos em formas metabolizáveis da mesma maneira que os componentes orgânicos da dieta (SUTTLE, 2010), tais como as proteínas e os carboidratos que serão decompostos em aminoácidos e monossacarídeos, as fontes minerais após serem solubilizados e dissociações darão origem a íons metálicos solúveis que poderão ser absorvidos no trato digestório inferior.

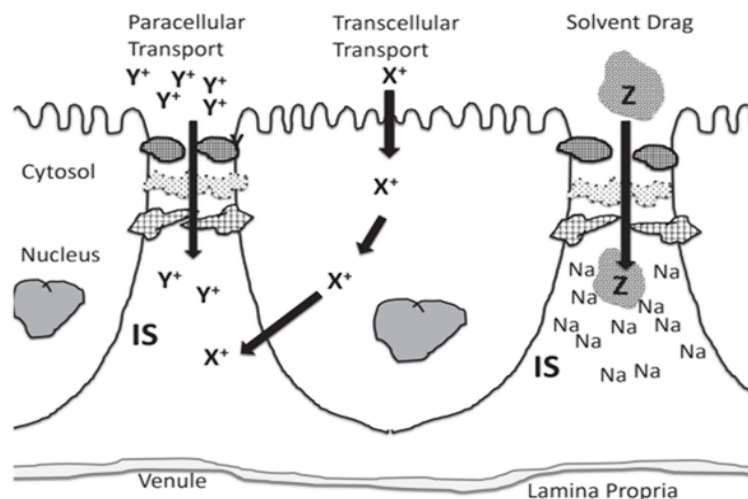
Os metais ingeridos podem ser divididos em duas categorias gerais, sendo estas: os solúveis em uma ampla faixa de pH no trato gastrointestinal, tais como Na, Mg e Ca, e os susceptíveis a hidroxipolimerização como o Al, Cu, Fe, Mn e Zn. Esta última categoria apresenta alta solubilidade em meio ácido (ex. acidez do estômago dos monogástricos), porém, devido à alcalinização, ou seja, aumento do pH ao longo do trato digestório, as moléculas de água, as quais os elementos encontram-se ligados, perdem rapidamente seus prótons para formar compostos hidroximetálicos. Conforme a solução ácida se aproxima do pH neutro, outros prótons acabam sendo liberados pelas moléculas de água que estão dispostas ao redor do metal numa tentativa de manter o equilíbrio. Sendo assim, pode ocorrer a polimerização dos hidróxi-metais, levando à precipitação que os tornam indisponíveis para absorção (POWELL *et al.*, 1999; SCOTTÁ *et al.*, 2014).

Durante o processo digestivo, os nutrientes presentes no lúmen e os minerais são direcionados às vilosidades do intestino delgado. Entretanto, antes da absorção propriamente dita, os íons metálicos precisarão ultrapassar uma camada de água com características não homogêneas, medindo aproximadamente 600 µm de espessura e uma outra camada de muco, medindo 50-100 µm de espessura antes de chegar à membrana do enterócito, onde ocorrerá a absorção. A camada de muco, produzido e secretado pelas células caliciformes presentes na mucosa, é composto por glicoproteínas (mucina) com alto peso molecular (20 milhões de Daltons). A mucina apresenta alta densidade de grupos sulfatos e grupos carboxilatos, que proporcionam natureza negativa a mucosa. Deste modo, a camada da mucosa apresenta alta afinidade e capacidade de se ligar a íons (cátions) trivalentes, divalentes e monovalentes, apresentando o seguinte padrão de afinidade:  $M^{3+} > M^{2+} > M^{+}$ . Desse modo, a capacidade dos

íons metálicos passarem as camadas da mucosa para serem absorvidos dependerá de sua mobilidade através das camadas (RUTZ; MURPHY, 2009).

Além disso, o grau de absorção será dependente da capacidade do elemento de se ligar com agentes quelantes que facilitem o trânsito no lúmen intestinal, impedindo a formação de compostos insolúveis entre os componentes da dieta e os do ambiente intestinal (ASHMEAD, 1992). Sendo assim, durante o processo de absorção, os minerais poderão sofrer interferências, como a ação de antagonismos mútuos, que podem atuar reduzindo a taxa de absorção e metabolismo de alguns minerais (VIEIRA, 2008).

Os minerais podem ser absorvidos de qualquer parte do trato gastrointestinal, entretanto, a maior parte da absorção da maioria dos minerais ocorre no intestino delgado, na porção entre o duodeno distal e o íleo, a qual pode ocorrer por transporte ativo transcelular ou passivo paracelular (SEVERO *et al.*, 2015), conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Representação dos processos de absorção paracelular e transcelular. Adaptado: Goff (2017).

O processo de absorção paracelular (Figura 1) é mais provável de ocorrer em dietas que apresentam uma alta concentração de minerais. Nesse processo, os minerais se difundem pelas junções entre as células devido a diferença de potencial elétrico entre o lúmen intestinal (negativo) e o espaço intersticial (positivo), que oferece resistência a absorção de cátions (íons de carga positiva) através das junções, porém fornece uma força que promove a absorção de ânions (íons de carga negativa) através das junções. Essa resistência pode ser superada se as concentrações de minerais, na forma ionizada e dissolvido no fluido luminal ultrapassarem as concentrações ionizadas dos minerais contidos nos fluidos extracelulares dentro do espaço intersticial do outro da junção estreita. Um mineral ionizado é aquele que se encontra num estado em que não está ligado a proteínas ou outras substâncias grandes e está em solução. A

força gerada pela diferença nas concentrações de minerais ionizados em cada lado da junção estreita torna-se grande o suficiente para empurrar o mineral através da junção para o espaço intersticial, e a partir daí passar pelas aberturas do endotélio dos capilares e chegar ao sangue. A absorção paracelular não é saturável, desse modo, tem uma capacidade ilimitada de transportar minerais para o sangue, torna-se dependente apenas do gradiente eletroquímico desenvolvido pela concentração de minerais ionizados e em solução no lado luminal das junções estreitas (GOFF, 2017). O mecanismo de absorção intestinal transcelular dos metais envolve três etapas: captação do íon metálico pela membrana apical, passagem pela célula e transferência para membrana basolateral (LI *et al.*, 2013).

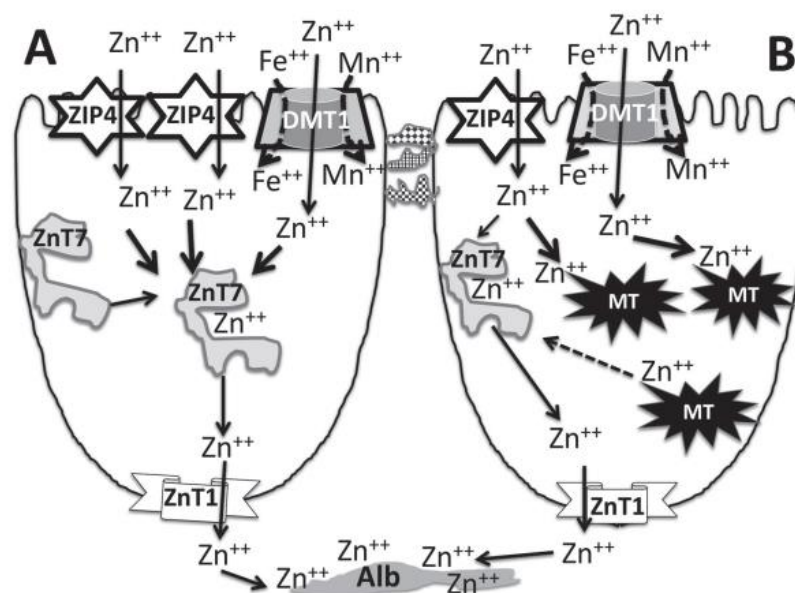
A absorção transcelular permite a captação eficiente de muitos minerais solúveis, mesmo quando suas concentrações dietéticas encontram-se muito baixas. Para que a primeira etapa do processo de absorção transcelular ocorra, as células intestinais fazem uso de canais iônicos (transportadores) (POWELL *et al.*, 1999). Os transportadores são proteínas especializadas da membrana celular que facilitam a difusão do mineral, os quais ligam-se ao mineral apenas se eles estiverem na forma ionizada, e em sua maior parte, os transportadores ligam-se ao mineral apenas se ele tiver certa valência ou carga. Em alguns casos, as proteínas de transporte permitem a passagem do mineral pela membrana apical apenas se o organismo estiver precisando de um determinado mineral específico. Na segunda etapa do processo, o mineral deve-se mover da membrana apical para a membrana basolateral de célula por meio do citosol. Para que isso seja possível, proteínas especializadas (chaperones) desempenham essa função, estas ligam-se ao mineral para que não existam minerais ionizados livres dentro do citosol, o qual poderia afetar a função celular. Na última etapa do processo absorptivo transcelular, o mineral deve ser movido do citosol da célula epitelial através da membrana basolateral para o espaço intersticial abaixo das junções estreitas. É um processo que envolve mover o mineral de uma área de baixa concentração (interior da célula) para outra área com alta concentração (fluido extra celular). O processo de absorção transcelular apresenta especificidades para os diferentes tipos de minerais; além disso, é um mecanismo saturável, ou seja, podem transportar uma quantidade limitada de minerais. Este é um mecanismo no qual diferentes minerais podem competir pelo mesmo transportador (GOFF, 2017).

Como relatado, os diferentes minerais apresentam particularidades nos mecanismos de transporte, sendo assim, a seguir, será dada atenção ao processo de absorção dos microminerais (Zinco, Manganês, Cobre e Ferro) e seus destinos metabólicos após o processo absorptivo.

### 3.1.2 Zinco

No processo de absorção do  $Zn^{2+}$  (Figura 2), duas famílias de proteínas transportadoras estão envolvidas. A primeira são os transportadores ZnT, que atuam reduzindo os níveis intracelulares de zinco, transportando o Zn do citoplasma para o espaço extracelular. Já a segunda é a dos transportadores ZIP, os quais são responsáveis por levar o metal do espaço extracelular ou lúmen para o citoplasma. Essas proteínas encontram-se distribuídas em vários tecidos do corpo; entretanto, suas concentrações e expressões gênicas variam entre os diferentes tecidos (LICHTEN; COUSINS, 2009).

No intestino delgado, as proteínas responsáveis pela captação na membrana apical e transporte do  $Zn^{2+}$  pela célula até a corrente sanguínea são a ZIP4, Znt1 e a Znt7. Na membrana apical do enterócito, o zinco é movido através da membrana pelo ZIP4, embora possa ser captado por outra proteína de transporte de metal divalente (DMT1). No entanto, é um mecanismo de transporte comum a outros elementos minerais, tais como o Fe e Mn, demonstrando, com isso, um mecanismo de competição dos metais pelo mesmo sítio de absorção. Dentro do enterócito, a proteína transportadora ZnT7, captura o  $Zn^{2+}$  que cruzou a membrana apical e o transporta até a membrana basolateral, onde transfere o  $Zn^{2+}$  para o transportador intestinal ZnT1, o qual moverá o  $Zn^{2+}$  para o fluido intersticial. Na circulação portal, a albumina e a transferrina são as proteínas responsáveis por carregar o  $Zn^{2+}$  para o fígado, onde será liberado na circulação sistêmica e redistribuído para os outros tecidos (GOFF, 2017; OLIVEIRA, 2019).



**Figura 2.** Mecanismo de absorção transcelular de zinco pelo enterócito. Adaptado: Goff (2017).

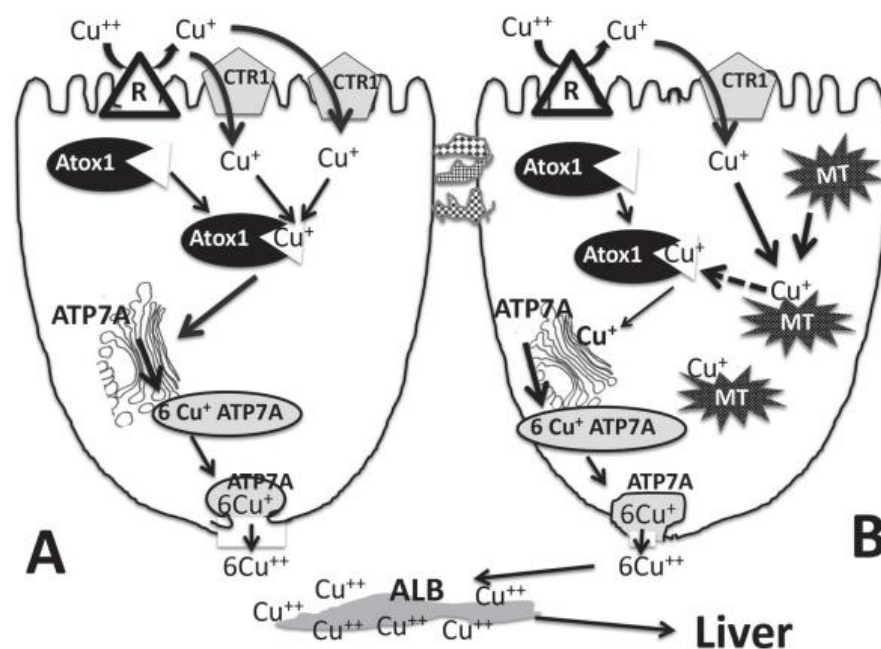
Quando a quantidade de Zn no corpo atinge níveis suficientes, a quantidade de ZIP4 sintetizada pela membrana apical da célula é reduzida. Associado a isso, os enterócitos começam a sintetizar uma maior quantidade de metalotioneína (MT), o qual se ligará a todo  $Zn^{2+}$  adicional que atravesse a membrana apical. A MT funciona como um reservatório de zinco (BREMNER; BEATTIE, 1990) que será mobilizado durante a necessidade metabólica. Entretanto, todo o Zn armazenado na MT acaba sendo excretado nas fezes devido à morte das células intestinais (turnover celular) (GOFF, 2017).

Parte do Zn que escapa da absorção no intestino delgado pode ser absorvido pelo cólon. Embora ainda não se tenha o conhecimento do mecanismo de absorção, sabe-se que o cólon tem o potencial de absorver parte do Zn que chega ao intestino grosso. Gopalsamy *et al.* (2015), em sua revisão intitulada *The Relevance of the Colon to Zinc nutrition*, relata que o cólon pode apresentar uma absorção significativa de Zn, pois estudos anteriores demonstraram que ratos submetidos a cecocolectomia apresentavam menores concentrações de Zn sérico, levando à ideia de que o cólon poderia compensar a absorção de Zn em outras regiões do intestino. Além disso, substratos fermentáveis (fibra dietética, amido resistente, pentosanas e frutanos) por bactérias colônias produziram ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) que atuam como fonte de energia para os colonócitos, favorecendo sua multiplicação e diferenciação. Estes ácidos, também, poderiam promover o maior fluxo sanguíneo cecal e aumentar a solubilidade do cátion por meio da redução do pH. De acordo com os revisores, os achados não esclarecem o mecanismo ou a cinética de absorção de Zn pelo cólon, porém, revelam evidências de que as condições luminiais do cólon podem aumentar a retenção de Zn.

### 3.1.3 Cobre

O cobre na dieta geralmente encontra-se na forma cúprica ( $Cu^{2+}$ ), porém apenas a forma cuprosa ( $Cu^+$ ) pode ser transportada pela membrana apical (Figura 3). Sendo assim o  $Cu^{2+}$  solúvel nos fluidos que recobrem o epitélio duodenal acaba sendo reduzido pelas metaloredutases de Cu da borda em escova a  $Cu^+$ . Após ser reduzido, o  $Cu^+$  liga-se a uma proteína de transporte específica de alta afinidade (CTR1) para atravessar a membrana apical e entra no enterócito. Além da CTR1, o cobre pode ser transportado por intermédio da membrana pela proteína de transporte divalente DMT1, também envolvida no transporte de Fe, Zn e Mn. Todo cobre que atravessa a membrana apical do enterócito será direcionado para ser utilizado de diferentes formas dentro do próprio enterócito. Em último caso, o cobre será movido para fora do epitélio, de forma que as células de outros tecidos do corpo possam utilizá-lo. Para que isso seja possível, uma proteína específica para o Cu conhecida como Atox1 liga-se ao  $Cu^+$  e o

transporta para o aparelho de Golgi da célula. No aparelho de Golgi, o  $\text{Cu}^+$  é transferido para outra proteína, ATP7A (localizada na membrana de Golgi), a qual é capaz de se ligar a seis íons de  $\text{Cu}^+$ . Com o transporte dos íons de Cu para a proteína ATP7A, um complexo é formado ( $6\text{Cu}^+-\text{ATP7A}$ ) e incorporado à membrana de uma vesícula de transporte de Golgi, que será translocado para membrana basolateral. Após isso, a membrana da vesícula se fundirá com a membrana basolateral, e o ATP7A utilizará uma molécula de ATP para liberar  $\text{Cu}^+$  para os fluidos extracelulares. O ATP7A possui uma redutase que converterá o  $\text{Cu}^+$  em  $\text{Cu}^{2+}$  antes de ser liberado no espaço intersticial para só então se ligar a albumina e ser transportado para outros tecidos, onde serão utilizados ou armazenados (GOFF, 2017).



**Figura 3.** Mecanismo de absorção transcelular cobre pelo enterócito. Adaptado: Goff (2017)

### 3.1.4 Manganês

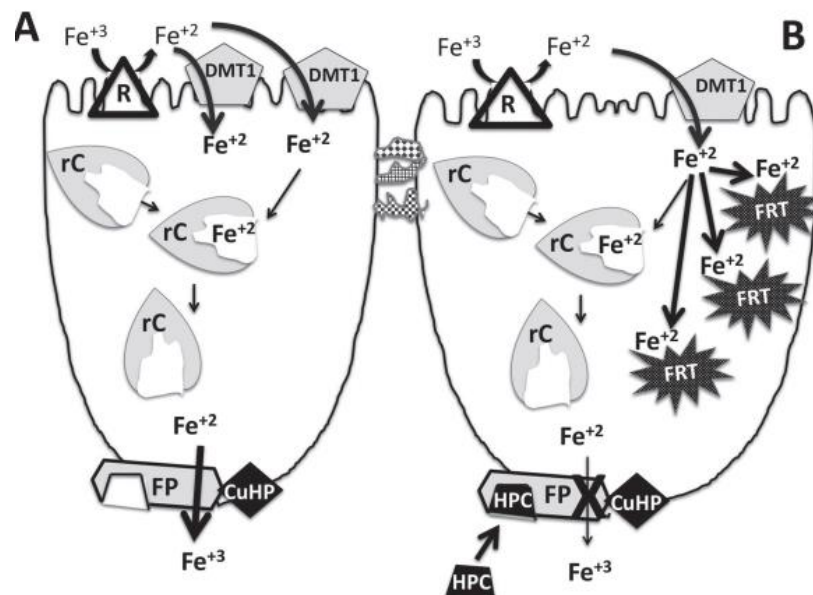
O processo de absorção do manganês pode ocorrer por difusão paracelular, quando as dietas apresentam altas concentrações deste elemento, ou por via transcelular. Na absorção transcelular, o principal carreador envolvido na captação apical do manganês dietético ( $\text{Mn}^{2+}$ ) parece ser a DMT1, já que altas doses de Mn na dieta provocam a deficiência de Fe, o qual utiliza o mesmo carreador de metal divalente para atravessar a membrana apical do enterócito (GOFF, 2017). Além do DMT1 outros transportadores comuns a outros elementos podem estar envolvidos no processo de absorção de Mn. O ZnT10, ZIP8 e o ZIP14 demonstram afinidades pelo  $\text{Mn}^{2+}$  e podem estar envolvidos na captação de manganês luminal e basolateral, respectivamente (PAULUS, 2015; SCHEIBER *et al.*, 2019). O mecanismo de transporte da

membrana apical até a basolateral no interior da célula ainda não está bem definido; no entanto, sabe-se que existem “chaperones” responsáveis por esse processo. O Mn absorvido e liberado na corrente sanguínea pode ser encontrado no plasma como íon livre, mas a maior parte encontra-se ligado à  $\alpha 2$ -macroglobulina e à albumina, que serão direcionados aos tecidos.

No corpo, os principais tecidos responsáveis pelo armazenamento de Mn são os hepáticos e os ósseos. O controle homeostático do Mn é regulado pela excreção biliar e em menor grau pela excreção pancreática. O manganês absorvido em quantidades excessivas é captado pelos hepatócitos e eliminado pela bile e, conseqüentemente, excretado pelas fezes (GOFF, 2017).

### 3.1.5 Ferro

O ferro dietético geralmente encontra-se na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que é pouco absorvido pelo trato intestinal. Desse modo, o  $\text{Fe}^{3+}$  precisa ser reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  antes de ser captado pelo enterócito, conforme ilustrado na Figura 4. Em animais monogástricos, uma enzima da borda em escova (redutase citocromo b duodenal - Dcytb) atua reduzindo o  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  (GROTTO, 2010; GOFF, 2017).



**Figura 4.** Mecanismo de absorção transcelular do Fe no enterócito. Adaptado: Goff (2017).

Após a conversão, o  $\text{Fe}^{2+}$  se liga à proteína transportadora de metal divalente (DMT1) dentro da borda em escova do enterócito e é transportado para dentro da célula. Após a entrada na célula, o  $\text{Fe}^{2+}$  é ligado a proteínas chaperonas específicas como a rC (*Poly (rC) binding protein-1*), importante para a exportação de  $\text{Fe}^{2+}$  da célula para a membrana basolateral e através



da Cu-hephaestina (CuHP) (ferroxidase contendo Cu) é convertido a  $\text{Fe}^{3+}$ . Após a conversão, o  $\text{Fe}^{3+}$  é captado pela ferroportina e transportado para o fluido intersticial. Na corrente sanguínea, o  $\text{Fe}^{3+}$  liga-se à transferrina para ser transportada do sangue para os tecidos do corpo, mas especificamente os envolvidos na hematopoiese. O controle da homeostase de ferro no organismo é dado por um mecanismo que envolve a ferritina, ferroportina e hepcidina. Quando os estoques de Fe atingem níveis adequados, a quantidade de DMT1 é reduzida. Os enterócitos passam a produzir ferritina, uma proteína que se liga a maior parte do  $\text{Fe}^{2+}$  que atravessa a membrana do apical do enterócito. Após isso, a hepcidina (hormônio produzido pelo fígado) se liga a ferroportina, bloqueando sua capacidade de transportar Fe para fora da célula (GOFF, 2017).

### 3.2 Complexos minerais

Os complexos minerais apresentam uma formação molecular que os permitem resistir aos processos digestivos, fazendo com que a molécula seja absorvida intacta sem que seja necessário a hidrólise luminal (ASHMEAD, 1991).

Quando a molécula de metal aminoácido é absorvido intacto pelas células da mucosa, acredita-se que uma ligação seja formada entre o aminoácido da molécula com a porção gama-glutamil da glutatona (tripeptídeo encontrado na membrana celular da mucosa). Após a formação da molécula, uma quebra enzimática desta ocorreria, resultando no transporte ativo do complexo metal aminoácido do lado luminal da mucosa para o citoplasma da célula. Depois de atravessar a membrana celular da mucosa o complexo metal aminoácido poderia migrar para a membrana basal e de lá diretamente para o plasma, sem a necessidade de um transportador intracelular. Acredita-se que a separação real do metal dos seus ligantes (aminoácidos) ocorra nos locais de uso, o que pode ser devido à ação conjunta entre ação enzimática com diferentes pH nos diferentes sítios específicos que podem diminuir as constantes de estabilidade da molécula e liberar o cátion para um ligante citoplasmático com uma maior constante de estabilidade (ASHMEAD, 1991).

Estudos desenvolvidos *in vitro* com utilização de células epiteliais intestinais (IEC) e células epiteliais intestinais derivadas de adenocarcinoma do cólon (Caco-2) comprovaram que os metais, quando ligados a aminoácidos (AA), fazem uso dos seus respectivos transportadores (GAO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015), garantindo a absorção do elemento, mesmo na presença de antagonistas, além de que é provável que a regulação homeostática das concentrações dos elementos minerais ligados a AA não seja regulada pelos transportadores de

AA, tendo em vista que são encontrados em grande quantidade e não são facilmente saturáveis, levando à possibilidade de aumento das concentrações dos minerais a partir destas fontes (SAUER *et al.*, 2017).

#### **4. COMPLEXOS MINERAIS NA NUTRIÇÃO DE POEDEIRAS**

Ao longo dos anos, a seleção genética evoluiu em busca do aperfeiçoamento de diversas características nas galinhas de postura comercial. Entre estas, se destacam a criação de uma ave capaz de produzir 500 ovos em um ciclo produtivo de 100 semanas, mantendo-se a persistência na postura, qualidade dos ovos e saúde das aves (BAIN; NYS, 2016). Tais objetivos só podem ser alcançados quando o melhoramento genético é acompanhada pelo avanço da nutrição adaptada às necessidades das aves modernas, visando não apenas à produção, mas os processos metabólicos, nos quais os microminerais são essenciais (PEREIRA *et al.*, 2018).

Os requerimentos minerais pelas aves são altamente dependentes do nível de produtividade e idade, sendo a produção afetada diretamente quando não ocorre suplementação (INAL *et al.*, 2001). A utilização de fontes minerais orgânicas pode ser uma estratégia dentro do sistema de produção avícola, que utiliza aves de alto potencial. Essas fontes podem atuar favorecendo o desempenho produtivo (CARVALHO *et al.*, 2016; STEFANELLO *et al.*, 2014), melhorando a qualidade dos ovos (MABE *et al.*, 2003; SALDANHA *et al.*, 2009), qualidade óssea e reduzindo a concentração de elementos minerais nas excretas (BORUTA; SWIERCZWSKA, 2007).

Devido à alta biodisponibilidade, os complexos de metais aminoácidos (Zn, Mn e Cu) podem ser utilizadas em concentrações menores quando comparado às fontes inorgânicas (sulfatos, óxidos, e carbonatos) sem causar efeitos negativos nas características de fertilidade, produção e eclodibilidade, com melhorias no peso e espessura da casca dos ovos de matrizes de frangos de corte Cobb 500 (FAVERO *et al.*, 2013).

Em aves de posturas (Hy-Line W36) em período final de produção (67 semanas de idade) a utilização de fontes de Zn, Mn e Cu orgânica (proteínatos) não proporcionaram alterações nas variáveis de desempenho produtivo, mas melhoraram a espessura da casca dos ovos e, conseqüentemente, reduzem a quantidade de ovos perdidos (STEFANELLO *et al.*, 2014). Maciel *et al.* (2010) verificaram que a suplementação de poedeiras Hisex em fase final de produção (72 as 80 semanas) a partir de fontes de Zn, Mn e Cu ligados a moléculas orgânicas, proporcionaram menor perda de ovos, maior gravidade específica e ovos mais pesados. Do mesmo modo, Paik (2001) verificou que a associação de Zn, Mn e Cu ligados a metionina

(quelato), fornecido na dieta das aves de postura das 96 às 103 semanas de idade foi capaz de aumentar a resistência da casca dos ovos. De acordo com Mabe *et al.* (2003), as propriedades mecânicas da casca dos ovos são melhoradas quando as aves são suplementadas com fontes minerais ligadas a moléculas orgânicas; no entanto, a quantidade de material depositado durante a formação da casca pode não ser alterada.

Heflin *et al.* (2018) avaliaram os efeitos não dietéticos sobre o conteúdo mineral dos ovos de diferentes linhagens (Hy-line Brow e Tetra White) e identificaram que a idade é um dos fatores que influenciam a deposição de minerais nos ovos. Essa menor deposição de minerais com o avanço da idade é justificada pela diminuição na eficiência de mobilização dos minerais pelo epitélio endometrial, que é promovido pela ocorrência de deformações histológicas (fibrose, atrofia e perda de microvilosidades) que ocorrem naturalmente com o avanço da idade (PARK; SOHN, 2018), tendo maior impacto na formação da casca dos ovos. E a partir da utilização de fontes minerais orgânicas de elementos, como Zn e Mn, pode-se retardar os efeitos da idade da aves sobre a qualidade da casca dos ovos durante a fase final de produção (SWIATKIEWICZ; KORELESKI, 2008).

Com base nos resultados obtidos com utilização dos complexos minerais sobre a qualidade da casca, novas pesquisas foram conduzidas para avaliar de forma mais específica como essas fontes minerais contribuem com a melhoria da qualidade externa da casca dos ovos. A casca do ovo é uma estrutura altamente ordenada que compreende membranas (interna e externa), camada mamilar, camada paliçada, camada de cristais vertical e cutícula, essas estruturas serão o resultado da precipitação sequencial de carbonato de cálcio e matriz orgânica durante os estágios iniciais de formação. Sendo a matriz orgânica a que desempenha papel crucial na modulação da ultraestrutura e nas propriedades mecânicas da casca (FENG *et al.*, 2020). Stefanello *et al.* (2014) verificaram que a suplementação de fonte orgânica de Zn, Mn e Cu (proteinato) para galinhas poedeiras Hy-line W36 das 47 às 62 semanas de idade, levou a modificações na ultraestrutura da casca dos ovos, sendo verificado aumento na espessura da camada paliçada e redução no número de botões mamilares. Em outro estudo, Qiu *et al.* (2019) verificaram que a suplementação das dietas de galinhas de postura (Hy-line White com 50 semanas de idade) com fontes minerais de Zn, Mn, Cu e Fe a partir de fontes minerais orgânicas (proteinato), reduzidos em 1/3 das concentrações comerciais, não alterou a espessura da camada mamilar, porém proporcionou a formação de botões mamilares menores e cascas mais resistentes.

Entre os elementos minerais suplementados nas dietas, o Mn tem sido apontado como o responsável por atuar no controle da morfologia e do crescimento dos cristais pela matriz

orgânica. O Mn atua na ativação da glicosiltransferase, enzima que contribui para formação de locais de nucleação e regula o crescimento e a orientação dos cristais de calcita durante a formação da casca do ovo (XIAO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017). Esta enzima desempenha importante papel na síntese de glicosaminoglicanos (GAGs), que são os constituintes dos proteoglicanos, os quais são encontrados nas articulações (VENKATESAN *et al.*, 2004) e na matriz orgânica da casca dos ovos, onde, atuam controlando a textura e estrutura da casca durante a deposição dos primeiros cristais de calcita (NYS *et al.*, 2004). Fontes orgânicas de manganês na dieta de galinhas postura aumentam a resistência da casca dos ovos e diminuem a largura dos botões mamilares, devido a modificação nas concentrações de GAGs na membrana da casca (ZHANG *et al.*, 2017a). Li *et al.* (2018) avaliaram o efeito da suplementação de uma fonte orgânica de manganês (Mn-Metionina) em diferentes níveis (20, 40, 60 e 80 mg/kg) para galinhas de postura comercial (Jinghong-1, com 53 semanas de idade), sendo verificado que a suplementação de manganês, a partir de Mn-metionina, na mesma concentração que a dieta-controle, a qual possuía uma concentração de 60 mg/kg, proporcionou uma melhor formação da ultraestrutura da casca e aumentou a concentração de Mn na casca (0,64 mg/kg) em três vezes mais que as observadas na gema (0,20 mg/kg) e no albúmen (0,20 mg/kg).

A modulação na formação inicial da ultraestrutura da casca, tais como o aumento da espessura da camada mamilar, organização dos cristais de calcita sobre a camada e formação de pequenos botões mamilares são fatores importantes que afetam a resistência da casca dos ovos (STEFANELLO *et al.*, 2014; QIU *et al.*, 2019). E, a partir das fontes minerais orgânicas torna-se possível modular a formação inicial das diferentes estruturas que compõem a casca dos ovos. Além de que as fontes minerais orgânicas por apresentaram maior biodisponibilidade quando comparado as fontes minerais inorgânicas, tem demonstrado ser mais eficientes para aumentar a concentração de Cu, Mn, Se e Cr no conteúdo interno dos ovos (GRAVENA *et al.*, 2011; YENICE *et al.*, 2015; BAI *et al.*, 2017).

Além das modificações nas propriedades mecânicas e ultraestruturais da casca, a utilização de fontes minerais (Zn, Mn e Cu) ligadas a moléculas orgânicas tem demonstrado atuar na manutenção da integridade óssea (NUNES *et al.*, 2013; FARIAS *et al.*, 2019) e no aumento da resistência e concentração mineral nas aves de postura durante a fase de produção (IDOWU *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2017a). A melhoria da qualidade óssea em aves de postura é uma das preocupações dentro do sistema de produção. Estima-se que 35% da mortalidade das aves ao longo do ciclo de postura seja devido à fadiga de gaiola (perda de tecido ósseo levando a fragilidade) (MCCOY *et al.*, 1996), a qual leva à fratura dos ossos das aves, sendo a fratura da quilha a mais comum de ocorrer dentro dos sistemas de criação, com uma frequência de

86,16% (THØFNER *et al.*, 2021); além disso, as fraturas ósseas comprometem o bem-estar e a produtividade da aves (SILVERSIDES *et al.*, 2006).

O osso é um tipo de tecido conjuntivo formado por uma matriz orgânica, em que os microminerais como Zn, Mn e Cu atuam como cofatores (NUNES *et al.*, 2013) de enzimas, tais como: polimerase, galactotransferase (dependentes de Mn), lisio oxidase (dependente de Cu), Colagenase e fosfatase alcalina óssea (dependentes de Zn), e uma matriz inorgânica, formada por fosfato de cálcio, os quais desempenham funções primordiais na formação do tecido ósseo (NUNES *et al.*, 2013; TORRES; KORVER, 2018). Entretanto, as aves de postura apresentam um processo contínuo de deposição e reabsorção óssea fundamental para formação da casca. Durante a perda ou reabsorção, os minerais são mobilizados de ambos os componentes ósseos (matriz orgânica e inorgânicas) (MCCOY *et al.*, 1996).

Abedini *et al.* (2018) verificaram que a suplementação de zinco-metionina (Zn-Met) fornecido nas mesmas concentrações que o sulfato de zinco (80 mg/kg), foi capaz de aumentar as concentrações de Zn na tíbia das poedeiras com 52 semanas de idade. Já Oliveira (2019) verificou que a suplementação parcial das fontes inorgânicas de Zn, Mn, e Cu por fontes orgânicas (complexo) para galinhas Lohmann Brown-Lite (30 às 50 semanas de idade) promoveram maiores valores de radiodensidade óssea e maiores valores para o índice de Seedor.

Em outro estudo, Sousa *et al.* (2017), avaliando o fornecimento de duas granulometrias de calcário (fino ou grosso) associado a fontes minerais orgânicas (Zn, Mn e Cu) ou inorgânicas, verificaram que apenas as fontes minerais orgânicas aumentaram a resistência das tíbias independente da granulometria do calcário utilizada. Min *et al.* (2019) compararam os efeitos da suplementação de uma fonte de zinco orgânica (metionina hidroxianaloga de zinco- MHA-Zn) e inorgânica (ZnSO<sub>4</sub>) em quatro níveis de suplementação (80 mg/kg (ZnSO<sub>4</sub>), 20, 40 e 80 (MHA-Zn) mg/kg) na dieta de galinhas de postura comercial (Hy-Line Gray, das 57 às 72 semanas de idade), e identificaram que a MHA-Zn aumentou a deposição de Zn na tíbia, principalmente quando fornecido no nível de 80 mg/kg, além disso, o estudo demonstrou que a concentração de Ca e a resistência da tíbia foram melhorados com a suplementação de MHA-Zn, sendo os efeitos observados atribuídos a maior capacidade de aproveitamento da fonte orgânica. Os autores concluíram que o aumento da concentração de Zn na tíbia foi capaz de melhorar a atividade da anidrase carbônica, a qual aumentou a hidrólise do ácido carbônico, levando a maior deposição de carbonato de cálcio e melhor qualidade óssea das aves.

Redução na excreção mineral e maior retenção de minerais nos órgãos foram efeitos observados com suplementação de fontes minerais ligadas a moléculas orgânicas em estudo

realizado por (MIN *et al.*, 2019). Por serem fontes de alta disponibilidade as concentrações empregadas nas rações, em comparação às fontes inorgânicas, acabam sendo reduzidas (SALDANHA, 2008).

Um estudo conduzido por Boruta *et al.* (2007), avaliando o efeito da substituição parcial (8, 17 e 33%) das fontes inorgânicas pelas fontes orgânicas (Bioplex) na dieta de poedeiras Hy-Line da 30 às 70 semanas de idade, identificou que as concentrações minerais de Zn, Mn, Cu e Fe nas excretas foram reduzidas com ambos os níveis de substituição. Já Wang *et al.* (2019b) relataram que a substituição de fontes inorgânicas de Zn ( $ZnSO_4 \cdot H_2O$ ), Mn ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ), Cu ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), Fe ( $FeSO_4 \cdot H_2O$ ) e Se (selenito de sódio) por fontes orgânicas a 62,5% das concentrações comerciais (80, 80, 10, 30 e 0,3 mg/kg, respectivamente, para Zn, Mn, Cu, Fe e Se) proporcionou maior concentração mineral no soro das aves, que resultaram em maior deposição nos tecidos (músculo do peito, fígado, rim, coração e pâncreas) e uma menor excreção para o ambiente.

A menor excreção vem sendo justificada por diversos estudos em função da maior disponibilidade das fontes minerais orgânicas e pela menor proporção destas fontes empregadas na dieta, tendo em vista que os elementos minerais eliminados via excreta serão proporcionais a quantidade fornecida as aves (SKŘIVAN *et al.*, 2005). Ao considerar o aumento das concentrações minerais no sangue e nos tecidos, alguns estudos relatam também que ocorrem o aumento na atividade de enzimas antioxidantes, as quais desempenham papel importante na proteção das células contra os radicais livres, protegendo as células do estresse oxidativo (SUN *et al.*, 2012; ABEDINI *et al.*, 2018). Conforme demonstrado por Yu *et al.* (2020), no qual verificaram que fontes de Zn na forma de complexo elevaram as concentrações séricas de Zn e as concentrações da enzima Cu-ZnSOD quando fornecido em concentrações de 70 mg/kg na deita de galinhas poedeiras, a partir da vigésima primeira semana de idade.

## REFERÊNCIAS

- ABEDINI, M.; SHARIATMADARI, F.; KARIMI TORSHIZI, M. A.; AHMADI, H. Effects of zinc oxide nanoparticles on the egg quality, immune response, zinc retention, and blood parameters of laying hens in the late phase of production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 102, pp. 736–745, 2018.
- AL-BATSHAN, H. A.; SCHEIDELER, S. E.; BLACK, B. L.; GARLICH, J. D.; ANDERSON, K. E. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. **Poultry science**, n. 73, pp. 1590–1596, 1994.
- AO, T.; PIERCE, J. L.; POWER, R.; PESCATORE, A. J.; CANTOR, A. H.; DAWSON, K. A.; FORD, M. J. Effects of feeding different forms of zinc and copper on the performance and

tissue mineral content of chicks. **Poultry Science**, n. 88, pp. 2171–2175, 2009.

ARAÚJO, C. S. S.; HERMES, R. G.; BITTENCOURT, L. C.; SILVA, C. C.; ARAÚJO, L. F.; GRANGHELLI, C. A.; PELISSARI, P. H.; ROQUE, F. A.; LEITE, B. G. S. Different dietary trace mineral sources for broiler breeders and their progenies. **Poultry Science**, n. 98, pp. 4716–4721, 2019.

ARAÚJO, J. A. de; HUMBERTO, J.; SILVA, V. da; LIMA AMÂNCIO, A. L. de; LIMA, C. B.; ROGER, E.; OLIVEIRA, A. de. Fontes de Minerais para Poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, pp. 53–60, 2008.

ASHMEAD, H. D. **Comparative Intestinal Absorption and Subsequent Metabolism of Metal Amino Acid Chelates and Inorganic Metal Salts**. n. 1, pp. 306–319, 1991.

\_\_\_\_\_. **The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition**. 1st ed. New Jersey, 1992.

BAI, S.; HUANG, L.; LUO, Y.; WANG, L.; DING, X.; WANG, J.; ZENG, Q.; ZHANG, K. Dietary manganese supplementation influences the expression of transporters involved in iron metabolism in chickens. **Biological Trace Element Research**, n. 160, pp. 352–360, 2014.

BAI, S., JIN, G.; LI, D.; DING, X.; WANG, J.; ZHANG, K.; ZENG, Q.; JI, F.; ZHAO, J. Dietary organic trace minerals level influences eggshell quality and minerals retention in hens. **Annals of Animal Science**, n. 17, pp. 503–515, 2017.

BAIN, M. M.; NYS, Y. Increasing persistency in lay and stabilising egg quality in longer laying cycles . What are the challenges? **British Poultry Science**, n. 57, pp. 330–338, 2016.

BALOGH, E.; Paragh, G. Jeney, V. Influence of iron on bone homeostasis. **Pharmaceuticals**, n. 11, pp. 1–18, 2018.

BARBOSA, V. M.; POMPEU, M. A.; NELSON, D. L.; CUNHA, C. E.; CARDOSO, D. M.; CARDEAL, P. C. Avaliação da qualidade da casca dos ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 64, pp. 1036–1044, 2012.

BERTECHINI, A. G.; Mazzuco, H. THE TABLE EGG: A REVIEW. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 37, pp. 115–122, 2013.

BERWANGER, E.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; KINDLEIN, L.; MAYER, A. N.; EBBING, M. A.; LOPES, M. Copper requirements of broiler breeder hens. **Poultry Science**, n. 97, pp. 2785–2797, 2018.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, n. 94, pp. 329–354, 2014.

BORUTA, A.; SWIERCZWSKA, E. Trace organic minerals as a replacement of inorganic source for layers: effect on productivity and mineral excretion. **Proceedings of the 16th ...**, pp. 491–494, 2007.

BREMNER, I.; BEATTIE, J. H. Metallothionein and the trace minerals. **Annual Review of Nutrition**, n. 10, pp. 63–83, 1990.

CARD, L. E.; NESHEIM, M. C. **Produccion avicola**. New york: Ithaca, 1968.

CARVALHO, L. S. S.; ROSA, D. R. V.; LITZ, F. H.; FAGUNDES, N. S.; FERNANDES, E. A. Effect of the Inclusion of Organic Copper, Manganese, And Zinc in The Diet of Layers on

Mineral Excretion, Egg Production, and Eggshell Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, pp. 87–92, 2015.

CARVALHO, L. S. S.; VILELA, D. R.; FAGUNDES, N. S.; SOUZA, Y. L. S.; ABREU FERNANDES, E. de. Qualidade de ovos e desempenho produtivo de poedeiras em segundo ciclo de postura alimentadas com microminerais quelatados a aminoácidos. **Ciência Animal Brasileira**, n. 17, pp. 491–500, 2016a.

CARVALHO, L. S. S.; VILELA, D. R.; FAGUNDES, N. S.; SOUZA, Y. L. S.; ABREU FERNANDES, E. de. Qualidade de ovos e desempenho produtivo de poedeiras em segundo ciclo de postura alimentadas com microminerais quelatados a aminoácidos. **Ciência Animal Brasileira**, n. 17, pp. 491–500, 2016b.

CENTER FOR FOOD AND NUTRITION POLICY (CFNP). Proteinated and Chelated Mineral Complexes. **CFNP TAP Review**, n. 2119, pp. 1–29, 2002.

CORNESCO, G. M.; GROSU, H.; UNTEA, A. E.; PANAITTE, T. D.; BERCARU, A. Total content of polyphenols and antioxidant activity of different melliferous plants. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, n. 71, pp. 250–255, 2014.

COUZY, F.; Keen, C.; GERSHWIN, M. E.; MARESCHI, J. P. Nutritional implications of the interactions between minerals. **Progress in food & nutrition science**, n. 17, pp. 65–87, 1993.

CROSARA, F.; PEREIRA, V.; LELLIS, C.; BARRA, K.; SANTOS, S.; SOUZA, L.; MORAIS, T.; LITZ, F.; LIMÃO, V.; BRAGA, P.; FERNANDES, E. Is the Eggshell Quality Influenced by the Egg. **Brazilian Journal of Poultry Science**, n. 21, pp. 1–8, 2019.

DARVISHI, Y.; SHARGH, M. S.; HASSANI, S. **The effect of organic and inorganic zinc sources on performance and egg quality in laying hens**, 2020.

DAS, A.; SWAIN, S. K.; SAHOO, G.; BEHURA, N. C. Effects of Organic Minerals Supplementation on Growth, Bioavailability and Immunity in Layer Chicks. **International Journal of Pharmacology**, n. 10, v. 5, pp. 237–247, 2014.

DE GRANDE, A.; LELEU, S.; DELEZIE, E.; RAPP, C.; SMET, S. De; GOOSSENS, E.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R. Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. **Poultry Science**, n. 99, pp. 441–453, 2020.

DELLA PEPA, G.; BRANDI, M. L. **Microelements for bone boost: The last but not the least. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, n. 13, pp. 181–185, 2016.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L.; QUIROZ, M. A. Metabolic challenges and early bone development. **Journal of Applied Poultry Research**, n. 16, pp. 126–137, 2007.

EL-HUSSEINY, O.; HASHISH, M., S. M.; ALI, R. A.; ARAFA, S. A.; ABD EL-SAMEE, L. D.; OLEMY, A. A. 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**, n. 11, pp. 368–377, 2012.

ENRY, P. R. H.; ILES, R. D. M. Interactions Among the Trace Minerals. **Ciência Animal Brasileira**, n. 1, pp. 95–106, 2006.

FARIAS, M. R. S.; BASTOS-LEITE, S. C.; MOURA, C. P.; COSTA, A. C.; ABREU, C. G. de; SENA, T. L. de. Organic minerals with different chemical characteristics in diets for Hy-Line White laying hens: Performance, biometry of digestive organs, and bone quality. **Revista**



**Brasileira de Zootecnia**, n. 48, pp. 1–8, 2019.

FARINA, M. Selênio: funções biológicas e efeitos tóxicos. **Revi. Ciência e Natura**, n. 22, pp. 59–82, 2000.

FAVERO, A., VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; Bess, F.; Cemin, H. S.; Ward, T. L. Reproductive performance of Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. **Journal of Applied Poultry Research**, n. 22, pp. 80–91, 2013.

FENG, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; QI, G. H.; WANG, J. Uterine transcriptome analysis reveals mRNA expression changes associated with the ultrastructure differences of eggshell in young and aged laying hens. **BMC Genomics**, n. 21, pp. 1–15, 2020.

FERNANDES, J. I. M., MURAKAMI, A. E.; SAKAMOTO, M. I.; SOUZA, L. M. G.; MALAGUIDO, A.; MARTINS, E. N. Effects of organic mineral dietary supplementation on production performance and egg quality of white layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n. 10, pp. 59–65, 2008.

FINLEY, J. W., CATON, J. S.; ZHOU, Z.; DAVISON, K. L. A Surgical Model for Determination of True Absorption and Biliary Excretion of Manganese in Conscious Swine Fed Commercial Diets. **The Journal of Nutrition**, n. 127, pp. 2334–2341, 1997.

GANZ, T. Systemic iron homeostasis. **Physiological Reviews**, n. 93, pp. 1721–1741, 2013.

GAO, S.; YIN, T.; XU, B.; MA, Y.; HU, M. Amino acid facilitates absorption of copper in the Caco-2 cell culture model. **Life Sciences**, n. 109, pp. 50–56, 2014.

GARCIA, E. A.; MENDES, A. A.; PIZZOLANTE, C. C.; GONÇALVES, H. C.; OLIVEIRA, R. P.; SILVA, M. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n. 4, 2002.

GHEISARI, A. A.; SANEI, A.; SAMIE, A.; GHEISARI, M. M.; TOGHYANI, M. Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. **Biological Trace Element Research**, n. 142, pp. 557–571, 2011.

GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, n. 101, pp. 2763–2813, 2017.

GONZALES, B. P. E.; FONG, R. N.; GIBSON, C. J.; FUENTEALBA, I. C.; CHERIAN, M. G. Zinc supplementation decreases hepatic copper accumulation in LEC rat: A model of Wilson’s disease. **Biological Trace Element Research**, n. 105, pp. 117–134, 2005.

GOPALSAMY, G. L.; ALPERS, D. H.; BINDER, H. J.; TRAN, C. D.; RAMAKRISHNA, B. S.; BROWN, I.; MANARY, M.; MORTIMER, E.; YOUNG, G. P. The relevance of the colon to zinc nutrition. **Nutrients**, n. 7, pp. 572–583, 2015.

GRAVENA, R. A.; MARQUES, R. H.; ROCCON, J.; PICARELLI, J.; HADA, F. H.; SILVA, J. D. T. da; QUEIROZ, S. A. de; MORAES, V. M. B. de. Egg quality during storage and deposition of minerals in eggs from quails fed diets supplemented with organic selenium, zinc and manganese. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, pp. 2767–2775, 2011.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 30,

2008.

\_\_\_\_\_. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 32, pp. 8–17, 2010.

HAMDI, M.; Solà, D.; Franco, R.; Durosoy, S.; Roméo, A.; Pérez, J. F. Including copper sulphate or dicopper oxide in the diet of broiler chickens affects performance and copper content in the liver. **Animal Feed Science and Technology**, n. 237, pp. 89–97, 2018.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes 1. **The FASEB Journal**, n. 6, pp. 2675–2683, 1992.

HARRIS, E. D.; BLOUNT, J. E.; LEACH, R. M. Localization of lysyl oxidase in hen oviduct: Implications in egg shell membrane formation and composition. **Science**, n. 208, pp. 55–56, 1980a.

HARRIS, E. D.; RAYTON, J. K.; BALTHROP, J. E.; DiSilvestro, R. A.; Garcia-de-Quevedo, M. Copper and the synthesis of elastin and collagen. **Ciba Foundation symposium**, n. 79, pp. 163–182, 1980b.

HEFLIN, L. E.; MALHEIROS, R.; ANDERSON, K. E.; JOHNSON, L. K.; RAATZ, S. K. Mineral content of eggs differs with hen strain, age, and rearing environment. **Poultry Science**, n. 97, pp. 1605–1613, 2010.

HEJNA, M.; GOTTARDO, D.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V.; CHELI, F.; ZANINELLI, M.; Rossi, L. Review: Nutritional ecology of heavy metals. **Animal**, n. 12, pp. 2156–2170, 2018.

HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B.; MILES, R. D. Relative bioavailability of manganese in a manganese-methionine complex for broiler chicks. **Poultry science**, n. 68, pp. 107–112, 1989.

HERNANDEZ, J. Egg quality—meeting consumer expectations. **PM Beardswort - International Poultry**, n. 17, v. 23, 2005.

HINCKE, M. T.; CHIEN, Y. C.; GERSTENFELD, L. C.; MCKEE, M. D. Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshell. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, n. 56, pp. 467–476, 2008.

HOPCROFT, R. L.; COWIESON, A. J.; MUIR, W. I.; GROVES, P. J. Changes to mineral levels in the yolk of meat chicken embryos during incubation. **Poultry Science**, n. 98, pp. 1511–1516, 2019.

IDOWU, O. M. O.; AJUWON, R. O.; OSO, A. O.; AKINLOYE, O. A. Effects of zinc supplementation on laying performance, serum chemistry and Zn residue in tibia bone, liver, excreta and egg shell of laying hens. **International Journal of Poultry Science**, n. 10, pp. 225–230, 2011.

INAL, F.; COŞKUN, B.; Gülşen, N.; Kurtoğlu, V. The effects of withdrawal of vitamin and trace mineral supplements from layer diets on egg yield and trace mineral composition. **British Poultry Science**, n. 42, pp. 77–80, 2001.

JACKSON, B. P.; BERTSCH, P. M.; CABRERA, M. L.; CAMBERATO, J. J.; SEAMAN, J. C.; WOOD, C. W. Trace Element Speciation in Poultry Litter. **Journal of Environmental Quality**, n. 32, pp. 535–540, 2003.

KARUNAJEEWA, H.; ABU-SEREWA, S.; HARRIS, P. A. Effects of an induced pause in egg production and supplementation of the diet with iron on egg shell colour, quality and performance of brown egg layers. **British Poultry Science**, n. 30, pp. 257–264, 1989.

KJEUIN, L.; LINDAHL, U. PROTEOGLYCANS: STRUCTURES AND INTERACTIONS. **Annual Review of Biochemistry**, n. 60, pp. 443–464, 1991.

KWIATKOWSKA, K.; WINIARSKA-MIECZAN, A.; KWIECIEŃ, M. Effect of Application of Fe-Glycinate Chelate in Diet for Broiler Chickens in an Amount Covering 50 or 25% of the Requirement on Physical, Morphometric and Strength Parameters of Tibia Bones. **Biological Trace Element Research**, n. 184, pp. 483–490, 2018.

KWIECIEŃ, M.; SAMOLIŃSKA, W.; BUJANOWICZ-HARAŚ, B. Effects of iron-glycine chelate on growth, carcass characteristic, liver mineral concentrations and haematological and biochemical blood parameters in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 99, pp. 1184–1196, 2015.

LEESON, S. Copper metabolism and dietary needs. **World's Poultry Science Journal**, n. 65, pp. 353–366, 2009.

LI, L. L.; GONG, Y. J.; ZHAN, H. Q.; ZHENG, Y. X.; ZOU, X. T. Effects of dietary Zn-methionine supplementation on the laying performance, egg quality, antioxidant capacity, and serum parameters of laying hens. **Poultry Science**, n. 98, pp. 923–931, 2019.

LI, X.; XIE, J.; LU, L.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; Zou, Y.; WANG, Q.; LUO, X.; Li, S. Kinetics of manganese transport and gene expressions of manganese transport carriers in Caco-2 cell monolayers. **BioMetals**, n. 26, pp. 941–953, 2013.

LI, L. L.; ZHANG, N. N.; GONG, Y. J.; ZHOU, M. Y.; ZHAN, H. Q.; ZOU, X. T. Effects of dietary Mn-methionine supplementation on the egg quality of laying hens. **Poultry Science**, n. 97, pp. 247–254, 2018.

LICHTEN, L. A.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters: Nutritional and physiologic regulation. **Annual Review of Nutrition**, n. 29, pp. 153–176, 2009.

LIM, H. S.; PAIK, I. K. Effects of supplementary mineral methionine chelates (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 16, pp. 1804–1808, 2003.

LUMEIJ, J. T.; WESTERHOF, I. Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. **The Veterinary quarterly**, n. 9, pp. 255–261, 1987.

MA, W. Q.; SUN, H.; ZHOU, Y.; WU, J.; FENG, J. Effects of iron glycine chelate on growth, tissue mineral concentrations, fecal mineral excretion, and liver antioxidant enzyme activities in broilers. **Biological Trace Element Research**, n. 149, pp. 204–211, 2012.

MABE, I.; RAPP, C.; BAIN, M. M.; NYS, Y. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. **Poultry Science**, n. 82, pp. 1903–1913, 2003.

MACIEL, M. P.; SARAIVA, E. P.; AGUIAR, É. D. F.; ASSUNÇÃO, P. Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying, 2010.

MCCOY, M. A.; REILLY, G. A. C.; KILPATRICK, D. J. Density and breaking strength of bones of mortalities among caged layers. **Research in Veterinary Science**, n. 60, pp. 185–186, 1996.

MEDEIROS-VENTURA, W. R. L.; RABELLO, C. B. V.; BARROS, M. R.; SILVA JUNIOR, R. V.; OLIVEIRA, H. B.; FARIA, A. G.; SILVA, A. F.; SOARES, P. C.; PEREIRA, C. G.;

SANTOS, M. J. B.; FIREMAN, A. K. Zinc, manganese, and copper amino acid complexes improve performance and bone characteristics of layer-type chicks under thermoneutral and cold stress conditions. **Poultry Science**, n. 99, pp. 5718–5727, 2020.

MERTENS, K.; BAMELIS, F.; KEMPS, B.; KAMERS, B.; VERHOELST, E.; KETELAERE, B. De; BAIN, M.; DECUYPERE, E.; BAERDEMAEKER, J. De. Monitoring of eggshell breakage and eggshell strength in different production chains of consumption eggs. **Poultry Science**, n. 85, pp. 1670–1677, 2006.

MILES, R. D.; HENRY, P. R. RELATIVE TRACE MINERAL BIOAVAILABILITY. **Ciência Animal Brasileira**, n. 1, pp. 73–93, 2006.

MILLER, W. J. New Concepts and Developments in Metabolism and Homeostasis of Inorganic Elements in Dairy Cattle. A Review. **Journal of Dairy Science**, n. 58, pp. 1549–1560, 1975.

MIN, Y. N.; LIU, F. X.; QI, X.; JI, S.; CUI, L.; WANG, Z. P.; GAO, Y. P. Effects of organic zinc on tibia quality, mineral deposit, and metallothionein expression level of aged hens. **Poultry Science**, n. 98, pp. 366–372, 2019.

MOHANNA, C.; NYS, Y. Influence of age, sex and cross on body concentrations of trace elements (zinc, iron, copper and manganese) in chickens. **British Poultry Science**, n. 39, pp. 536–543, 1998.

\_\_\_\_\_. Effect of dietary zinc content and sources on the growth, body zinc deposition and retention, zinc excretion and immune response in chickens. **British Poultry Science**, n. 40, pp. 108–114, 1999.

NAKANO, T.; IKAWA, N.; OZIMEK, L. Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell. **Poultry Science**, n. 80, pp. 681–684, 2001.

\_\_\_\_\_. Galactosaminoglycan composition in chicken eggshell. **Poultry Science**, n. 81, pp. 709–714, 2002.

NOLLET, L.; VAN DER KLIS, J. D.; LENSING, M.; SPRING, P. The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. **Journal of Applied Poultry Research**, n. 16, pp. 592–597, 2007.

NUNES, J. K.; SANTOS, V. L.; ROSSI, P.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F.; MAIER, J. C.; SILVA, J. G. C. Qualidade de ovos e resistência óssea de poedeiras alimentadas com minerais orgânicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 65, pp. 610–618, 2013.

NYS, Y.; GAUTRON, J.; GARCIA-RUIZ, J. M.; HINCKE, M. T. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. **Comptes Rendus Palevol**, n. 3, pp. 549–562, 2004.

NYS, Y.; SCHLEGEL, P.; DUROSOY, S.; JONDREVILLE, C.; NARCY, A. Adapting trace mineral nutrition of birds for optimising the environment and poultry product quality. **World's Poultry Science Journal**, n. 74, pp. 225–238, 2018.

OLIVEIRA, H. B. de. **Utilização de minerais complexados a aminoácidos em dietas de galinhas poedeiras semipesadas na fase de produção**, 2019.

OLIVEIRA, J. F. de.; ROSSI JÚNIOR, J. L.; LEITE, F. L. G.; OLIVEIRA, D. C. de; COSTA, L. A. V. S.; SILVA, I. C. C. da; TEIXEIRA, M. W.; COSTA, F. S. Densitometria da vértebra dorsal, osso pleural e osso neural em tartarugas verdes hípidas por tomografia computadorizada

quantitativa. **Ciência Rural** 42:1440–1445, 2012.

ONYANGO, E. M.; HESTER, P. Y.; STROSHINE, R.; ADEOLA, O. Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. **Poultry Science**, n. 82, pp. 1787–1791, 2003.

PAIK, I. Application of chelated minerals in animal production. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 14:191–198, 2001.

PAIK, I.; Lee, H.; PARK, S. Effects of organic iron supplementation on the performance and iron content in the egg yolk of laying hens. **Journal of Poultry Science**, n. 46, pp. 198–202, 2009.

PARK, J. A.; CHO, E. J.; PARK, J. Y.; SOHN, S. H. Histological Change of Uterus Endometrium and Expression of the Eggshell-related Genes according to Hen Age Ji. **Korean journal poultry Sci**, n. 44, pp. 19–28, 2017.

PARK, S. W.; NAMKUNG, H.; AHN, H. J.; PAIK, I. K. Production of iron enriched eggs of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 17, pp. 1725–1728, 2004.

PARK, J. A.; SOHN, S. H. The influence of hen aging on eggshell ultrastructure and shell mineral components. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, n. 38, pp. 1080–1091, 2018.

PAULUS, E. **Effect of Manganese status on the expression of metal-ion transporters in mouse liver and intestine**, n. 3, 2015.

PEREIRA, G. C. C.; COSTA, F. G. P.; SILVA, J. H. V. da; PASCOAL, L. A. F.; LIMA, C. A. B. de.; BITTENCOURT, L. C.; SECHINATO, A. da S.; HERMES, R. G. Different trace mineral sources and recommendations in the performance and quality of eggs from Dekalb White layers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 47, 2018.

PEREIRA, C. G.; RABELLO, C. B. V.; BARROS, M. R.; MANSO, H. E. C. C. C.; SANTOS, M. J. B. dos; FARIA, A. G.; OLIVEIRA, H. B. de; MEDEIROS-VENTURA, W. R. L.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. C. D.; FIREMAN, A. K. Zinc, manganese and copper amino acid complexed in laying hens' diets affect performance, blood parameters and reproductive organs development. **PLoS ONE**, n. 15, pp. 1–16, 2020.

POWELL, J. J.; JUGDAOHSINGH, R.; THOMPSON, R. P. H. The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract. **Proceedings of the Nutrition Society**, n. 58, pp.147–153, 1999.

QIU, J.; LU, X.; MA, V.; HOU, C.; HE, J.; LIU, B.; YU, D.; LIN, G.; XU, J. Low-dose of organic trace minerals reduced fecal mineral excretion without compromising performance of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 33, pp. 588–596, 2020.

QIU, J. L.; ZHOU, Q.; ZHU, J. M.; LU, X. T.; LIU, B.; YU, D. Y.; Lin, G.; AO, T.; XU, J. M. Organic trace minerals improve eggshell quality by improving the eggshell ultrastructure of laying hens during the late laying period. **Poultry Science**, n. 99, pp. 1483–1490, 2019.

RAMOS-VIDALES, D.; GÓMEZ-VERDUZCO, G.; CORTES-CUEVAS, A.; RÍO-GARCÍA, J. C. del.; FERNÁNDEZ-TINOCO, S.; CHÁRRAGA-AGUILAR, S.; ÁVILA-GONZÁLEZ, E. Organic trace minerals on productive performance, egg quality and immune response in Bovans White laying hens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 103, pp. 1484–1491, 2019.

- RICHARDS, J. D.; ZHAO, J.; HARREIL, R. J.; ATWELL, C. A.; DIBNER, J. J. Trace mineral nutrition in poultry and swine. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 23, pp. 1527–1534, 2010.
- ROLAND, D. A. Research Note: Egg Shell Problems: Estimates of Incidence and Economic Impact 1 Inferior eggshell quality continues to be a major concern of egg producers. Although there have been several estimates concerning the extent of shell problems. **Poultry Science**, n. 67, pp. 1801–1803, 1988.
- ROSE, M. L. H.; HINCKE, M. T. Protein constituents of the eggshell: Eggshell-specific matrix proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 66, pp. 2707–2719, 2009.
- RUTZ, F.; ANCIUT, A. M.; RECH, J. L.; ROSSI, P. The Impact of Organic Mineral on Performance of Poultry. **Proc. Aust. Poult. Sci. Sym**, n. 16, pp. 1–4, 2004.
- RUTZ, F.; MURPHY, R. Minerais Orgânicos Para Aves E Suínos. **I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal**, pp. 21–36, 2009.
- SALDANHA, E.; GARCIA, E.; PIZZOLANTE, C.; FAITTARONE, A.; SECHINATO, A. da; MOLINO, A.; LAGANÁ, C. Effect of organic mineral supplementation on the egg quality of semi-heavy layers in their second cycle of lay. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n. 11, pp. 241–247, 2009.
- SALEH, A. A.; ELTANTAWY, M. S.; GAWISH, E. M.; YOUNIS, H. H.; AMBER, K. A.; ABD EL-MONEIM, A. E.-M. E.; EBEID, T. A. **Impact of Dietary Organic Mineral Supplementation on Reproductive Performance, Egg Quality Characteristics, Lipid Oxidation, Ovarian Follicular Development, and Immune Response in Laying Hens Under High Ambient Temperature. Biological Trace Element Research**, 2019.
- SALIM, H. M.; LEE, H. R.; JO, C.; LEE, S. K.; Lee, B. D. Supplementation of graded levels of organic zinc in the diets of female broilers: Effects on performance and carcass quality. **British Poultry Science**, n. 52, pp. 606–612, 2011.
- SANDILANDS, V. The laying hen and bone fractures. **Avian Science Research Center**, n. 169, p. 414, 2011.
- SAUER, A. K.; PFAENDER, S.; HAGMEYER, S.; TARANA, L.; MATTES, A. K.; BRIEL, F.; KÜRY, S.; BOECKERS, T. M.; GRABRUCKER, A. M. Characterization of zinc amino acid complexes for zinc delivery in vitro using Caco-2 cells and enterocytes from hiPSC. **BioMetals**, n. 30, pp. 643–661, 2017.
- SCHEIBER, I. F.; WU, Y.; MORGAN, S. E.; ZHAO, N. The intestinal metal transporter ZIP14 maintains systemic manganese homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, n. 294, pp. 9147–9160, 2019.
- SCOTTÁ, B. A.; VIEIRA, R. A.; GOMIDE, A. P. C.; CAMPOS, P. F.; BARROCA, C. C.; Formigoni, A. da S. Influência dos minerais quelatados e inorgânicos no metabolismo, desempenho, qualidade da carcaça e da carne de frangos de corte. **Pubvet**, n. 8, 2014.
- SEEDOR, J. G.; Quartuccio, H. A.; Thompson, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, n. 6, pp. 339–346, 1991.
- SEO, Y. M.; SHIN, K. S.; RHEE, A. R.; CHI, Y. S.; HAN, J.; PAIK, I. K. Effects of dietary feso-y proteinate and mgo on egg production and quality of eggshell in laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 23, pp. 1043–1048, 2010.

SEVERO, J. S.; MORAIS, J. B. S.; FREITAS, T. E. C. de; CRUZ, K. J. C.; OLIVEIRA, A. R. S. de; POLTRONIERI, F.; MARREIRO, D. D. N. Aspectos metabólicos e nutricionais do magnésio. **Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria**, n. 35, pp. 67–74, 2015.

SILVERSIDES, F. G.; KORVER, D. R.; BUDGELL, K. L. Effect of strain of layer and age at photostimulation on egg production, egg quality, and bone strength. **Poultry Science**, n. 85, pp. 1136–1144, 2006.

SIRRI, F.; MAIORANO, G.; TAVANIELLO, S.; CHEN, J.; PETRACCI, M.; MELUZZI, A. 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**, n. 95, pp. 1813–1824, 2016.

SKŘIVAN, M.; SKŘIVANOVÁ, V.; MAROUNEK, M. Effects of dietary zinc, iron, and copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil, and herbage. **Poultry Science**, n. 84, pp. 1570–1575, 2005.

SMITH, J. E. Iron Metabolism and its Disorders. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, n. 259–285, 1997.

SOUSA, A. M.; BATOS-LEITE, S. C.; GOULARD, C. C.; BARROSO, M. L. S.; SILVA, J. D. B. Chelated minerals and two limestone particle sizes on production of layers in the second laying cycle. **Minerais quelatados e duas granulometrias de calcário sobre a produção de poedeiras em segundo ciclo produtivo. The egg production scenario in the poultry**, pp. 103–112, 2017a.

SOUSA, A. M. de; Cavalcante, S.; Castro, C. de; Luana, M.; Brito, J. D. Chelated minerals and two limestone particle sizes on production of layers in the second laying cycle. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, n. 18, pp. 103–112, 2017b.

SOUZA, J. C. S. de; TAVARES, T. H.; FERNANDES, F. S. C.; BONELLI, M. de A. Quantitative Computed Tomography of Healthy Adult Boas (Boa Constrictor). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n. 49, p. 1012, 2018.

STEFANELLO, C.; SANTOS, T. C.; MURAKAMI, A. E.; MARTINS, E. N.; CARNEIRO, T. C. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. **Poultry Science**, n. 93, pp. 104–113, 2014.

SUN, Q.; GUO, Y.; LI, J.; ZHANG, T.; WEN, J. **Effects of Methionine Hydroxy Analog Chelated Cu / Mn / Zn on Laying Performance, Egg Quality, Enzyme Activity and Mineral Retention of Laying Hens**, 2012.

SUN, W.; WANG, G.; PEI, X.; LIU, L.; XIAO, Z.; TAO, W.; YAQOUB, M. U.; WANG, M.; HUAI, M.; LI, L.; PELLETIER, W. Effects of Replacing Inorganic with Respective Complexed Glycinate Minerals on Apparent Mineral Bioavailability and Deposition Rate in Tissues of Broiler Breeders. **Biological Trace Element Research**, 2020.

SUTTLE, N. F. **Mineral Nutrition of Livestock**, 4th Edition (EJ Underwood, Ed.). 4 th ed. Cambridge, MA 02139 USA, 2010b.

SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. **Veterinarni Medicina**, n. 53, pp. 555–563, 2008.

TASCHETTO, D.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; STEFANELLO, C.; KINDLEIN, L.; EBBING, M. A.; SIMÕES, C. T. Iron requirements of broiler breeder hens. **Poultry Science**,

n. 96, pp. 3920–3927, 2017.

THØFNER, I. C. N.; DAHL, J.; CHRISTENSEN, J. P. Keel bone fractures in Danish laying hens: Prevalence and risk factors. **PLoS ONE**, n. 16, pp. 1–23, 2021.

TORRES, C. A.; Korver, D. R. 2018. Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. **Poultry Science**, n. 97, pp. 2996–3003.

TSAY, J.; YANG, Z.; ROSS, F. P.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; LIN, H.; COLEMAN, R.; MAYER-KUCKUK, P.; DOTY, S. B.; GRADY, R. W.; GIARDINA, P. J.; BOSKEY, A. L.; VOGIATZI, M. G. Bone loss caused by iron overload in a murine model: Importance of oxidative stress. **Blood**, n. 116, pp. 2582–2589, 2010.

VENGLOVSKÁ, K.; GREŠÁKOVÁ, L.; PLACHÁ, I.; RYZNER, M.; ČOBANOVÁ, K. Effects of feed supplementation with manganese from its different sources on performance and egg parameters of laying hens. **Czech Journal of Animal Science**, n. 59, pp. 147–155, 2014.

VENKATESAN, N.; BARRÉ, L.; BENANI, A.; NETTER, P.; MAGDALOU, J.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; OUZZINE, M. Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: A strategy to promote cartilage repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 101, pp. 18087–18092, 2004.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, n. 43, pp. 415–422, 1999.

VIEIRA, S. L. Chelated minerals for poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n. 10, pp. 73–79, 2008.

WANG, G.; LIU, L. J.; TAO, W. J.; XIAO, Z. P.; PEI, X.; LIU, B. J.; WANG, M. Q.; LIN, G.; AO, T. Y. Effects of replacing inorganic trace minerals with organic trace minerals on the production performance, blood profiles, and antioxidant status of broiler breeders. **Poultry Science**, n. 98, pp. 2888–2895, 2019a.

WANG, G.; LIU, L.; WANG, Z.; PEI, X.; TAO, W.; XIAO, Z.; LIU, B.; WANG, M.; LIN, G.; AO, T. Comparison of Inorganic and Organically Bound Trace Minerals on Tissue Mineral Deposition and Fecal Excretion in Broiler Breeders. **Biological Trace Element Research**, n. 189, pp. 224–232, 2019b.

WHITEHEAD. Overview of bone biology in the egg-laying hen. **Poultry Science**, n. 83, pp. 193–199, 2004.

WIGHT, P. A. L.; DEWAR, W. A.; SAUNDERSON, C. L. Zinc toxicity in the fowl: Ultrastructural pathology and relationship to selenium, lead and copper. **Avian Pathology**, n. 15, pp. 23–38, 1986.

WISTEDT, A.; RIDDERSTRÅLE, Y.; WALL, H.; HOLM, L. Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids. **Acta Veterinaria Scandinavica**, n. 61, pp. 1–14, 2019.

XIAO, J. F.; WU, S. G.; ZHANG, H. J.; YUE, H. Y.; WANG, J.; JI, F.; QI, G. H. Bioefficacy comparison of organic manganese with inorganic manganese for eggshell quality in Hy-Line Brown laying hens. **Poultry Science**, n. 94, pp. 1871–1878, 2015.

XIAO, J. F.; ZHANG, Y. N.; WU, S. G.; ZHANG, H. J.; YUE, H. Y.; QI, G. H. Manganese



supplementation enhances the synthesis of glycosaminoglycan in eggshell membrane: A strategy to improve eggshell quality in laying hens. **Poultry Science**, n. 93, pp. 380–388, 2014.

XIE, C.; ELWAN, H. A. M.; ELNESR, S. S.; DONG, X. Y.; ZOU, X. T. Effect of iron glycine chelate supplementation on egg quality and egg iron enrichment in laying hens. **Poultry Science**, n. 98, pp. 7101–7109, 2019.

YAN, F.; WALDROUP, P. W. Evaluation of Mintrex® manganese as a source of manganese for young broilers. **International Journal of Poultry Science**, n. 5, pp. 708–713, 2006.

YENICE, E.; MIZRAK, C.; GÜLTEKIN, M.; ATIK, Z.; TUNCA, M. Effects of Organic and Inorganic Forms of Manganese, Zinc, Copper, and Chromium on Bioavailability of These Minerals and Calcium in Late-Phase Laying Hens. **Biological Trace Element Research**, n. 167, pp. 300–307, 2015.

YU, Q.; LIU, H.; YANG, K.; TANG, X.; CHEN, S.; AJUWON, K. M.; DEGEN, A.; FANG, R. Effect of the level and source of supplementary dietary zinc on egg production, quality, and zinc content and on serum antioxidant parameters and zinc concentration in laying hens. **Poultry Science**, n. 99, pp. 6233–6238, 2020.

ZAMANI, A.; RAHMANI, H. R.; Pourreza, J. Supplementation of a corn-soybean Meal diet with manganese and zinc improves eggshell quality in laying hens. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, n. 9 pp. 1311–1317, 2005.

ZANG, Y. N.; ZHANG, H. J.; Wu, S. G.; Wang, J.; Qi, G. H. Dietary manganese supplementation modulated mechanical and ultrastructural changes during eggshell formation in laying hens. **Poultry Science**, n. 96, pp. 2699–2707, 2017.

ZHANG, H.; GILBERT, E. R.; ZHANG, K.; DING, X.; LUO, Y.; WANG, J.; ZENG, Q.; BAI, S. Uptake of manganese from manganese-lysine complex in the primary rat intestinal epithelial cells. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 101, pp. 147–158, 2015.

ZHANG, Y. N.; WANG, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; QI, G. H. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. **Poultry Science**, n. 96, pp. 2184–2193, 2017a.

\_\_\_\_\_. Dietary manganese supplementation modulated mechanical and ultrastructural changes during eggshell formation in laying hens. **Poultry Science**, n. 96, pp. 2699–2707, 2017b.

## **CAPÍTULO I**

---

Efeito da suplementação parcial de complexos mineral-aminoácido na dieta de galinhas de postura semipesadas após 50 semanas de idade

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a suplementação dos complexos de aminoácidos zinco, manganês, cobre e ferro (MCA) em dietas para poedeiras comerciais e seus efeitos no desempenho produtivo, qualidade dos ovos, peso dos órgãos e características ósseas. No período de um dia de vida até as 30 semanas de idade dois grupos de aves foram alimentadas com duas fontes minerais: inorgânicas (70, 70 e mg/kg de Zn, Mn e Cu) ou inorgânicas reduzidas (40, 40, 2,75 mg/kg Zn, Mn e Cu) associadas com minerais complexados a aminoácidos (30, 30, e 5,25 mg/kg). E durante o período de 30 às 93 semanas de idade, 640 galinhas poedeiras, 320 de cada grupo inicial, foram redistribuídas em quatro grupos, definindo o arranjo fatorial 2 x 4 com oito repetições de 10 aves. Os tratamentos consistiram em: 1) MI – contendo 70, 70, 8 mg/kg de Zn, Mn, Cu provenientes de fontes minerais inorgânicas; 2) MCA-AMC – substituição parcial das fontes minerais inorgânicas por 30, 30 e 5,25 mg de Zn, Mn e Cu complexados a aminoácidos; 3) MCA-ZMCFe – substituição parcial das fontes inorgânicas por 30, 30, 5, 25 e 40 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe; 4) MCA-Fe - substituição parcial da fonte de ferro inorgânico por 40 mg/kg de Fe complexado a aminoácido. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Houve efeito de interação para as variáveis de qualidade dos ovos, óssea e sanguínea, exceto para a composição dos tecidos ósseo e hepático, para gema dos ovos e excretas das aves. A suplementação com MCA durante a FP contribuiu para elevar as concentrações de Fe e Cu no fígado e Mn na gema dos ovos. O uso de MCA-ZMC desde a FC em substituição parcial as fontes inorgânicas, e a manutenção desta suplementação em associação ao MCA-Fe retardou os impactos da idade sobre as características ósseas e qualidade da casca dos ovos durante a FP, influenciando positivamente na atividade da fosfatase, manutenção da integridade óssea das galinhas e na espessura das cascas dos ovos, sem afetar o desempenho produtivo das aves. A suplementação parcial das aves com MCA-ZMC durante as fases iniciais de criação até o período final de produção não determinaram maiores concentrações minerais nos tecidos ósseo, hepático, gema dos ovos e excretas das aves. Apenas a suplementação das aves durante a fase final de produção, independente da suplementação durante a fase de crescimento proporcionaram maiores concentrações de Fe e Cu no fígado e Mn na gema e nas excretas das aves.

**Palavras-chave:** Aves de postura; Densidade óssea; Espessura de casca; Minerais complexados a aminoácidos; Qualidade de ovos.

## ABSTRACT

The objective was to evaluate the supplementation of the amino acid complexes zinc, manganese, copper and iron (MCA) in diets for commercial laying hens and their effects on productive performance, egg quality, organ weight and bone characteristics. In the period from one day of life to 30 weeks of age, two groups of birds were fed with two mineral sources: inorganic (70, 70 and mg/kg of Zn, Mn and Cu) or reduced inorganic (40, 40, 2.75 mg/kg Zn, Mn and Cu) associated with minerals complexed to amino acids (30, 30, and 5.25 mg/kg). And during the period from 30 to 93 weeks of age, 640 laying hens, 320 from each initial group, were redistributed into four groups, defining a 2 x 4 factorial arrangement with eight replicates of 10 birds. The treatments consisted of: 1) MI – containing 70, 70, 8 mg/kg of Zn, Mn, Cu from inorganic mineral sources; 2) MCA-AMC – partial replacement of inorganic mineral sources by 30, 30 and 5.25 mg of Zn, Mn and Cu complexed to amino acids; 3) MCA-ZMCFe – partial replacement of inorganic sources by 30, 30, 5, 25 and 40 mg/kg of Zn, Mn, Cu and Fe; 4) MCA-Fe - partial replacement of the inorganic iron source by 40 mg/kg Fe complexed to amino acid. The data obtained were submitted to variance analysis and the means were compared using Tukey's test ( $P < 0.05$ ). There was an interaction effect for egg, bone, and blood quality variables. No interaction effect was identified for bone and liver tissue composition, egg yolk, and bird excreta. Supplementation with ACM during PP contributes to elevate Fe and Cu concentrations in the liver and Mn concentrations in egg yolk. The use of ACM-ZMC since the GP in partial replacement of inorganic sources, and the maintenance of this supplementation in association with ACM-Fe delayed the impacts of age on bone characteristics and eggshell quality during the PP, influencing positively on phosphatase activity, maintenance of bone integrity of the hens and eggshell thickness, without affecting the productive performance of birds. Partial supplementation of birds with ACM-ZMC during the early rearing to late production phases did not determine higher mineral concentrations in bone, liver, egg yolk, and excreta tissues of the birds. Only supplementation of birds during late production, independent of supplementation during the growing season, provided higher concentrations of Fe and Cu in the liver and Mn in egg yolk and excreta.

**Keywords:** Laying hens; Bone density; Shell thickness; Amino acid complexed minerals; Egg quality.

## INTRODUÇÃO

Em aves de produção industrial, a nutrição precisa e equilibrada é determinante para a obtenção de resultados de desempenho produtivo satisfatórios e aliada às boas condições de saúde e manejo das aves promovem ao produtor maior lucratividade dentro do setor avícola. Entretanto, para obtenção de uma produtividade eficiente a biodisponibilidade dos nutrientes essenciais é um fator importante (BORUTA; SWIERCZWSKA, 2007).

Os microminerais, tais como zinco, manganês, cobre e ferro (Zn, Mn, Cu e Fe), atuam em diversos processos metabólicos tanto nas aves como em outras espécies de animais, promovendo formação e manutenção da integridade óssea e da casca dos ovos (ZAMANI *et al.*, 2005; BORUTA; SWIERCZWSKA, 2007; SALIM *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2014), ativação enzimática, síntese de proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio (LEESON, 2009; BERWANGER *et al.*, 2018) e como componentes de compostos heme responsáveis pela oxidação, redução e transporte de elétrons (SMITH, 1997; SUTTLE, 2010b).

Normalmente, as dietas de aves são suplementadas com fontes tradicionais, convencionalmente chamadas inorgânicas (MI), que compreendem óxidos, sulfatos e carbonatos, em níveis superiores os exigidos pelos animais (RUTZ *et al.*, 2004). Essa prática visa garantir às aves o atendimento de suas necessidades nutricionais a partir de fontes que apresentam baixa capacidade de aproveitamento; com isso, uma proporção considerável desses elementos minerais são excretados (YAN; WALDROUP, 2006), acarretando poluição ambiental e prejuízos ao produtor.

Diante disso, novas tecnologias na área de nutrição vêm sendo avaliadas para minimizar o impacto ambiental e melhorar desempenho das aves, entre estas, a utilização de minerais ligados a moléculas orgânicas, convencionalmente chamados “orgânicos”, que vêm demonstrando respostas promissoras por apresentar maior biodisponibilidade quando comparados às fontes inorgânicas (EL-HUSSEINY *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012), o que levou à condução de diversos estudos com a utilização de fontes minerais ligadas a moléculas orgânicas e seus efeitos sobre o desempenho produtivo, qualidade da casca dos ovos (ZAMANI *et al.*, 2005; STEFANELLO *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2014), modulação do sistema imune e atividade de enzimas hepáticas (SUN *et al.*, 2012; SALEH *et al.*, 2019).

Embora algumas pesquisas já tenham sido desenvolvidas, avaliando o efeito da suplementação das fontes minerais denominadas de “orgânicas” na alimentação de poedeiras comerciais em fases distintas (início de produção, final ou em segundo ciclo), nos quais consideram-se a substituição das fontes inorgânicas pelas orgânicas, até o momento não se tem o conhecimento do efeito da suplementação parcial de forma contínua desde a fase inicial de

criação até o período final de produção e suas influências sobre a qualidade óssea e da casca dos ovos das aves no período final de produção. Isso torna a atual pesquisa pioneira na avaliação destas fontes minerais durante todo o ciclo produtivo.

Com base nisto, hipotetizamos que a utilização de complexos mineral-AA promove melhorias no desempenho produtivo das aves, qualidade dos ovos e manutenção da integridade óssea no final do período produtivo das aves quando suplementadas ao longo de todas as fases de criação. Desse modo, objetivou-se avaliar os efeitos da substituição parcial de Zn, Mn, Cu e Fe de fontes inorgânicas (MI) por estes minerais na forma de complexo de metais aminoácidos (MCA) na alimentação de poedeiras comerciais semipesadas e seus efeitos no desempenho produtivo, qualidade dos ovos, características ósseas, composição mineral dos tecidos ósseo e hepático, gema dos ovos e excretas, quando fornecidos durante as diferentes fases de criação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

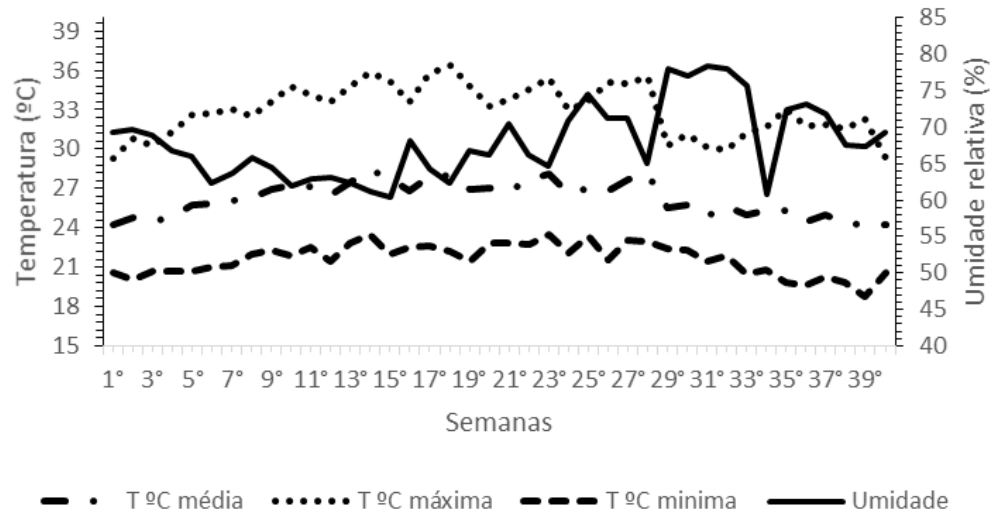
O protocolo para a realização deste estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no uso de animais – CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número da licença 064/2016.

### ***Local***

O Experimento foi conduzido em granja de postura comercial, localizada no município de Caruaru (Latitude: 08°17'00" S e Longitude: 35°58'34" W) mesorregião do agreste de Pernambuco, Brasil.

### ***Aves e Instalações***

Foram utilizadas 640 galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown Lite, alojadas em gaiolas medindo 100 x 40 x 45 cm (10 aves/gaiola), ocupando um espaço de 450 cm<sup>2</sup>/ave, equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros tipo *nipple*, com fornecimento de água *ad libitum* e ração controlada durante todo o período experimental. O fotoperíodo adotado foi 17 horas (natural + artificial). Durante todo o período experimental, a temperatura e umidade relativa do ar no interior do galpão foram registradas diariamente por meio de Datalogger (modelo Hobo U12-013, onset) (Figura 1), sendo verificado uma temperatura média de 26,93°C ± 1,48 e umidade relativa de 68% ± 5,10.



**Figura 1.** Valores médios das temperaturas e umidade relativa durante o período experimental

### *Delineamento e Dietas experimentais*

O período experimental teve duração de 280 dias (divididos em 10 ciclos de 28 dias). As aves foram distribuídas nas parcelas experimentais de acordo com o peso ( $1821.35g \pm 114.80$ ) e produção ( $95.84\% \pm 1,44$ ) em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial  $2 \times 4$ , constituído de duas dietas fornecidas de um dia de vida até as 30 semanas de idade (Fase de crescimento, FC), as quais constituíram o primeiro fator, e quatro dietas utilizadas a partir das 30 semanas (Fase de produção, FP), as quais constituíram o segundo fator (Fase de produção, FP), compondo dessa forma oito grupos.

A constituição dos tratamentos ocorreu da seguinte forma: durante o período de um dia a 30 semanas de idade, dois grupos de aves foram alimentados com duas fontes minerais que consistiram na suplementação de 70, 70 e 8 mg/kg de Zn, Mn e Cu inorgânicos (IM) e 40, 40 e 2,75 mg/kg de inorgânicos associados com 30, 30 e 5,25 mg/kg de Zn, Mn e Cu complexados a aminoácidos (MCA-ZMC). Ao atingirem as 30 semanas de idade, os dois grupos de aves iniciais (MI e MCA) foram redistribuídos em quatro grupos, sendo estes : 1) MI- contendo 70, 70 e 50 mg/kg, respectivamente, de Zn, Mn e Cu inorgânicos; 2) MCA-ZMC - contendo 40, 40, 2,75 e 50 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe inorgânicos associados com 30, 30 e 5,25 mg/kg de MCA-ZMC; 3) MCA-ZMCFe – contendo 40, 40, 2,75 e 10 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe inorgânicos mais 30, 30 e 5,25 de MCA-ZMC e 40 mg/kg de Fe complexo a aminoácidos

(MCA-Fe); 4) MCA-Fe – Contendo 70, 70, 8 e 10 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe inorgânicos mais 40 mg/kg de MCA-Fe. Após atingirem as 50 semanas de idade 640 aves foram selecionadas em função do peso e produção, e em seguida distribuídas entre as parcelas experimentais.

Os premixes minerais foram formulados de acordo com os níveis comumente utilizados na indústria. A suplementação por quilograma de premix mineral encontram-se descritas na Tabela 1, e as dietas experimentais detalhadas na Tabela 2. Os seguintes ingredientes foram usados como fontes inorgânicas: óxido de zinco (73% ZnO), óxido de manganês (57% MnO), sulfato de cobre (34,5% CuSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O), sulfato ferroso (30% SO<sub>4</sub>Fe), iodato de cálcio (62% I) e selenito de sódio (45% Se). Os minerais complexados com aminoácidos foram Zn, Mn, Cu e Fe.

**Tabela 1.** Composição mineral calculada e analisada das dietas experimentais

Calculada, mg/kg	MI	MCA-ZMC <sup>5</sup>		MCA-ZMC-Fe		MCA-Fe <sup>6</sup>	
	Premix I	Premix II		Premix III		Premix IV	
		IM	MCA	IM	MCA	IM	MCA
Zinco <sup>1</sup>	70	40	30	40	30	70	
Manganês <sup>2</sup>	70	40	30	40	30	70	
Cobre <sup>3</sup>	8	2,75	5,25	2,75	5,25	8	
Ferro <sup>4</sup>	50	50		10	40	10	40
Iodo	1,0	1,0		1,0		1,0	
Selênio	0,25	0,25		0,25		0,25	
Analisada, mg/kg	MI	MCA-ZMC		MCA-ZMC+Fe		MCA-Fe	
Zinco	95,46	95,03		95,08		95,27	
Manganês	90,57	90,38		92,78		92,60	
Cobre	12,06	12,91		12,82		12,28	
Ferro	107,84	107,14		107,95		107,04	
Cálcio, g/kg	45,63	45,81		45,54		45,65	
Fósforo, g/kg	4,08	4,14		4,12		4,04	

Suplementação por quilo de produto: <sup>1</sup>Óxido de Zinco 799g / kg (Mín.); <sup>2</sup>Óxido de manganês, 60-62% de MnO, 600g / Kg (Mín.); <sup>3</sup>Sulfato de cobre, CuSO<sub>4</sub>,5H<sub>2</sub>O, 250g de Cu; <sup>4</sup>Sulfato de Ferro, FeSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 300g / kg (Mín.); <sup>5</sup>AvailaZMC (descrição física 750g / ton); <sup>6</sup>AvailaFe (descrição física 400g / ton): ferro: 40 mg/kg.



**Tabela 2.** Composição calculada e analisada das dietas experimentais

<b>Ingredientes, %</b>	<b>MI</b>	<b>MCA-ZMC</b>	<b>MCA-ZMCFe</b>	<b>MCA-Fe</b>
Milho moído	63,403	63,403	63,403	63,403
Farelo de soja	24,876	24,876	24,876	24,876
Óleo de soja	0,200	0,200	0,200	0,200
Calcário calcítico	9,900	9,900	9,900	9,900
Fosfato bicálcico	0,341	0,341	0,341	0,341
Bicarbonato de sódio	0,150	0,150	0,150	0,150
Sal comum	0,232	0,232	0,232	0,232
DL-Metionina 99	0,253	0,253	0,253	0,253
L-Treonina 98,5	0,038	0,038	0,038	0,038
Biobond <sup>1</sup>	0,150	0,150	0,150	0,150
Clostat <sup>2</sup>	0,050	0,050	0,050	0,050
Phytase AB Vista <sup>3</sup>	0,006	0,006	0,006	0,006
Premix Vitamínico <sup>4</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Mineral I	0,100	-	-	-
Premix Mineral II	-	0,100	-	-
Premix Mineral III	-	-	0,100	-
Premix Mineral IV	-	-	-	0,10
MCA-ZMC <sup>5</sup>	-	0,075	0,075	-
MCA-Fe <sup>6</sup>	-	-	0,040	0,040
Caulim	0,200	0,125	0,085	0,160
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição Nutricional</b>				
EMA, kcal/kg	2756	2756	2756	2756
Proteína Bruta, %	16,42	16,42	16,42	16,42
Proteína Bruta <sup>7</sup> , %	16,65	16,15	16,40	16,06
Matéria seca <sup>7</sup> , %	90,63	91,23	90,95	91,00
Matéria Mineral <sup>7</sup> , %	15,71	15,16	15,28	15,64
<b>Aminoácidos digestíveis, %</b>				
Lisina	0,78	0,78	0,78	0,78
Metionina	0,47	0,47	0,47	0,47
Metionina + Cistina	0,71	0,71	0,71	0,71
Treonina	0,59	0,59	0,59	0,59
Arginina	1,00	1,00	1,00	1,00
Isoleucina	0,62	0,62	0,62	0,62
Triptofano	0,20	0,20	0,20	0,20
Cálcio, %	4,10	4,10	4,10	4,10
Fósforo disponível, %	0,35	0,35	0,35	0,35
Sódio	0,15	0,15	0,15	0,15
Cloro, %	0,18	0,18	0,18	0,18
Potássio, %	0,63	0,63	0,63	0,63
<b>B. eletrolítico, mEq/kg</b>	<b>175,57</b>	<b>175,57</b>	<b>175,57</b>	<b>175,57</b>

<sup>1</sup>Aditivo adsorvente de micotoxinas: Aluminossilicato de sódio e cálcio (600 g/kg) e parede celular de levedura (400g/kg).

<sup>2</sup>Bacillus subtilis (mín): 1 x 10<sup>11</sup> CFU\*/lb (2,2 x 10<sup>8</sup> CFU/g); <sup>3</sup>Fitase (mín) 10.000 FTU/g. <sup>4</sup> Vitamina A (mín): 8.000,000 UI/kg, Vitamina D3 (mín):2.500,000 UI/kg, Vitamina E (mín): 6.00 UI/kg, Vitamina K3 (mín): 4.500 mg/kg, Vitamina B6 (mín): 2.000mg/kg, Vitamina B12 (mín) 12.000 mcg / kg, Niacina (mín): 15 g/kg, Pantotenato de cálcio (mín): 6.000 mg/kg, ácido fólico (mín): 400 mg/kg, Biotina (mín): 25 mg/kg. <sup>5</sup>Availa-ZMC (750g/ton): 40 mg/kg de Zn aminoácidos, 40 mg/kg de Mn aminoácidos 7 mg/kg de Cu aminoácidos. <sup>6</sup>Availa-Fe (400 g/ton): 40 mg/kg de Fe aminoácidos. <sup>7</sup> Valores analisados.

## ***Variáveis analisadas***

### ***Desempenho***

O consumo de ração (g/ave/dia), peso vivo (g), peso do ovo (g), massa de ovos (g/ave/dia), produção de ovos (%) e conversão alimentar (kg de ração/dúzia de ovos e kg de ração/kg de ovos) foram avaliados no ensaio. Os ovos foram coletados duas vezes ao dia, contabilizados e pesados.

O consumo de ração foi calculado considerando a quantidade de ração fornecida durante o período de sete dias, subtraindo as sobras e dividindo-se pelo número de aves alojadas por parcela. Para o cálculo da conversão alimentar em g/ave/dia, considerou-se o consumo médio do período dividido pela massa de ovos obtida no mesmo período. Já a conversão alimentar kg de ração/dúzia de ovos foi obtida dividindo-se o consumo médio de ração da parcela obtido no período, dividido pela dúzia de ovos produzida. A produção de ovos foi calculada como a razão entre o número de ovos produzidos e o número de aves alojadas, por período, multiplicado por 100. A massa de ovos (g/ave/dia) foi calculada multiplicando a produção de ovos pelo peso do ovo.

### ***Qualidade de Ovos***

Nos últimos três dias de cada período, três ovos foram selecionados por unidade experimental com base no peso médio, totalizando 24 ovos por tratamento, para avaliação do peso do ovo (PO, g), peso de albúmen (PA, g), peso da gema (PG, g), altura do albúmen (AA, mm), peso da casca (PC, g), espessura da casca (EC, mm) e percentagens de gema, albúmen, casca e unidade Haugh.

Os ovos foram identificados e pesados individualmente em balança semi-analítica com precisão de 0,01 g (Bel, modelo L 3102iH). A classificação dos ovos foi feita de acordo com o guia de cores da casca com uma escala de 1 a 8 (Zinpro Corporation, Eden Prairie, MN, USA), sendo os pantones 1, 2 e 3 considerados pálidos, 4 e 5 intermediários e a partir de 6 considerados vermelhos. Cada um dos pantones da guia de cores da casca foi submetido ao colorímetro Minolta (CR-410C), em que foi determinado o índice E [ $E=(L^2 + a^2 + b^2) 0,5$ , onde: L=luminosidade; a=coordenada vermelho/verde e b=coordenada amarelo/azul].

Para determinar a altura do albúmen, os ovos foram quebrados e seu conteúdo (albúmen + gema) colocado em uma superfície plana e nivelada. Em seguida, a altura do albúmen (mm) foi medida pela leitura do valor indicado pelo paquímetro digital. O cálculo de unidades Haugh (HU) foi feito utilizando as variáveis peso do ovo (W, g) e altura do albúmen (h, mm) através

da seguinte equação:  $UH=100 \log (h + 7,57 - 1,7w^{0,37})$  (CARD; NESHEIM, 1968). Posteriormente, as gemas foram separadas do albúmen e pesadas em balança de precisão de 0,01 g (Bel, modelo L 3102iH). As cascas dos ovos, logo após a quebra, foram lavadas em água corrente para remoção de todo o resíduo de albúmen, e posteriormente secas ao ar por 48h antes de serem pesadas e terem a espessura medida em três pontos distintos na área transversal central usando um micrômetro de precisão (iGaging, San Clemente, CA, EUA).

As porcentagens de gema e casca foram calculadas em relação ao peso do ovo, enquanto o peso e a porcentagem de albúmen foram determinados como a diferença entre o peso do ovo e o peso da casca e da gema. Para a análise colorimétrica da gema, foi utilizado um leque de cores com escala de 1 a 15 (DSM). Para determinação da resistência da casca foram selecionados cinco ovos por unidade experimental de forma aleatória, totalizando 40 ovos por tratamento, os quais foram analisados pelo equipamento Digital Egg Teste DET 6000, marca NABEL<sup>®</sup>, que utilizando o método de compressão em baixa velocidade mede a resistência da casca no momento de sua quebra.

### ***Peso dos órgãos***

No final do período experimental, uma ave por parcela foi selecionada de acordo com o peso médio e, em seguida, eutanasiada para coleta das tíbias e do fígado das aves, os quais foram pesados em balança semi-analítica ( $\pm 0,01g$ ).

As tíbias direita e esquerda foram coletadas para análise de densidade e composição óssea, respectivamente. A tíbia direita foi dessecada no momento da coleta e armazenada em tubos falcon de 50 ml, contendo solução de formol a dez por cento até o momento da análise. As tíbias esquerdas foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e armazenados em freezer para posteriormente serem dissecadas e analisadas.

### ***Análise hormonal e bioquímica sérica***

No último dia do período experimental, amostras de sangue (5 ml) de uma ave por parcela foram coletadas. As amostras foram identificadas e centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos; em seguida, com auxílio de uma pipeta, coletaram-se 2 ml de soro, que foi armazenado em Eppendorfs e congelados em freezer até o momento das análises. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Produção Animal (BIOPA/DZ/UFRPE), no qual foram analisadas com relação às concentrações hormonais de corticosterona ( $\mu\text{m/ml}$ ), triiodotironina (T3,  $\mu\text{m/ml}$ ) e fosfatase alcalina (U/L). No momento da

análise, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, diluídas e preparadas de acordo com a metodologia descrita pelo kit comercial (BIOCLIN<sup>®</sup>) e, em seguida, submetidas à leitura em espectrofotômetro (Bioclin, Biolisa Reader).

### ***Resistência Óssea***

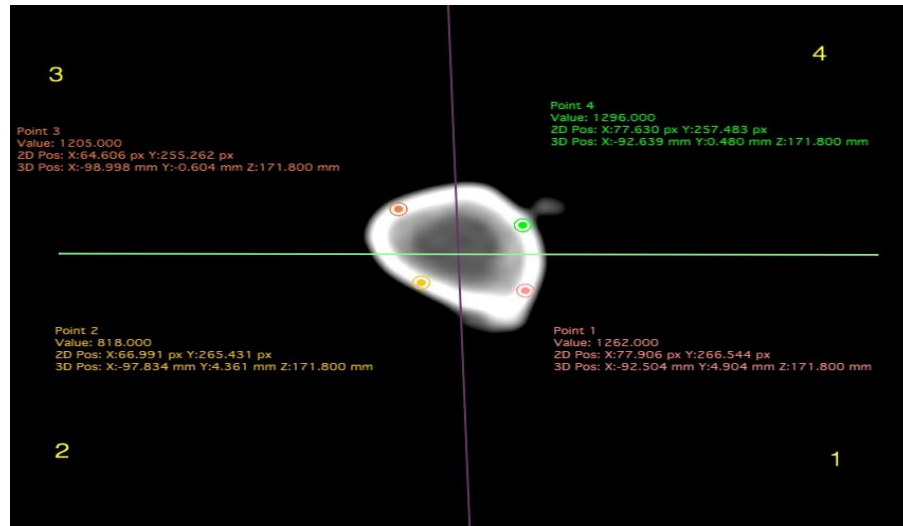
As tíbias esquerdas foram descongeladas e os tecidos envolventes foram retirados sem provocar injúrias na estrutura óssea. Em seguida, pesadas em balança semi-analítica ( $\pm 0,01\text{g}$ ) e seu comprimento medido com auxílio de um paquímetro digital (capacidade de 0 a 150 mm e precisão de 0,01 mm).

As análises de resistência óssea foram realizadas no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA, Universidade Federal da Paraíba -UFPB) com as tíbias *in natura*, utilizando um texturômetro (Texture Analyser - TA XT Plus Texture Analyzer). Os ossos foram posicionados de forma idêntica sob dois suportes com espaço entre eles de 30 mm e um programa computacional registrou a força (kgf) necessária para que ocorresse a quebra total do osso.

### ***Densitometria Computadorizada***

A tomografia computadorizada foi realizada em cinco tíbias por tratamento através do equipamento Hi-Speed FXI CT scanner (General Electric, Fairfield, CT 06824, USA) pertencente ao laboratório FOCUS. Os ossos foram retirados da solução de formaldeído e as tíbias foram separadas por tratamento e posicionadas lado a lado para aquisição das imagens. Imagens transversais foram adquiridas a partir de cortes seccionais de 2 mm de espessura em um intervalo de reconstrução de 1 mm, 120 kV e corrente de tubo automática (mA) na velocidade de uma rotação por segundo.

Posteriormente, as imagens foram analisadas com o Software Dicom (versão 1.1.7, Horos, Purview, Annapolis, MD 21401, EUA) para a estimativa dos valores individuais de radiodensidade óssea em 3 níveis de corte distintos da diáfise (proximal, medial e distal). Cada região foi dividida em quatro quadrantes e uma região circular de interesse (ROI) selecionado para avaliação densitométrica do osso cortical (Figura 3). Os resultados foram dados em unidades Hounsfield (HU), sendo posteriormente corrigidos e convertidos  $\text{mg}/\text{cm}^3$  de hidroxiapatita de cálcio usando a equação  $\text{BMD} = 200 \text{ HU}_t / (\text{HU}_w - \text{HU}_b)$ , conforme metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2012) e Souza *et al.* (2018).



**Figura 2:** Imagem tomográfica em corte transversal da tíbia de galinha poedeira

### *Quantificação mineral*

#### *Obtenção e preparo das amostras para quantificação mineral*

##### *Gema dos ovos.*

Ao final do último ciclo de qualidade (aves com 93 semanas de idade) três gemas por unidade experimental (24 gemas por tratamento) foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos e congeladas em freezer a 20°C. Posteriormente foram descongeladas e homogeneizadas. No Laboratório de Nutrição Animal da UFRPE (LNA/UFRPE), uma amostra de 10 gramas de gema de cada repetição foi levada à estufa de ventilação forçada, onde foram secas a 105°C por 24 horas.

##### *Excretas.*

Uma semana antes do final do período experimental (aves com 92 semanas de idade) todas as gaiolas foram adaptadas com folha de papel craft sob o piso para proporcionar a coleta parcial das excretas frescas, a qual foi realizada durante dois dias consecutivos pelo horário da manhã (10h) e a tarde (15h). As amostras de excretas obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e congelados em freezer a -20°C até o momento da análise. Posteriormente, todas as amostras foram descongeladas e homogeneizadas por unidade experimental, em seguida encaminhadas ao Laboratório de Nutrição Animal (LNA/UFRPE), onde foram secas em estufa de circulação forçada a 105°C durante 24 horas. Logo após, as amostras foram moídas em moinho tipo bola e armazenadas em potes coletores até o momento da análise.

### ***Tíbia e Fígado.***

Ao final do período experimental, uma ave por parcela experimental (aves com 93 semanas de idade) foi selecionada de acordo com o peso médio de cada parcela e eutanasiadas por deslocamento cervical para coleta das tíbias e órgãos. As tíbias esquerdas foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos previamente identificados; do mesmo modo, os fígados coletados foram armazenados em potes coletores e ambos (tíbias e fígados) foram congelados em freezer a -20°C até o momento da análise.

As tíbias e os fígados foram encaminhados ao LNA/UFRPE onde foram descongelados, as tíbias dessecadas e colocadas em cadinhos identificados de acordo com cada tratamento, e os fígados colocados em placas de petri e fragmentados para permitir secagem completa da amostra; ambas as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 105°C durante 24 horas. As tíbias, posteriormente, foram calcinadas em mufla a 600°C durante 4 horas para obtenção das cinzas (YAN; WALDROUP, 2006).

### ***Digestão e quantificação dos minerais nas amostras***

Após a obtenção das amostras secas de gema, fígado e excretas foram pesados 0,5 gramas de cada amostra em balança analítica ( $\pm 0,0001g$ ) e digerida com 6 ml de HNO<sub>3</sub> (65%) em forno micro-ondas (*Mars Xpress: Thechnology Inside, CEM Corporation*), por 30 minutos a 160 °C. A solução obtida foi filtrada em papel filtro quantitativo faixa azul e diluídas com água deionizada até atingirem o volume referente a 25ml. Para as tíbias, amostras de 0,5 gramas foram pesadas e digeridas em sistema aberto com 6ml de HNO<sub>3</sub> (65% PA) por 10 minutos. Após este intervalo, as amostras passaram pelo mesmo processo de filtragem e diluição citadas anteriormente para as demais amostras.

As quantificações dos minerais (Zn, Mn, Cu, Fe, Ca e P) nas amostras foram realizadas no Laboratório de Química Ambiental de Solos da UFRPE através do espectrofotômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (*Optima 7000 DV ICP-OES, PerkinElmer*).

### ***Análise Estatística***

As hipóteses de normalidade e homocedasticidade foram testadas para a análise de variância. O seguinte modelo estatístico foi utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \beta_j\gamma_k + e_{ijk}$$

Em que:  $Y_{ijk}$  é a resposta na unidade de observação;  $\mu$  é a média geral esperada da variável resposta;  $\alpha_i$  é o efeito diferencial atribuível ao tratamento de controle  $i$ ;  $\beta_j$  é o efeito diferencial atribuível ao tratamento de ZMC  $i$ ;  $\gamma_k$  é o efeito diferencial atribuível ao tratamento de Fe  $i$ ;  $\beta_j\gamma_k$  é a interação entre o efeito atribuível aos tratamentos ZMC $i$  e Fe $j$  e  $e_{ijk}$  é o erro aleatório associado à unidade experimental  $j$  no grupo de tratamento  $i$ . Os dados foram analisados pelo procedimento PROC GLM do software Statistical Analysis System versão 9.2 (SAS, 2009). No caso das diferenças, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### *Desempenho e qualidade de ovos*

Os resultados obtidos para variáveis de desempenho produtivo estão apresentados na Tabela 3. Não foram observados efeito de interação ( $P > 0.05$ ) para as variáveis de desempenho produtivo analisadas; entretanto, ao considerar os fatores de forma isolada observou-se que as aves quando suplementadas parcialmente com fontes MCA- ZMC desde a FC apresentaram 27,16 g a mais no peso corporal ( $P=0.038$ ) e um incremento no consumo de ração de 0,84 mg ( $P=0.012$ ). Ao considerar a suplementação parcial apenas durante a FP identificou-se que a suplementação parcial com MCA-ZMC ou MCA-Fe apresentaram aumentos no consumo de ração de 1,36 e 2,15 g em relação às aves suplementadas apenas com fontes MI ( $P < 0.001$ ), não sendo verificadas alterações no consumo entre as aves suplementadas com fontes MI e MCA-ZMCFe. Para as variáveis peso do ovo (PO, g), massa de ovos (MO, g ave dia<sup>-1</sup>), percentual de postura e conversão alimentar (CA, kg kg<sup>-1</sup>, dúzia) não foram verificados efeito de interação ( $P > 0.05$ ) nem efeito dos fatores isolados.

**Tabela 3.** Média do peso corporal (PC, kg), consumo de ração (CR, g/ave/dia), peso do ovo (PO, g), massa de ovos (MO, g/ave/ dia), conversão alimentar (CA, kg/kg de ovos, CAD kg/dúzia de ovos) e percentual de postura (PP%) de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas com fontes minerais complexadas a aminoácidos das 50 às 93 semanas de idade

Fase Crescimento	Fase Produção	PC g	CR g/ave/dia	PP %	PO g	MO g/ave	CA kg/kg	CAD kg/dz
MI		1.881,18 <sup>b</sup>	109,77 <sup>b</sup>	88,08	66,82	58,93	1,872	1,498
MCA-ZMC		1.908,34 <sup>a</sup>	110,61 <sup>a</sup>	87,59	67,32	59,07	1,870	1,513
	MI	1.880,02	109,15 <sup>b</sup>	87,60	67,50	59,42	1,842	1,496
	MCA-ZMC	1.888,46	110,51 <sup>a</sup>	86,87	67,20	58,37	1,891	1,522
	MCA-ZMC+Fe	1.913,20	109,93 <sup>b</sup>	88,26	66,96	59,08	1,863	1,498
	MCA-Fe	1.897,36	111,30 <sup>a</sup>	88,65	66,75	59,27	1,883	1,510
MI	MI	1.852,30	108,32	88,91	66,80	59,57	1,825	1,457
	MCA-ZMC	1.885,40	109,87	87,11	67,23	58,61	1,881	1,517
	MCA-ZMC+Fe	1.910,70	109,74	88,13	67,07	59,19	1,860	1,499
	MCA-Fe	1.876,30	111,37	88,17	66,24	58,42	1,918	1,519
MCA-ZMC	MI	1.907,70	109,99	86,44	68,08	59,31	1,855	1,530
	MCA-ZMC	1.891,50	111,15	86,66	67,16	58,19	1,899	1,528
	MCA-ZMC+Fe	1.915,70	110,12	88,37	66,82	58,97	1,866	1,496
	MCA-Fe	1.918,40	111,26	89,07	67,34	60,12	1,854	1,590
P-Value	FC	0,0389	0,012	0,615	0,060	0,758	0,918	0,356
	FP	0,3109	<0,001	0,540	0,378	0,664	0,456	0,635
	FCxFP	0,4053	0,184	0,567	0,109	0,606	0,520	0,265
	SEM	6,63	0,191	0,430	0,141	0,303	0,011	0,008

<sup>A, b</sup> Valores com diferentes letras diferem significativamente ( $P < 0.05$ ). SEM: Erro padrão da média.

Os resultados obtidos para as variáveis de qualidade dos ovos apresentados na Tabela 4 demonstraram efeito de interação ( $P < 0.01$ ) para cor da gema e espessura de casca dos ovos ( $P = 0.018$ ) a partir da suplementação parcial dos complexos minerais de Zn, Mn e Cu fornecidos desde a FC. A partir do desdobramento da interação (Tabela 4) identificou-se que a suplementação parcial dos complexos de Zn, Mn, Cu (MCA) desde a FC promoveram gemas de ovos mais claras ( $P=0.018$ ) quando durante a FP foram suplementadas com fontes MCA-ZMCFe.

Ao analisar o desdobramento da interação ( $P = 0.018$ ) para espessura de casca (Tabela 4), observou-se que as aves suplementadas com fontes MI durante a FC apresentam maior espessura de casca quando durante a FP foram suplementadas parcialmente com qualquer das dietas contendo complexos minerais (MCA-ZMC, MCA-ZMCFe e MCA-Fe), e quando suplementadas desde a FC com MCA aumentaram a espessura da casca dos ovos apenas quando permanecem consumindo parcialmente fontes MCA-ZMC associado ao MCA-Fe. As demais variáveis de qualidade dos ovos não foram influenciadas ( $P>0,05$ ) pelos tratamentos experimentais.



### ***Variáveis ósseas***

As médias obtidas para as variáveis ósseas encontram-se representadas na Tabela 5, não sendo identificado efeito de interação entre as variáveis peso relativo da tíbia ( $P=0,556$ ), comprimento de tíbia ( $P=0,060$ ), largura da tíbia ( $P=0,345$ ) e resistência óssea ( $P=0,141$ ). Aves suplementadas durante FC com dietas contendo MCA-ZMC apresentaram menor peso relativo da tíbia quando comparadas às aves que consumiram dietas com MI ( $P=0,025$ ).

Houve efeito da interação ( $P<0.001$ ) para variável de densitometria óssea das tíbias avaliadas (Tabela 6). A partir da análise fatorial e desdobramento das interações identificou-se que a suplementação parcial com MCA desde a FC promoveu tíbias com maiores médias de densidade óssea ( $P<0.01$ ) quando durante a FP foram suplementadas MCA-ZMCFe ( $1467,20 \text{ mg/cm}^3$ ) e MCA-Fe ( $1421,25 \text{ mg/cm}^3$ ). Aves suplementadas com MI durante a FC e que durante a FP foram suplementadas com MCA-ZMCFe ou MCA-Fe tiveram médias de densidade óssea mais baixas ( $907,95 \text{ mg/cm}^3$  e  $778,61 \text{ mg/cm}^3$ , respectivamente).

Ao analisar a suplementação mineral durante a FP não foram identificadas alterações nas densidades ósseas das aves suplementadas com fontes MI durante a FC e que consumiram durante a FP fontes MI ou MCA. Entretanto, maiores médias para densidade foram observadas em ossos de aves que consumiram na FC dietas contendo MCA e que durante a FP consumiram dietas contendo MCA-ZMCFe ou MCA-Fe.

**Tabela 4.** Valores médios dos escores de coloração (SC), peso do ovo (PO, g), peso de albúmen (PA, g), altura de albúmen (AA, mm), peso de gema (PG, g), cor de casca (CC), peso de casca (PC, g), espessura de casca (EC, mm), Unidade Haugh (HU), percentual de gema (GE), albúmen (AL), casca (CA) e resistência de casca (RSC, kgf) de galinhas poedeiras suplementadas com fontes minerais complexadas a aminoácidos

Fase Crescimento	Fase Produção	SC 0-5	PO g	PA g	AA mm	PG g	CG 1 a 15	CC	PC g	EC mm	UH	GE %	AL %	CA %	RSC kgf
MI		3,25	65,80	43,20	5,89	16,46	5,64	75,25	6,31	0,459	73,23	24,90	65,70	9,57	4,05
MCA-ZMC		3,21	66,05	43,28	5,84	16,57	5,64	75,44	6,29	0,458	72,46	25,07	65,54	9,54	4,00
	MI	3,12	65,72	43,18	5,91	16,52	5,67	75,13	6,30	0,441 <sup>b</sup>	73,13	24,98	65,75	9,59	3,98
	MCA-ZMC	3,18	66,07	43,20	5,85	16,61	5,64	75,58	6,35	0,464 <sup>a</sup>	72,92	25,04	65,57	9,59	4,05
	MCA-ZMC+Fe	3,12	66,09	43,33	5,93	16,53	5,62	75,44	6,28	0,467 <sup>a</sup>	73,23	25,02	65,52	9,50	4,02
	MCA-Fe	3,50	65,85	43,26	5,78	16,41	5,64	75,25	6,26	0,464 <sup>a</sup>	72,08	24,91	65,64	9,54	4,05
	MI	3,00	65,56	43,09	5,97	16,49	5,62 <sup>Aa</sup>	75,07	6,30	0,437 <sup>Ab</sup>	73,70	24,90	65,71	9,63	4,02
	MCA-ZMC	3,25	65,96	43,07	5,88	16,54	5,67 <sup>Aa</sup>	75,75	6,43	0,467 <sup>Aa</sup>	73,76	24,91	65,77	9,67	4,15
	MCA-ZMC+Fe	3,00	66,30	43,59	5,95	16,58	5,69 <sup>Aa</sup>	74,97	6,25	0,463 <sup>Aa</sup>	73,35	25,02	65,65	9,41	3,99
	MCA-Fe	3,62	65,40	43,05	5,77	16,23	5,59 <sup>Aa</sup>	75,20	6,27	0,471 <sup>Aa</sup>	72,21	24,79	65,72	9,59	4,03
	MI	3,25	65,87	43,27	5,85	16,55	5,73 <sup>Aa</sup>	75,19	6,31	0,445 <sup>Ab</sup>	72,58	25,07	65,81	9,56	3,94
	MCA-ZMC	3,12	66,17	43,32	5,82	16,68	5,61 <sup>Aab</sup>	75,42	6,27	0,460 <sup>Ab</sup>	72,19	25,17	65,41	9,51	3,95
	MCA-ZMC+Fe	3,25	66,89	43,09	5,91	16,49	5,55 <sup>Ab</sup>	75,86	6,32	0,471 <sup>Aa</sup>	73,11	25,02	65,41	9,58	4,03
	MCA-Fe	3,37	66,30	43,48	5,80	16,58	5,69 <sup>Aab</sup>	75,31	6,26	0,456 <sup>Ab</sup>	71,96	25,03	65,57	9,50	4,07
	FC	0,913	0,372	0,733	0,469	0,279	0,993	0,301	0,649	0,590	0,129	0,246	0,248	0,479	0,315
	FP	0,546	0,739	0,966	0,359	0,597	0,627	0,326	0,238	< 0,001	0,353	0,919	0,724	0,398	0,730
	FCxFP	0,793	0,409	0,510	0,873	0,508	0,004	0,149	0,150	0,018	0,739	0,913	0,734	0,056	0,289
	SEM	0,084	0,135	0,113	0,031	0,051	0,015	0,095	0,015	0,002	0,251	0,069	0,069	0,023	0,025

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a forma de suplementação durante a FC. <sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a fonte mineral suplementada durante a FP. Análise pelo teste de Tukey (P < 0,05).

**Tabela 5.** Média do peso relativo das tíbias (PR), comprimento (CP), espessura (ES) e resistência óssea (RO) de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, MN, Cu e Fe ao final da fase de produção

Fase Crescimento	Fase Produção	PR %	CP mm	ES mm	RO Kgf
MI		0,54 <sup>a</sup>	113,20	6,56	23,77
MCA-ZMC		0,52 <sup>b</sup>	112,55	6,47	24,75
	MI	0,53	112,34	6,50	23,74
	MCA-ZMC	0,54	113,32	6,55	25,15
	MCA-ZMC+Fe	0,53	112,61	6,63	24,75
	MCA-Fe	0,53	113,12	6,36	22,66
MI	MI	0,53	112,39	6,68	23,86
	MCA-ZMC	0,56	114,51	6,56	27,22
	MCA-ZMC+Fe	0,54	111,30	6,66	23,46
	MCA-Fe	0,54	114,46	6,28	20,55
MCA-ZMC	MI	0,53	112,31	6,35	24,87
	MCA-ZMC	0,52	111,95	6,54	23,08
	MCA-ZMC+Fe	0,52	113,93	6,60	26,05
	MCA-Fe	0,52	111,96	6,42	25,07
P-Value	FC	0,025	0,410	0,355	0,472
	FP	0,568	0,836	0,271	0,600
	FCxFP	0,556	0,060	0,345	0,141
	SEM	0,004	0,397	0,046	0,684

<sup>a, b</sup> Valores seguidos por diferentes letras diferem significativamente (P < 0.05). SEM: Erro padrão da média

**Tabela 6.** Valores médios de radiodensidade das diferentes regiões da tíbia de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção

Fase Crescimento	Fase Produção	Diáfise			Médias
		Proximal	Média	Distal	
MI		814,47 <sup>b</sup>	890,88 <sup>b</sup>	916,16 <sup>b</sup>	878,95 <sup>b</sup>
MCA-ZMC		1.046,28 <sup>a</sup>	1.148,69 <sup>a</sup>	1.170,38 <sup>a</sup>	1113,78 <sup>a</sup>
	MI	801,65 <sup>b</sup>	858,02 <sup>b</sup>	919,72 <sup>b</sup>	855,48 <sup>b</sup>
	MCA-ZMC	857,47 <sup>b</sup>	929,95 <sup>b</sup>	932,60 <sup>b</sup>	918,44 <sup>b</sup>
	MCA-ZMC+Fe	1.038,45 <sup>a</sup>	1.153,66 <sup>a</sup>	1.188,62 <sup>a</sup>	1.126,91 <sup>a</sup>
	MCA-Fe	1.009,37 <sup>a</sup>	1.137,49 <sup>a</sup>	1.107,07 <sup>a</sup>	1.084,65 <sup>a</sup>
MI	MI	746,45 <sup>Aa</sup>	850,80 <sup>Aa</sup>	951,65 <sup>Aa</sup>	849,63 <sup>Aa</sup>
	MCA-ZMC	913,00 <sup>Aa</sup>	964,10 <sup>Aa</sup>	1020,05 <sup>Aa</sup>	979,61 <sup>Aa</sup>
	MCA-ZMC+Fe	876,10 <sup>Ba</sup>	937,70 <sup>Ba</sup>	910,05 <sup>Ba</sup>	907,95 <sup>Ba</sup>
	MCA-Fe	742,05 <sup>Ba</sup>	810,90 <sup>Ba</sup>	782,90 <sup>Ba</sup>	778,61 <sup>Ba</sup>
MCA-ZMC	MI	856,85 <sup>Ab</sup>	865,25 <sup>Ab</sup>	879,81 <sup>Ab</sup>	861,33 <sup>Ab</sup>
	MCA-ZMC	801,94 <sup>Ab</sup>	895,80 <sup>Ab</sup>	845,15 <sup>Ab</sup>	857,26 <sup>Ab</sup>
	MCA-ZMC+Fe	1.200,80 <sup>Aa</sup>	1.369,61 <sup>Aa</sup>	1.467,20 <sup>Aa</sup>	1.345,87 <sup>Aa</sup>
	MCA-Fe	1.276,70 <sup>Aa</sup>	1.464,08 <sup>Aa</sup>	1.421,25 <sup>Aa</sup>	1.390,67 <sup>Aa</sup>
P-Value	FC	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	FP	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	FCxFP	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	SEM	34,86	40,56	50,93	37,57

<sup>A, B</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a forma de suplementação durante a FC.  
<sup>a, b</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a fonte mineral suplementada durante a FP. Análise pelo teste de Tukey (P < 0.05).

### *Variáveis sanguíneas*

Observou-se (Tabela 7) efeito de interação ( $P = 0,010$ ) para variável sanguínea fosfatase alcalina (FA, U/L). A partir do desdobramento da interação verificou-se que as aves suplementadas com MI durante a FC apresentaram maior atividade da FA (4,135 UI/L) quando consumiram durante a FP dietas contendo MCA-ZMCFe. Não sendo verificadas alterações na atividade da FA entre as fontes minerais (MI ou MCA). Para as demais variáveis analisadas (corticosterona e T3) não foram identificados efeito significativo ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 7.** Valores médios dos níveis de corticosterona (CT), triiodotironina (T3) e atividade da fosfatase alcalina (FA) no plasma sanguíneo de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção

Fase	Fase	CT	T3	FA
Crescimento	Produção	µg/ml		U/L
MI		1,587	1,390	3,698
MCA-ZMC		1,732	1,258	3,499
	MI	1,592	1,368	3,605
	MCA-ZMC	1,924	1,427	3,653
	MCA-ZMC+Fe	1,558	1,283	3,722
	MCA-Fe	1,589	1,255	3,400
	MI	1,292	1,363	3,426 <sup>abA</sup>
	MCA-ZMC	1,730	1,567	3,894 <sup>abA</sup>
	MCA-ZMC+Fe	1,433	1,231	4,135 <sup>aA</sup>
	MCA-Fe	1,807	1,392	3,308 <sup>bA</sup>
	MI	1,841	1,372	3,814 <sup>aA</sup>
	MCA-ZMC	2,091	1,202	3,411 <sup>aA</sup>
	MCA-ZMC+Fe	1,651	1,335	3,308 <sup>aB</sup>
	MCA-Fe	1,371	1,098	3,528 <sup>aA</sup>
	FC	0,291	0,073	0,217
P-Value	FP	0,339	0,502	0,502
	FCxFP	0,165	0,083	0,010
	SEM	0,083	0,039	0,076

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a forma de suplementação durante a FC. <sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a fonte mineral suplementada durante a FP. Análise pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### *Composição mineral*

Não foram observados efeitos de interação ( $P > 0,005$ ) para as concentrações de Zn, Mn, Cu e Fe na tíbia (Tabela 8), fígado (Tabela 9) e gema dos ovos (Tabela 10) das aves suplementadas com diferentes fontes minerais durante as fases de crescimento (FC) e produção (FP). Entretanto, ao analisar os fatores de forma isolada pode-se observar que aves suplementadas com fontes minerais inorgânicas (MI) durante a fase de crescimento (FC)

apresentaram maiores concentrações de cálcio (Ca) na tíbia ( $P = 0,018$ ) em relação às aves suplementadas com minerais complexados a aminoácidos (MCA).

No fígado (Tabela 9), pode-se verificar que as aves não modificaram as concentrações de Fe ( $P > 0,05$ ) quando foram suplementadas com fontes de MI ou quando suplementadas com MCA (ZMC, ZMC+Fe ou Fe) durante as fases iniciais de criação. Entretanto, podem-se verificar modificações nas concentrações deste mineral entre as fontes minerais complexadas a aminoácidos (MCA) durante a FP, sendo observadas maiores concentrações de Fe quando as aves consumiram MCA-ZMC+Fe (264,17 mg/kg) ou quando foram suplementadas apenas com MCA-Fe (222,05 mg/kg). Apesar da suplementação das aves com MCA-Fe não ter diferido das aves suplementadas com MCA-ZMC (209,27 mg/kg), pode-se observar uma diferença na deposição de Fe entre esses grupos de 12,78 mg/kg. Do mesmo modo que o ferro, as concentrações de cálcio no fígado também demonstram ser influenciadas apenas de acordo com a suplementação das fontes minerais complexadas a aminoácidos, sendo observadas maiores concentrações de Ca no fígado ( $P = 0,021$ ) para as aves suplementadas com MCA-ZMC+ Fe (0,47 g/kg), e menores concentrações quando suplementadas com MCA-Fe (0,34 g/kg). Ao considerar as concentrações de Cu, observou-se que aves suplementadas com MCA durante a FC tenderam ( $P = 0,065$ ) a aumentar as concentrações de Cu no fígado, sendo observada uma retenção de 0,87 mg/kg a mais que as aves suplementadas com MI.

Na gema dos ovos (Tabela 10), verificou-se que as aves suplementadas com fontes MCA-ZMC+Fe apresentaram maiores concentrações de Mn (2,46 mg/kg) ( $P = 0,007$ ), seguida das aves suplementadas com MCA-Fe (2,26 mg/kg); entretanto, este último não diferiu entre as fontes MI (2,11 mg/kg) e MCA-ZMC (2,21 mg/kg). De forma geral, observou-se que a suplementação a partir de complexos minerais contribuíram para aumentar as concentrações de Mn na gema em 0,35, 0,15 e 0,10 mg/kg, respectivamente, para MCA- ZMC+Fe, MCA-Fe e MCA-ZMC quando comparado às aves suplementadas com MI.

**Tabela 8.** Composição mineral da tíbia de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção

Fase	Fase	Ash	Zn	Mn	Cu	Fe	Ca	P
Crescimento	Produção	%	mg/kg			g/kg		
MI		45,81	341,50	17,81	0,68	113,44	405,16 <sup>a</sup>	182,10
MCA-ZMC		47,25	350,00	17,41	0,69	122,94	396,65 <sup>b</sup>	181,70
	MI	45,43	336,90	17,02	0,59	111,07	399,72	183,32
	MCA-ZMC	48,32	351,40	18,54	0,72	117,18	396,48	180,11
	MCA-ZMC+Fe	44,98	342,70	17,63	0,76	124,80	403,50	183,11
	MCA-Fe	47,16	350,90	17,27	0,65	119,15	402,10	181,04
	IM	44,73	329,10	16,08	0,64	114,95	399,99	184,47
MI	MCA-ZMC	49,30	360,90	20,55	0,64	102,45	401,89	181,33
	MCA-ZMC+Fe	44,17	337,50	17,93	0,78	116,94	407,25	180,90
	MCA-Fe	44,66	338,10	16,73	0,66	118,27	408,91	182,96
	MI	46,28	344,00	17,83	0,53	107,74	399,48	182,33
MCA-ZMC	MCA-ZMC	47,21	343,30	16,53	0,81	130,07	392,42	179,18
	MCA-ZMC+Fe	45,80	347,60	17,36	0,74	130,92	400,17	185,08
	MCA-Fe	49,36	364,50	17,88	0,63	120,14	394,44	179,85
	FC	0,263	0,543	0,763	0,923	0,105	0,018	0,684
P-Value	FP	0,215	0,861	0,883	0,435	0,458	0,530	0,362
	Fase x Fonte	0,299	0,647	0,493	0,533	0,158	0,511	0,274
	SEM	0,640	0,000	0,671	0,038	2,826	1,670	0,716

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma tetras minúsculas na coluna não diferem entre a fonte mineral utilizada durante a FP. Análise pelo teste de Tukey (P <0,05).

**Tabela 9.** Composição mineral do fígado de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção

Fase Crescimento	Fase Produção	Zn	Mn	Cu	Fe	Ca	P
		mg/kg				g/kg	
MI		92,77	6,51	8,32	230,52	0,39	10,45
MCA-ZMC		98,27	6,82	9,19	241,37	0,40	10,12
	MI	94,77	6,97	8,59	247,90 <sup>ab</sup>	0,42 <sup>ab</sup>	10,54
	MCA-ZMC	91,53	6,55	8,46	209,27 <sup>b</sup>	0,36 <sup>ab</sup>	10,13
	MCA-ZMC+Fe	102,7	6,95	9,34	264,17 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	10,61
	MCA-Fe	92,41	6,22	8,61	222,05 <sup>ab</sup>	0,34 <sup>b</sup>	9,87
	MI	91,19	6,94	8,47	232,31	0,44	10,86
	MCA-ZMC	90,58	6,24	8,23	205,58	0,37	10,52
	MCA-ZMC+Fe	101,46	7,12	8,34	262,65	0,45	10,76
	MCA-Fe	87,92	5,73	8,24	219,77	0,32	9,75
	IM	98,38	7,00	8,74	265,72	0,40	10,18
	MCA-ZMC	92,86	6,82	8,60	212,51	0,35	9,79
	MCA-ZMC+Fe	104,09	6,77	10,49	265,69	0,49	10,47
	MCA-Fe	97,02	6,70	9,04	224,62	0,36	9,10
	FC	0,377	0,335	0,065	0,447	0,590	0,373
	FP	0,349	0,307	0,473	0,027	0,021	0,533
	FC x FP	0,971	0,502	0,483	0,880	0,919	0,816
	SEM	0,002	0,164	0,238	0,236	0,130	0,197

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma tetras minúsculas na coluna não diferem entre a fonte mineral utilizada durante a FP, Análise pelo teste de Tukey (P <0,05).

**Tabela 10.** Composição mineral da gema dos ovos de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção

Fase	Fase	Zn	Mn	Cu	Fe	Ca	P
Crescimento	Produção	mg/kg				g/kg	
MI		100,70	2,26	3,23	113,16	3,54	13,91
MCA-ZMC		101,27	2,26	3,20	114,60	3,51	14,03
	MI	101,36	2,11 <sup>b</sup>	3,26	113,64	3,50	13,91
	MCA-ZMC	100,86	2,21 <sup>b</sup>	3,16	111,59	3,50	13,87
	MCA-ZMC+Fe	99,84	2,46 <sup>a</sup>	3,24	112,52	3,51	13,97
	MCA-Fe	101,87	2,26 <sup>ab</sup>	3,19	117,61	3,58	14,10
	IM	100,80	2,06	3,31	114,01	3,50	13,83
	MCA-ZMC	101,09	2,26	3,22	110,29	3,52	13,90
	MCA-ZMC+Fe	99,42	2,43	3,25	113,57	3,53	13,89
	MCA-Fe	101,54	2,29	3,16	114,41	3,60	14,00
	MI	101,99	2,17	3,22	113,21	3,50	14,01
	MCA-ZMC	100,63	2,15	3,11	112,73	3,49	13,84
	MCA-ZMC+Fe	100,26	2,48	3,23	111,49	3,50	14,06
	MCA-Fe	102,21	2,24	3,24	120,81	3,57	14,21
	FC	0,558	0,995	0,599	0,636	0,585	0,275
	FP	0,450	0,007	0,690	0,295	0,476	0,481
	FC x FP	0,938	0,520	0,698	0,654	0,990	0,819
	SEM	0,458	0,007	0,030	0,010	0,000	0,054

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma tetras minúsculas na coluna não diferem entre a fonte mineral utilizada durante a FP, Análise pelo teste de Tukey (P <0,05).



Observou-se efeito de interação ( $P < 0,05$ ) para as concentrações de Mn e Ca nas excretas das aves suplementadas com diferentes fontes minerais durante as fases de crescimento e produção (Tabela 11).

**Tabela 11.** Composição mineral das excretas de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com minerais (Zn, Mn, Cu e Fe) complexados a aminoácidos durante a fase de produção

Fase Crescimento	Fase Produção	Zn	Mn	Cu	Fe	Ca	P
		mg/kg				g/kg	
MCA-ZMC	MI	326,46	250,98	33,53	558,67	71,26	5,98
	MCA-ZMC	339,68	266,16	34,75	613,66	72,93	6,61
	MI	337,69	251,43 <sup>ab</sup>	35,17	625,49	66,89	6,26
	MCA-ZMC	340,54	279,39 <sup>a</sup>	36,14	577,57	69,83	6,17
IM	MCA-ZMC+Fe	346,13	256,13 <sup>ab</sup>	36,12	681,57	73,76	6,64
	MCA-Fe	309,06	245,73 <sup>b</sup>	29,23	466,61	77,74	6,16
	MI	342,90	273,36 <sup>aA</sup>	36,79	688,42	70,06 <sup>aA</sup>	6,00
	MCA-ZMC	333,53	265,21 <sup>abB</sup>	35,06	424,06	71,92 <sup>aA</sup>	5,79
AACM-ZMC	MCA-ZMC+Fe	349,58	229,43 <sup>bB</sup>	38,76	823,07	59,83 <sup>abB</sup>	6,49
	MCA-Fe	287,68	236,12 <sup>abA</sup>	25,22	381,45	79,74 <sup>aA</sup>	5,77
	MI	332,48	229,50 <sup>bB</sup>	33,55	562,55	63,14 <sup>baA</sup>	6,53
	MCA-ZMC	347,54	295,60 <sup>aA</sup>	37,22	782,25	67,44 <sup>abA</sup>	6,55
P-Value	MCA-ZMC+Fe	343,54	276,16 <sup>aA</sup>	34,15	575,45	85,72 <sup>aA</sup>	6,75
	MCA-Fe	333,50	256,72 <sup>abA</sup>	33,81	563,92	75,50 <sup>abA</sup>	6,61
	FC	0,434	0,078	0,756	0,698	0,534	0,074
	FP	0,268	0,007	0,124	0,503	0,236	0,755
SEM	FC x FP	0,466	0,001	0,184	0,190	0,013	0,928
	SEM	6,890	4,590	1,190	53,510	2,070	0,160

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a forma de suplementação durante a FC, <sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a fonte mineral suplementada durante a FP, analise pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O desdobramento da interação (Tabela 11) para o Mn demonstrou uma redução de 46,93 e 30,29 mg/kg quando as aves provenientes da FC suplementadas com MI consumiram na dieta MCA-ZMC+Fe e MCA-ZMC, respectivamente, quando comparado às aves suplementadas com MCA desde a fase de crescimento e que receberam as mesmas suplementações durante a FP. Além disso, pode-se observar que a utilização de fontes MI durante a fase de crescimento elevou as concentrações de Mn nas excretas (43,86 mg/kg) das aves quando comparado aos animais suplementados com MCA durante a FC e que passaram a consumir MI durante a FP.

Ao analisar o efeito das fontes minerais sobre diferentes grupos de aves provenientes da FC (MI e MCA), identificou-se que a utilização das fontes MCA (ZMC e -ZMC+Fe) reduziram a excreção de Mn quando fornecido às aves provenientes da FC e que foram suplementadas inicialmente com MI, sendo a redução mais expressiva observada para as aves suplementadas com MCA-ZMC+Fe (43,93 mg/kg). Já as aves suplementadas com MCA desde a FC

apresentaram maiores concentrações de Mn na excreta ao serem suplementadas com MCA-ZMC, MCA-ZMC+Fe e MCA-Fe; no entanto, as concentrações de Mn nas excretas das aves suplementadas com MCA-Fe não diferiram das aves suplementadas com MI.

Para as concentrações de cálcio (Ca) nas excretas, o desdobramento da interação (Tabela 11) revelou redução de 25,89 g/kg, quando as aves foram suplementadas inicialmente (FC) com fontes MI e passaram a consumir MCA-ZMC+ Fe durante a fase de produção (FP).

Ao considerar o efeito das fontes minerais para os diferentes grupos de aves (MI e MCA) pode-se verificar que as aves suplementadas com fontes MCA durante a FC apresentaram maiores concentrações de Ca na excreta ao serem suplementadas durante a FP com MCA-ZMC+Fe, seguido dos tratamentos que consumiram MCA-ZMC e MCA-Fe; no entanto, estes dois últimos não diferiram das aves suplementadas com fontes MI.

## DISCUSSÃO

### *Desempenho e qualidade de ovos*

O principal resultado do nosso estudo foi a melhora da qualidade da casca dos ovos em 5,84% e melhor estrutura óssea das aves que consumiram MCA desde a FC até o período final de produção. Resultados importantes em se tratando de aves de postura comercial, já que uma proporção considerável dos ovos é perdida devido a problemas de qualidade de casca. De acordo com a pesquisa conduzida junto a indústrias produtoras de ovos, por Roland (1988), estas perdas podem variar de 13 a 20% ao longo de todo processo produtivo, sendo observado que as perdas relacionadas apenas a postura podem variar entre 6,73 à 10,72% (MERTENS *et al.*, 2006). Além disso, os resultados obtidos para qualidade óssea apoiam os resultados obtidos por Sousa *et al.* (2017a), que observaram melhorias na qualidade óssea de galinhas poedeiras (Hy-Line, com 88 semanas de idade) durante o segundo ciclo produtivo ao serem suplementadas com quelatos de Zn, Mn e Cu na dieta, e reiteram a ideia da manutenção da integridade neste tecido no final da fase produtiva, contribuindo para reduzir os riscos de fratura óssea nas aves, as quais impactam diretamente no bem-estar das aves (SANDILANDS, 2011) e, conseqüentemente, na produção.

Alguns estudos demonstram que a utilização de minerais complexados a moléculas orgânicas (aminoácidos) melhoram a performance de galinhas poedeiras (MABE *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2019) em virtude de sua maior capacidade de absorção, e maior biodisponibilidade em relação às fontes minerais inorgânicas (ARAÚJO *et al.*, 2019). Embora os metais proteínatos melhorem o desempenho produtivo das aves quando

suplementados na dieta das aves de postura (IDOWU *et al.*, 2011), é possível que a sua eficiência de absorção possa ser comprometida, pois o metal encontra-se ligado a uma proteína que terá de ser hidrolisada antes de ser absorvida, gerando fragmentos de peptídeos e aminoácidos, no qual o metal poderá estar ligado ou não. Tal característica não afeta as moléculas de metais aminoácidos, tendo em vista que a molécula formada é constituída de um íon de metal para um de aminoácido (Center for Food and Nutrition Policy (CFNP), 2002), tornando prontamente disponível para absorção. Gao *et al.* (2014) demonstraram que os MCA são absorvidos pela via de absorção de aminoácidos (amino acid pathway), em vez de usar os transportadores convencionais de minerais traço, e esta é a razão principal pela qual esta classe de microminerais tem a biodisponibilidade significativamente melhorada.

Sendo assim, é possível que aves suplementadas com MCA tenham apresentando um desenvolvimento fisiológico precoce, proporcionando às aves atingirem o máximo de seu desenvolvimento fisiológico de forma mais rápida em relação às aves suplementadas com fontes MI (PEREIRA *et al.* 2020), o que justifica o maior peso corporal e o incremento no consumo de ração observado nas aves suplementadas com MCA, já que quanto maior massa corporal, maior seria a demanda por nutrientes requisitada para manutenção das atividades metabólicas.

Isso nos leva a inferir que aves suplementadas com MI tenham necessitado de um maior período de tempo para atingirem o máximo de seu desenvolvimento fisiológico, uma vez que a utilização de complexos minerais de Zn, Mn, e Cu aumentam o ganho de peso das aves (MEDEIROS-VENTURA *et al.*, 2020), e antecipam o início da postura (PEREIRA *et al.*, 2020) quando utilizados durante as fases iniciais de crescimento. Não obstante, o aumento no consumo de alimento e peso das aves no final do período produtivo (93 semanas de idade) ao serem alimentadas com dietas contendo MCA durante a FC, e que permaneceram ou não consumindo MCA durante a FP, apresentaram consumo de ração e peso corporal próximos aos sugeridos pelo guia comercial da Lohmann Brown-Lite (115 g/ave/dia e 2090 kg).

A cor da gema dos ovos é influenciada diretamente pelo conteúdo de carotenoides presentes na dieta das aves (GARCIA *et al.*, 2002; HERNANDEZ, 2005), e a intensidade dessa coloração, apesar de não indicar maior valor nutricional do ovo, é um dos fatores determinantes para decisão de escolha pelo consumidor (GARCIA *et al.*, 2002). Os efeitos dos complexos minerais observado em nossos estudos para coloração das gemas, contradizem as respostas obtidas por outros autores, os quais não identificaram modificações na coloração com utilização de fontes microminerais ligadas a moléculas orgânicas (ENRY; ILES, 2006; PAIK *et al.*, 2009; ABEDINI *et al.*, 2018; RAMOS-VIDALES *et al.*, 2019; SALEH *et al.*, 2019; DARVISHI *et*

*al.*, 2020). Apesar da resposta significativa, os valores observados não demonstram impactar no aspecto visual das gemas, uma vez que as variações na coloração obtidas foram inferiores a 1 (0,18) ao serem comparados com os scores de coloração do leque colorimétrico (DSM, escala 1 a15), tornando essa variação basicamente imperceptível.

Um dos maiores problemas enfrentados dentro do sistema de produção de ovos é a redução da espessura da casca com o avanço da idade das aves (PARK; SOHN, 2018; CROSARA *et al.*, 2019). Considerando esse fato, torna-se fundamental a utilização de práticas de manejo nutricional que possam reduzir esses impactos dentro do sistema de produção. Em nossos estudos verificamos que a suplementação de dietas de poedeiras com MCA promoveu melhora na ossificação e manutenção da integridade esquelética de galinhas até o final do ciclo de vida, fazendo com que, ainda que em idade avançada, os lotes possam produzir ovos com melhor qualidade de casca.

Estudos demonstraram que o complexo Zn-Met reduziu o estresse oxidativo quando fornecido na dieta das aves (LI *et al.*, 2019; DE GRANDE *et al.*, 2020). Minerais traço são componentes chaves de complexos enzimáticos antioxidantes, tais como glutathiona peroxidase (GSH – Px) que tem como cofator o Se, e os complexos superóxido dismutase de Cu e Zn (Cu/Zn SOD) e superóxido dismutase de Mn (Mn SOD) (HARRIS, 1992).

Entre os diferentes órgãos do corpo, o intestino é um dos que atuam como uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como intermediários reativos de oxigênio (ROI), esses são subprodutos normais do metabolismo e benéficos para vários processos fisiológicos quando produzidos em quantidades baixas ou moderadas. Apesar da barreira protetora presente na camada epitelial, diversos fatores podem ultrapassá-la causando processos inflamatórios que contribuem, ainda mais, para o estresse oxidativo, levando a doenças gastrointestinais malignas e doenças inflamatórias intestinais (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

Desse modo, é possível que a substituição parcial das fontes minerais inorgânicas pelos MCA tenha diminuído os efeitos do estresse oxidativo, reduzindo as interações negativas dos radicais livres sobre a integridade das células intestinais que, conseqüentemente, podem ter contribuído para maior aproveitamento dos elementos da dieta utilizados para formação da casca dos ovos.

Considerando a utilização do complexo Fe aminoácidos (MCA-Fe), não ficou claro quais os efeitos do Fe para melhoria da espessura da casca. Geralmente, a suplementação de Fe na forma de complexo ou proteinato em dietas para galinhas poedeiras de ovos marrons (100 mg/kg de dieta) contribuem significativamente para coloração das cascas dos ovos e resistência

(PARK *et al.*, 2004; PAIK *et al.*, 2009; SEO *et al.*, 2010). O efeito na cor da casca é o resultado da reciclagem das hemácias, as quais dão origem às porfirinas que são depositadas na casca através das células superficiais da glândula da casca (KARUNAJEEWA *et al.*, 1989) e a suplementação de Fe na dieta aumenta a síntese e a degradação dos eritrócitos, resultando no aumento da cor, já a resistência pode ser uma resposta da redução nas interações entre Fe suplementar e outros minerais como Ca, P, Cu, Zn e Mg que podem influenciar a resistência da casca dos ovos (PARK *et al.*, 2004; SEO *et al.*, 2010).

Embora não tenham sido observados efeitos significativos para resistência e coloração da casca dos ovos, é provável que a utilização do Fe na forma de complexo mineral, mesmo que em substituição parcial, possa ter contribuído para reduzir a ocorrência de interações antagônicas entre os elementos minerais presentes na dieta das aves. Portanto, a redução nas interações pode ter proporcionado um maior aproveitamento dos elementos minerais para formação da casca dos ovos, os quais refletiram diretamente na espessura.

Mabe *et al.* (2003) comentaram que a suplementação dietética com MCA reduz os efeitos negativos da idade sobre a qualidade dos ovos. O presente estudo reforça essa observação, mas um aspecto importante a ressaltar é o que a preparação do esqueleto cortical da pintainha é um fator primordial para constituir uma boa galinha poedeira em sua fase adulta e em idades mais avançadas de postura. Produzir ovos com galinhas longevas e com cascas de ovos de qualidade é um projeto lucrativo para as indústrias de ovos.

### ***Variáveis ósseas***

O osso é um tipo de tecido conjuntivo constituído por uma porção inorgânica ou mineral formada por fosfato de cálcio e outra porção formada por uma matriz orgânica, em que os microminerais como Zn, Cu e Mn desempenham importante papel em sua síntese, atuando como cofatores enzimáticos (NUNES *et al.*, 2013). Em galinhas poedeiras a qualidade óssea é fundamental para processo produtivo, isso porque parte dos minerais utilizados para formação da casca serão provenientes dos ossos. Sendo assim, a nutrição atua como um importante fator para o desenvolvimento e manutenção da massa óssea (DELLA PEPA; BRANDI, 2016).

Identificamos neste estudo que a suplementação parcial com MCA-ZMC durante a FC proporcionou menor peso relativo da tíbia das galinhas às 93 semanas sem influenciar o peso absoluto da tíbia e as características de comprimento, espessura e resistência óssea. Acreditamos que a resposta obtida de menor peso relativo da tíbia de galinhas alimentadas durante a FC com MCA possa estar diretamente relacionada ao maior peso corporal das aves (P=0.038) obtido no final do período experimental, tendo a maior massa corporal influenciado

diretamente a proporção das tíbias avaliadas, tendo em vista que o peso absoluto das tíbias não apresentou alterações significativas. Outro aspecto importante a ser elucidado é que o peso da tíbia *per se* pode não ser uma boa medida de qualidade óssea, pois mesmo pesando menos, os ossos destas galinhas mostraram melhor ossificação, medido por densitometria óssea, que é uma das medidas mais acuradas de ossificação (ONYANGO *et al.*, 2003).

Há variação de respostas à suplementação com minerais ligados a moléculas orgânicas na literatura (SOUSA *et al.*, 2017b; MIN *et al.*, 2019). Sendo assim, foi protocolado neste estudo, em vez de medir apenas as variáveis ósseas comumente analisadas (comprimento, peso absoluto e relativo, resistência), avaliamos também os ossos por meio da densitometria óssea, considerando sua precisão.

Embora uma ampla variedade de elementos minerais como Zn, Mn, Cu, Fe, B e Si estejam relacionados à formação e manutenção do tecido ósseo (PEPA *et al.* 2016), a resposta obtida em nossos estudos parece estar diretamente relacionada à ação do Fe no metabolismo ósseo. Tsay *et al.* (2010) demonstraram que altas concentrações de Fe no organismo promoveram aumento da reabsorção óssea e estresse oxidativo em ratos.

O osso é um tecido que está em formação e deformação durante todo o ciclo de vida dos seres que possuem esqueleto. A homeostase óssea é um processo complexo, em que os osteoclastos removem tecido ósseo e os osteoblastos tornam a formá-lo. De acordo com Balogh *et al.* (2018), o Fe tem um papel importante neste delicado equilíbrio entre formação e deformação óssea. Tanto a sobrecarga quanto a deficiência de Fe podem gerar ação de osteoclastos, provocando perda óssea. Então, a exigência de Fe é a homeostase óssea exige níveis ótimos, não tão altos e nem tão baixos de Fe.

As aves apresentam em sua biologia óssea modificações durante o início da maturidade sexual que as diferenciaram das demais espécies de animais. Essas modificações consistem na alteração da função dos osteoblastos responsáveis pela formação do tecido do tecido ósseo cortical lamelar e que passam a dar origem a um novo tecido ósseo medular.

Esse novo tecido apresenta a mesma densidade do tecido ósseo estrutural; entretanto, é menos resistente que o estrutural por apresentar em sua estrutura fibras de colágeno irregulares, mas que contribuem para reduzir os riscos de fratura óssea nas aves e atuam como uma fonte de cálcio para a formação da casca dos ovos (WHITEHEAD, 2004).

Desse modo, acreditamos que o fornecimento de Zn, Mn, Cu e Fe complexados com aminoácidos proporcionou níveis de Fe ideais para as aves de modo a manter o delicado equilíbrio da homeostase óssea, a ponto de chegar ao final do ciclo de produção com maior deposição de tecido ósseo medular, o que, conseqüentemente, contribuiu para maior densidade

nos ossos das aves dos tratamentos avaliados (MCA-ZMCFe e MCA-Fe) e que, por conseguinte, melhorou a qualidade das cascas dos ovos.

### ***Variáveis sanguíneas***

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima considerada como marcador bioquímico do metabolismo ósseo, atuando nos processos de formação e de mineralização óssea (VIEIRA, 1999). Lumeij e Westerhof (1987), em revisão relata que o aumento da atividade da fosfatase alcalina em aves são associadas a atividade osteoplástica que podem estar envolvida, entre outros fatores, a reparação do tecido ósseo. Desse modo, considerando as maiores concentrações desta enzima e a baixa densidade óssea observada em aves suplementadas com MI durante a FC e que durante a FP consumiram MCA-ZMCFe, podemos inferir que as aves sofreram maior impacto durante o processo de reabsorção óssea por apresentarem baixas reservas minerais na tíbia, exigindo, desse modo, uma maior atividade metabólica para reparação do tecido ósseo, refletindo diretamente na atividade da FA, a qual atua na reparação do tecido ósseo. Esta resposta mostra novamente como é importante a preparação da pintainha para a vida adulta, pois, mesmo consumindo dietas contendo MCA-ZMCFe durante a FP, o fato de terem consumido durante a FC dietas contendo MI, sua homeostase óssea pode ter sido comprometida.

### ***Composição mineral***

Ao analisar a composição mineral, podemos observar que a suplementação parcial com complexos minerais não alterou as concentrações de Zn, Mn, Cu e Fe na tíbia; no entanto, influenciaram as concentrações de Fe, Ca e tenderam a modificar a concentração de Cu no fígado, assim como influenciaram as concentrações de Mn na gema e nas excretas das aves.

Embora os microminerais não sejam frequentemente considerados no contexto do desenvolvimento ósseo, o processo de ossificação é totalmente dependente da disponibilidade destes microminerais (DIBNER *et al.*, 2007).

Estudos como o de Bai *et al.* (2017) demonstraram que a suplementação de aves de postura com fontes minerais orgânicas (quelato de metal com metionina hidroxí análoga) podem aumentar as concentrações minerais de Zn e Mn na tíbia das aves quando suplementados substituindo 50% das fontes inorgânicas (sulfato). De forma semelhante, Das *et al.* (2014) verificam aumento nas concentrações Zn e Mn na tíbia ao suplementar as dietas com fontes minerais orgânicas (Zn-Metionina, Mn-Metionina e Cu-Metionina). No entanto, o aumento nas concentrações foi observado apenas quando as dietas foram suplementadas com 100% da fonte

Zn (80 mg/kg) e Mn (80 mg/kg) orgânico. Apesar disto, um estudo desenvolvido por Mohanna e Nys (1999) demonstrou que as modificações nas concentrações de Zn na tíbia serão influenciadas não só pela fonte (Zn-metionina e sulfato de Zn), mas principalmente pelas concentrações empregadas na dieta, apresentando um platô máximo de deposição independente da fonte mineral utilizada; embora os autores tenham avaliado apenas o Zn, é provável que esses efeitos se apliquem para outros elementos minerais.

Em nossos estudos não identificamos alterações nas concentrações dos microminerais na tíbia das aves suplementadas desde a fase de crescimento até o período final de produção, a partir da associação de fontes minerais inorgânicas e orgânicas. Isso pode estar relacionado à forma de suplementação (substituição total das fontes inorgânicas) empregada, molécula mineral utilizada e/ou diferentes níveis de suplementação avaliado em cada estudo. Além disso, é possível que os níveis das fontes de Zn e Mn (30 mg/kg) orgânicas empregadas em nossos estudos possam ter sido utilizadas em outros tecidos do corpo e, conseqüentemente, a proporção armazenada não foi suficiente para aumentar os níveis dos elementos na tíbia, conforme relatado em outros estudos. Embora as concentrações dos microminerais (Zn, Mn, Cu e Fe) na tíbia não tenham sido influenciados pela fonte mineral e fase de criação, pode-se observar que aves suplementadas desde a fase de crescimento com MCA apresentaram menores concentrações de Ca na tíbia em relação as aves suplementadas com MI. Resultados estes que são contraditórios aos obtidos por Das *et al.* (2010) e Kwiatkowska *et al.* (2018), os quais não verificaram alterações significativas nas concentrações de Ca na tíbia ao substituir a fonte de Zn (80 mg/kg) e Fe (40 mg/kg) inorgânica por fontes orgânicas. Já El-Husseiny *et al.* (2012) identificaram que frangos de corte aumentaram as concentrações de Ca na tíbia ao serem suplementados com 50 ou 100% de Zn, Mn e Cu na forma de metal quelatado na dieta

O fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo dos diversos nutrientes. Microminerais como Zn, Mn, Cu e Fe estão presentes no fígado em concentrações variadas, as quais podem ser modificadas em função das concentrações destes elementos na dieta e fonte mineral utilizada (LIM; PAIK, 2003; MA *et al.*, 2012; MIN *et al.*, 2019). Em nossos estudos identificamos aumento na deposição de Fe no fígado ao suplementar as aves com MCA-ZMC+Fe (264.17 mg/kg) em relação às aves suplementadas com MCA-ZMC (209.27 mg/kg). O fígado é um dos órgãos responsáveis pelo armazenamento de ferro no corpo, seguido pelo baço e medula óssea, sendo a taxa de absorção ajustada em função das necessidades do organismo (GROTTO, 2008), concentrações na dieta e fonte mineral utilizada (QIU *et al.*, 2020). Alguns estudos têm demonstrado que a utilização de fontes de Fe orgânica (Fe-Glicinato) promovem o aumento nas concentrações hepática de Fe, sendo observado um



aumento linear em função dos níveis suplementados (40, 80, 120 e 160), e uma maior eficiência de absorção da fonte orgânica em relação à inorgânica (MA *et al.*, 2012). Resposta essa também observada em estudos recentes conduzidos por Qiu *et al.* (2020), em que verificaram que a fontes de Fe orgânica (glicinato) proporcionou maiores concentrações de Fe no fígado (156 mg/kg) de galinhas poedeiras (Hy-Line, com 50 semanas de idade) quando comparado às aves suplementadas com a fonte inorgânica (119.56 mg/kg) na mesma concentração na dieta (80 mg/kg).

A absorção de ferro a partir de fontes inorgânicas é dependente de carreadores específicos, sendo estes a DMT1, Ferroportina 1 (FPN1) e transferrina, os quais serão responsáveis pela importação e exportação de Fe através do enterócito para corrente sanguínea e dessa para os tecidos (GROTTO, 2010; GANZ, 2013). A utilização de uma fonte mineral orgânica, em particular o Fe, independe desses carreadores específicos, que podem também, no caso da DMT1, atuar na captação de outros metais (Cu, Mn e Zn) e, conseqüentemente, reduzir o aproveitamento da fonte. Conforme demonstrado num estudo conduzido Xie *et al.* (2019), em que verificaram maiores concentrações de Fe no fígado e menor a expressão do mRNA da DMT1 e da FPN1 no intestino e aumento da transferrina quando as aves foram suplementadas com dietas contendo 60 e 80 mg/kg de Fe orgânico (Fe-Glicinato).

De forma semelhante ao ferro, pode-se verificar uma tendência no aumento das concentrações de Cu no fígado ao suplementar as aves desde a fase de crescimento com MCA (9.19 mg/kg) em relação às fontes MI (8.32 mg/kg).

Estudos anteriores relatam relações antagônicas entre Zn e Mn, sendo observado que o excesso de um influencia a concentração hepática do outro (GONZALES *et al.*, 2005), quando fontes inorgânicas desses elementos são fornecidas na dieta (AO *et al.*, 2009). Ao *et al.* (2009) verificaram menores concentrações hepáticas de Cu ao suplementarem dietas de pintainhos com diferentes fontes de Zn e Cu (sulfato ou proteinato), relataram que possivelmente tal resposta possa estar relacionada ao sequestro do Cu pela metalotioneína (MT) intestinal, induzida pelo auto teor de zinco da dieta. A metalotioneína está envolvida no controle da absorção de Zn e Cu, sendo relatado que o Zn estimula a produção de MT, em condições de altas concentrações de Zn uma maior quantidade MT será produzida, a qual atuará retendo tanto Zn como Mn, limitando sua transferência para o plasma (BREMNER; BEATTIE, 1990) e, conseqüentemente, para o fígado.

A resposta observada em nossos estudos pode estar diretamente associada às maiores taxas de absorção das moléculas de metais aminoácidos, tendo em vista que tais formas orgânicas reduzem o grau de interação entre nutrientes e outros constituintes da dieta (fitatos e

taninos), que poderiam levar a formação de compostos insolúveis (KWIECIEN *et al.*, 2015). No presente estudo, os minerais avaliados são complexos de metais aminoácidos, sendo assim estes acabam sendo absorvidos pelos mesmos sítios de absorção dos aminoácidos em qual se encontram ligados (GAO *et al.*, 2014; SAUER *et al.*, 2017), e, conseqüentemente, reduzem a dependência de carreadores específicos para absorção destes minerais. Isso possivelmente justificaria tal efeito, tendo em vista que as concentrações de ferro e cobre em ambas as dietas se mantiveram constantes, com concentrações de 50 e 8 mg/kg, respectivamente, suplementadas de forma associada entre fonte inorgânica e orgânica. Além disso, os elementos Cu e Fe tem como principal local de armazenamento o fígado (GROTTO, 2008; HAMDI *et al.*, 2018), diferente do Mn e do Zn, os quais são armazenados, principalmente, no tecido ósseo (HENRY *et al.*, 1989; MOHANNA; NYS, 1999). Desse modo, é provável que o fígado seja mais sensível a alterações de Cu e Fe em relação ao Zn e Mn quando tais elementos estão presentes em diferentes formas moleculares na dieta.

O ovo representa uma das principais fontes de nutrientes para alimentação humana, o qual apresenta, além de uma rica fonte de proteína de alta digestibilidade, minerais (Zn, Mn, Cu, Fe, Se, Na, K, Ca e P) e todas as vitaminas, com exceção da C (BERTECHINI; MAZZUCO, 2013). No entanto, fatores como idade, linhagem, ambiente de criação e, principalmente, a nutrição podem atuar modificando a composição dos nutrientes presente no ovo (HEFLIN *et al.*, 2010). Em nossos estudos identificamos maiores concentrações de Mn na gema dos ovos ao suplementar as aves durante a fase de produção com MCA-ZMC+Fe.

Resultados esses também observado por Li *et al.* (2018) ao suplementar dietas de galinhas poedeiras (Jinghong-1, com 53 semanas de idade) com manganês metionina (Mn-Met) em diferentes níveis na dieta (20, 40, 60 e 80 mg de Mn/kg). Do mesmo modo que as galinhas poedeiras, codornas japonesas também demonstraram aumentar as concentrações de Mn na gema ao serem suplementadas com diferentes níveis (60, 120 e 180 mg Mn/kg) de uma fontes orgânica (quelato) de Mn na dieta (GRAVENA *et al.*, 2011).

Apesar das pesquisas com suplementação mineral e deposição destes na gema, ainda pouco se sabe a respeito da deposição de Mn na gema dos ovos (HOPCROFT *et al.*, 2019). No entanto, a maior quantidade de Mn na gema dos ovos de galinhas poedeiras suplementadas com minerais orgânicos tem demonstram ser eficiente para impedir a oxidação lipídica da gema durante o período de armazenamento (40 dias) a frio quando comparado às aves suplementadas com fontes Mn inorgânicas (VENGLOVSKÁ *et al.*, 2014).

Embora a deposição de Mn seja relevante para qualidade interna dos ovos, suas maiores concentrações são observadas na casca, as quais são depositadas em concentrações três vezes

maiores que a da gema e do albúmen (LI *et al.*, 2018), tendo a fonte orgânica uma bioeficácia de deposição na casca do ovo de 470% em relação à fonte inorgânica (XIAO *et al.*, 2015). O Mn desempenha importante papel na formação inicial da matriz orgânica da casca dos ovos, pois é responsável pela síntese de glicosaminoglicanos (GAGs), os quais são componentes dos proteoglicanos que atuam controlando a estrutura e textura da casca (ZHANG *et al.*, 2017a).

Alguns estudos relatam que a utilização de Fe na forma orgânica é capaz de aumentar as concentrações deste mineral na gema (PARK *et al.*, 2004; SKŘIVAN *et al.*, 2005; PAIK *et al.*, 2009; CORNESCO *et al.*, 2014; TASCHETTO *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2019). Respostas estas não observadas em nossos estudos, que possivelmente possam estar relacionadas às concentrações de ferro utilizadas nos estudos apontados anteriormente, que variaram de 60 a 200 mg/kg. Não é observado aumento nas concentrações de Fe na gema quando concentrações abaixo de 60 mg/kg são utilizadas nas dietas (XIE *et al.*, 2019).

Identificamos que a utilização dos complexos minerais (MCA-ZMC e MCA-ZMC+Fe) influenciaram as concentrações de Mn nas excretas das aves ao serem suplementadas com diferentes fontes minerais (MI ou MCA) durante a FC. O Mn é um dos elementos minerais menos tóxicos para os animais (SUN *et al.*, 2020), pois apresenta uma baixa taxa de absorção intestinal e alta capacidade de excreção pelo fígado (FINLEY *et al.*, 1997). Alguns estudos demonstram que a suplementação das aves a partir das fontes minerais orgânicas tem o potencial de reduzir as concentrações dos elementos minerais nas excretas quando as concentrações das fontes inorgânicas são reduzidas e substituídas por fontes orgânicas (NOLLET *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020).

Em nossos estudos avaliamos as mesmas concentrações minerais para as diferentes fontes avaliadas (MI ou MCA). Entre os microminerais, apenas as concentrações de Mn foram alteradas em função da fonte mineral e fase de suplementação. Sendo verificado uma maior excreção ao suplementar as aves com fontes MCA durante a FC e que permaneceram consumindo durante a FP fontes MCA-ZMC ou MCA-ZMC+ Fe. Como as concentrações minerais de Mn não foram reduzidas, é provável que a suplementação parcial com fontes MCA tenham sido suficientes para atender às necessidades das aves, e, conseqüentemente, uma maior proporção das fontes inorgânicas foram excretas.

A maior excreção mineral também pode estar relacionada a maiores reservas corporais deste elemento, proporcionada por uma alta taxa de absorção das fontes MCA durante toda a FC e, conseqüentemente, deposição nos tecidos corporais; desse modo, as aves, ao permanecerem consumindo fontes MCA tenderam a atingir suas necessidades fisiológicas de forma mais rápida.

Este resultado não foi observado quando as aves deste mesmo grupo (MCA) passaram a consumir IM. É provável que essas aves, ao apresentarem uma menor excreção de Mn, necessitaram mobilizar parte de suas reservas corporais para suprir suas necessidades metabólicas em função da baixa disponibilidade da fonte inorgânica; desse modo, com o objetivo de manter os níveis corporais acabaram retendo uma maior concentração de Mn, influenciando diretamente a excreção desse elemento para o ambiente.

Outro ponto que salientamos é com relação as modificações na expressão dos carreadores envolvidos na absorção das fontes inorgânicas, visto que um estudo conduzido por Bai *et al.* (2014) demonstrou que a concentração de Mn foi capaz de modificar a expressão de mRNA da DMT1 e ferroportina 1 (FPT1) no intestino das aves de postura com 50 semanas. Embora tenhamos avaliado concentrações constantes de Mn e demais elementos (Zn, Cu e Fe), o efeito da fonte orgânica durante todo período produtivo pode ter levado a modificações na expressão de transportadores envolvidos na absorção dos minerais em sua forma inorgânica, e, conseqüentemente, influenciar sua capacidade de aproveitamento, nesse caso o Mn.

## CONCLUSÃO

O uso de MCA-ZMC desde a FC em substituição parcial as fontes inorgânicas, e a manutenção desta suplementação em associação ao MCA-Fe retardou os impactos da idade sobre as características ósseas e qualidade da casca dos ovos durante a FP, influenciando positivamente na atividade da fosfatase alcalina, manutenção da integridade óssea das galinhas e na espessura das cascas dos ovos, sem afetar o desempenho produtivo das aves.

A suplementação parcial das aves com MCA-ZMC durante as fases iniciais de criação até o período final de produção não determinaram maiores concentrações minerais nos tecidos ósseo, hepático, gema dos ovos e excretas das aves. Apenas a suplementação das aves durante a fase final de produção, independente da suplementação durante a fase de crescimento, proporcionaram maiores concentrações de Fe e Cu no fígado e Mn na gema e nas excretas das aves.

## REFERÊNCIAS

ABEDINI, M.; SHARIATMADARI, F.; KARIMI TORSHIZI, M. A.; AHMADI, H. Effects of zinc oxide nanoparticles on the egg quality, immune response, zinc retention, and blood parameters of laying hens in the late phase of production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 102, pp. 736–745, 2018.

AO, T.; PIERCE, J. L.; POWER, R.; PESCATORE, A. J.; CANTOR, A. H.; DAWSON, K. A.; FORD, M. J. Effects of feeding different forms of zinc and copper on the performance and tissue mineral content of chicks. **Poultry Science**, n. 88, pp. 2171–2175, 2009.

ARAÚJO, C. S. S.; HERMES, R. G.; BITTENCOURT, L. C.; SILVA, C. C.; ARAÚJO, L. F.; GRANGHELLI, C. A.; PELISSARI, P. H.; ROQUE, F. A.; LEITE, B. G. S. Different dietary trace mineral sources for broiler breeders and their progenies. **Poultry Science**, n. 98, pp. 4716–4721, 2019.

BAI, S.; HUANG, L.; LUO, Y.; WANG, L.; DING, X.; WANG, J.; ZENG, Q.; ZHANG, K. Dietary manganese supplementation influences the expression of transporters involved in iron metabolism in chickens. **Biological Trace Element Research**, n. 160, pp. 352–360, 2014.

BAI, S., JIN, G.; LI, D.; DING, X.; WANG, J.; ZHANG, K.; ZENG, Q.; JI, F.; ZHAO, J. Dietary organic trace minerals level influences eggshell quality and minerals retention in hens. **Annals of Animal Science**, n. 17, pp. 503–515, 2017.

BERTECHINI, A. G.; Mazzuco, H. THE TABLE EGG: A REVIEW. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 37, pp. 115–122, 2013.

BERWANGER, E.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; KINDLEIN, L.; MAYER, A. N.; EBBING, M. A.; LOPES, M. Copper requirements of broiler breeder hens. **Poultry Science**, n. 97, pp. 2785–2797, 2018.

BOARD, R. G.; HALLS, N. A. The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. **British Poultry Science**, n. 14, pp. 69–97, 1973.

BORUTA, A.; SWIERCZWSKA, E. Trace organic minerals as a replacement of inorganic source for layers: effect on productivity and mineral excretion. **Proceedings of the 16th ...**, pp. 491–494, 2007.

BREMNER, I.; BEATTIE, J. H. Metallothionein and the trace minerals. **Annual Review of Nutrition**, n. 10, pp. 63–83, 1990.

CARVALHO, L. S. S.; ROSA, D. R. V.; LITZ, F. H.; FAGUNDES, N. S.; FERNANDES, E. A. Effect of the Inclusion of Organic Copper, Manganese, And Zinc in The Diet of Layers on Mineral Excretion, Egg Production, and Eggshell Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, pp. 87–92, 2015.

CENTER FOR FOOD AND NUTRITION POLICY (CFNP). Proteinated and Chelated Mineral Complexes. **CFNP TAP Review**, n. 2119, pp. 1–29, 2002.

CORNESCO, G. M.; GROSU, H.; UNTEA, A. E.; PANAITI, T. D.; BERCARU, A. Total content of polyphenols and antioxidant activity of different melliferous plants. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, n. 71, pp. 250–255, 2014.

CROSARA, F.; PEREIRA, V.; LELLIS, C.; BARRA, K.; SANTOS, S.; SOUZA, L.; MORAIS, T.; LITZ, F.; LIMÃO, V.; BRAGA, P.; FERNANDES, E. Is the Eggshell Quality Influenced by the Egg. **Brazilian Journal of Poultry Science**, n. 21, pp. 1–8, 2019.

DARVISHI, Y.; SHARGH, M. S.; HASSANI, S. **The effect of organic and inorganic zinc sources on performance and egg quality in laying hens**, 2020.

DAS, A.; SWAIN, S. K.; SAHOO, G.; BEHURA, N. C. Effects of Organic Minerals Supplementation on Growth, Bioavailability and Immunity in Layer Chicks. **International Journal of Pharmacology**, n. 10, v. 5, pp. 237–247, 2014.

DE GRANDE, A.; LELEU, S.; DELEZIE, E.; RAPP, C.; SMET, S. De; GOOSSENS, E.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R. Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. **Poultry Science**, n. 99, pp. 441–453, 2020.

DELLA PEPA, G.; BRANDI, M. L. **Microelements for bone boost**: The last but not the least. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, n. 13, pp. 181–185, 2016.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L.; QUIROZ, M. A. Metabolic challenges and early bone development. **Journal of Applied Poultry Research**, n. 16, pp. 126–137, 2007.

EL-HUSSEINY, O.; HASHISH, M., S. M.; ALI, R. A.; ARAFA, S. A.; ABD EL-SAMEE, L. D.; OLEMY, A. A. 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**, n. 11, pp. 368–377, 2012.

ENRY, P. R. H.; ILES, R. D. M. Interactions Among the Trace Minerals. **Ciência Animal Brasileira**, n. 1, pp. 95–106, 2006.

FINLEY, J. W., CATON, J. S.; ZHOU, Z.; DAVISON, K. L. A Surgical Model for Determination of True Absorption and Biliary Excretion of Manganese in Conscious Swine Fed Commercial Diets. **The Journal of Nutrition**, n. 127, pp. 2334–2341, 1997.

GANZ, T. Systemic iron homeostasis. **Physiological Reviews**, n. 93, pp. 1721–1741, 2013.

GAO, S.; YIN, T.; XU, B.; MA, Y.; HU, M. Amino acid facilitates absorption of copper in the Caco-2 cell culture model. **Life Sciences**, n. 109, pp. 50–56, 2014.

GARCIA, E. A.; MENDES, A. A.; PIZZOLANTE, C. C.; GONÇALVES, H. C.; OLIVEIRA, R. P.; SILVA, M. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n. 4, 2002.

GONZALES, B. P. E.; FONG, R. N.; GIBSON, C. J.; FUENTEALBA, I. C.; CHERIAN, M. G. Zinc supplementation decreases hepatic copper accumulation in LEC rat: A model of Wilson's disease. **Biological Trace Element Research**, n. 105, pp. 117–134, 2005.

GRAVENA, R. A.; MARQUES, R. H.; ROCCON, J.; PICARELLI, J.; HADA, F. H.; SILVA, J. D. T. da; QUEIROZ, S. A. de; MORAES, V. M. B. de. Egg quality during storage and deposition of minerals in eggs from quails fed diets supplemented with organic selenium, zinc and manganese. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, pp. 2767–2775, 2011.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 30,

2008.

\_\_\_\_\_. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 32, pp. 8–17, 2010.

HAMDI, M.; Solà, D.; Franco, R.; Durosoy, S.; Roméo, A.; Pérez, J. F. Including copper sulphate or dicopper oxide in the diet of broiler chickens affects performance and copper content in the liver. **Animal Feed Science and Technology**, n. 237, pp. 89–97, 2018.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes 1. **The FASEB Journal**, n. 6, pp. 2675–2683, 1992.

HEFLIN, L. E.; MALHEIROS, R.; ANDERSON, K. E.; JOHNSON, L. K.; RAATZ, S. K. Mineral content of eggs differs with hen strain, age, and rearing environment. **Poultry Science**, n. 97, pp. 1605–1613, 2010.

HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B.; MILES, R. D. Relative bioavailability of manganese in a manganese-methionine complex for broiler chicks. **Poultry science**, n. 68, pp. 107–112, 1989.

HERNANDEZ, J. Egg quality–meeting consumer expectations. *PM Beardswort - International Poultry*, n. 17, v. 23, 2005.

HOPCROFT, R. L.; COWIESON, A. J.; MUIR, W. I.; GROVES, P. J. Changes to mineral levels in the yolk of meat chicken embryos during incubation. **Poultry Science**, n. 98, pp. 1511–1516, 2019.

IDOWU, O. M. O.; AJUWON, R. O.; OSO, A. O.; AKINLOYE, O. A. Effects of zinc supplementation on laying performance, serum chemistry and Zn residue in tibia bone, liver, excreta and egg shell of laying hens. **International Journal of Poultry Science**, n. 10, pp. 225–230, 2011.

KARUNAJEEWA, H.; ABU-SEREWA, S.; HARRIS, P. A. Effects of an induced pause in egg production and supplementation of the diet with iron on egg shell colour, quality and performance of brown egg layers. **British Poultry Science**, n. 30, pp. 257–264, 1989.

KWIATKOWSKA, K.; WINIARSKA-MIECZAN, A.; KWIECIEŃ, M. Effect of Application of Fe-Glycinate Chelate in Diet for Broiler Chickens in an Amount Covering 50 or 25% of the Requirement on Physical, Morphometric and Strength Parameters of Tibia Bones. **Biological Trace Element Research**, n. 184, pp. 483–490, 2018.

KWIECIEŃ, M.; SAMOLIŃSKA, W.; BUJANOWICZ-HARAŚ, B. Effects of iron-glycine chelate on growth, carcass characteristic, liver mineral concentrations and haematological and biochemical blood parameters in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 99, pp. 1184–1196, 2015.

LEESON, S. Copper metabolism and dietary needs. **World's Poultry Science Journal**, n. 65, pp. 353–366, 2009.

LI, L. L.; GONG, Y. J.; ZHAN, H. Q.; ZHENG, Y. X.; ZOU, X. T. Effects of dietary Zn-methionine supplementation on the laying performance, egg quality, antioxidant capacity, and serum parameters of laying hens. **Poultry Science**, n. 98, pp. 923–931, 2019.

- LI, L. L.; ZHANG, N. N.; GONG, Y. J.; ZHOU, M. Y.; ZHAN, H. Q.; ZOU, X. T. Effects of dietary Mn-methionine supplementation on the egg quality of laying hens. **Poultry Science**, n. 97, pp. 247–254, 2018.
- LI, L.; MIÃO, L.; ZHU, M.; WANG, L.; ZOU, X. Dietary addition of zinc-methionine influenced eggshell quality by affecting calcium deposition in eggshell formation of laying hens. **British Journal of Nutrition**, n. 122, pp. 961-973, 2019
- LIM, H. S.; PAIK, I. K. Effects of supplementary mineral methionine chelates (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 16, pp. 1804–1808, 2003.
- LUMEIJ, J. T.; WESTERHOF, I. Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. **The Veterinary quarterly**, n. 9, pp. 255–261, 1987.
- MA, W. Q.; SUN, H.; ZHOU, Y.; WU, J.; FENG, J. Effects of iron glycine chelate on growth, tissue mineral concentrations, fecal mineral excretion, and liver antioxidant enzyme activities in broilers. **Biological Trace Element Research**, n. 149, pp. 204–211, 2012.
- MABE, I.; RAPP, C.; BAIN, M. M.; NYS, Y. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. **Poultry Science**, n. 82, pp. 1903–1913, 2003.
- MEDEIROS-VENTURA, W. R. L.; RABELLO, C. B. V.; BARROS, M. R.; SILVA JUNIOR, R. V.; OLIVEIRA, H. B.; FARIA, A. G.; SILVA, A. F.; SOARES, P. C.; PEREIRA, C. G.; SANTOS, M. J. B.; FIREMAN, A. K. Zinc, manganese, and copper amino acid complexes improve performance and bone characteristics of layer-type chicks under thermoneutral and cold stress conditions. **Poultry Science**, n. 99, pp. 5718–5727, 2020.
- MERTENS, K.; BAMELIS, F.; KEMPS, B.; KAMERS, B.; VERHOELST, E.; KETELAERE, B. De; BAIN, M.; DECUYPERE, E.; BAERDEMAEKER, J. De. Monitoring of eggshell breakage and eggshell strength in different production chains of consumption eggs. **Poultry Science**, n. 85, pp. 1670–1677, 2006.
- MIN, Y. N.; LIU, F. X.; QI, X.; JI, S.; CUI, L.; WANG, Z. P.; GAO, Y. P. Effects of organic zinc on tibia quality, mineral deposit, and metallothionein expression level of aged hens. **Poultry Science**, n. 98, pp. 366–372, 2019.
- MOHANNA, C.; NYS, Y. Effect of dietary zinc content and sources on the growth, body zinc deposition and retention, zinc excretion and immune response in chickens. **British Poultry Science**, n. 40, pp. 108–114, 1999.
- NOLLET, L.; VAN DER KLIS, J. D.; LENSING, M.; SPRING, P. The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. **Journal of Applied Poultry Research**, n. 16, pp. 592–597, 2007.
- NUNES, J. K.; SANTOS, V. L.; ROSSI, P.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F.; MAIER, J. C.; SILVA, J. G. C. Qualidade de ovos e resistência óssea de poedeiras alimentadas com minerais orgânicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 65, pp. 610–618, 2013.



OLIVEIRA, J. F. de.; ROSSI JÚNIOR, J. L.; LEITE, F. L. G.; OLIVEIRA, D. C. de; COSTA, L. A. V. S.; SILVA, I. C. C. da; TEIXEIRA, M. W.; COSTA, F. S. Densitometria da vértebra dorsal, osso pleural e osso neural em tartarugas verdes híidas por tomografia computadorizada quantitativa. **Ciência Rural** 42:1440–1445, 2012.

ONYANGO, E. M.; HESTER, P. Y.; STROSHINE, R.; ADEOLA, O. Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. **Poultry Science**, n. 82, pp. 1787–1791, 2003.

PAIK, I.; Lee, H.; PARK, S. Effects of organic iron supplementation on the performance and iron content in the egg yolk of laying hens. **Journal of Poultry Science**, n. 46, pp. 198–202, 2009.

PARK, J. A.; CHO, E. J.; PARK, J. Y.; SOHN, S. H. Histological Change of Uterus Endometrium and Expression of the Eggshell-related Genes according to Hen Age Ji. **Korean journal poultry Sci**, n. 44, pp. 19–28, 2017.

PARK, S. W.; NAMKUNG, H.; AHN, H. J.; PAIK, I. K. Production of iron enriched eggs of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 17, pp. 1725–1728, 2004.

PEREIRA, G. C. C.; COSTA, F. G. P.; SILVA, J. H. V. da; PASCOAL, L. A. F.; LIMA, C. A. B. de.; BITTENCOURT, L. C.; SECHINATO, A. da S.; HERMES, R. G. Different trace mineral sources and recommendations in the performance and quality of eggs from Dekalb White layers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 47, 2018.

PEREIRA, C. G.; RABELLO, C. B. V.; BARROS, M. R.; MANSO, H. E. C. C. C.; SANTOS, M. J. B. dos; FARIA, A. G.; OLIVEIRA, H. B. de; MEDEIROS-VENTURA, W. R. L.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. C. D.; FIREMAN, A. K. Zinc, manganese and copper amino acid complexed in laying hens' diets affect performance, blood parameters and reproductive organs development. **PLoS ONE**, n. 15, pp. 1–16, 2020.

QIU, J.; LU, X.; MA, V.; HOU, C.; HE, J.; LIU, B.; YU, D.; LIN, G.; XU, J. Low-dose of organic trace minerals reduced fecal mineral excretion without compromising performance of laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 33, pp. 588–596, 2020.

RAMOS-VIDALES, D.; GÓMEZ-VERDUZCO, G.; CORTES-CUEVAS, A.; RÍO-GARCÍA, J. C. del.; FERNÁNDEZ-TINOCO, S.; CHÁRRAGA-AGUILAR, S.; ÁVILA-GONZÁLEZ, E. Organic trace minerals on productive performance, egg quality and immune response in Bovans White laying hens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 103, pp. 1484–1491, 2019.

ROLAND, D. A. Research Note: Egg Shell Problems: Estimates of Incidence and Economic Impact 1 Inferior eggshell quality continues to be a major concern of egg producers. Although there have been several estimates concerning the extent of shell problems. **Poultry Science**, n. 67, pp. 1801–1803, 1988.

RUTZ, F.; ANCIUT, A. M.; RECH, J. L.; ROSSI, P. The Impact of Organic Mineral on Performance of Poultry. **Proc. Aust. Poult. Sci. Sym**, n. 16, pp. 1–4, 2004.

SALEH, A. A.; ELTANTAWY, M. S.; GAWISH, E. M.; YOUNIS, H. H.; AMBER, K. A.; ABD EL-MONEIM, A. E.-M. E.; EBEID, T. A. **Impact of Dietary Organic Mineral Supplementation on Reproductive Performance, Egg Quality Characteristics, Lipid Oxidation, Ovarian Follicular Development, and Immune Response in Laying Hens Under High Ambient Temperature. Biological Trace Element Research**, 2019.

SALIM, H. M.; LEE, H. R.; JO, C.; LEE, S. K.; Lee, B. D. Supplementation of graded levels of organic zinc in the diets of female broilers: Effects on performance and carcass quality. **British Poultry Science**, n. 52, pp. 606–612, 2011.

SANDILANDS, V. The laying hen and bone fractures. **Avian Science Research Center**, n. 169, p. 414, 2011.

SAUER, A. K.; PFAENDER, S.; HAGMEYER, S.; TARANA, L.; MATTES, A. K.; BRIEL, F.; KÜRY, S.; BOECKERS, T. M.; GRABRUCKER, A. M. Characterization of zinc amino acid complexes for zinc delivery in vitro using Caco-2 cells and enterocytes from hiPSC. **BioMetals**, n. 30, pp. 643–661, 2017.

SEEDOR, J. G.; Quartuccio, H. A.; Thompson, D. D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, n. 6, pp. 339–346, 1991.

SEO, Y. M.; SHIN, K. S.; RHEE, A. R.; CHI, Y. S.; HAN, J.; PAIK, I. K. Effects of dietary feso-y proteinate and mgo on egg production and quality of eggshell in laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 23, pp. 1043–1048, 2010.

SKŘIVAN, M.; SKŘIVANOVÁ, V.; MAROUNEK, M. Effects of dietary zinc, iron, and copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil, and herbage. **Poultry Science**, n. 84, pp. 1570–1575, 2005.

SMITH, J. E. Iron Metabolism and its Disorders. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, n. 259–285, 1997.

SOUSA, A. M.; BATOS-LEITE, S. C.; GOULARD, C. C.; BARROSO, M. L. S.; SILVA, J. D. B. Chelated minerals and two limestone particle sizes on production of layers in the second laying cycle *Minerais quelatados e duas granulometrias de calcário sobre a produção de poedeiras em segundo ciclo produtivo. The egg production scenario in the poultry*, pp. 103–112, 2017a.

SOUSA, A. M. de; Cavalcante, S.; Castro, C. de; Luana, M.; Brito, J. D. Chelated minerals and two limestone particle sizes on production of layers in the second laying cycle. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, n. 18, pp. 103–112, 2017b.

SOUZA, J. C. S. de; TAVARES, T. H.; FERNANDES, F. S. C.; BONELLI, M. de A. Quantitative Computed Tomography of Healthy Adult Boas (*Boa Constrictor*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, n. 49, p. 1012, 2018.

STEFANELLO, C.; SANTOS, T. C.; MURAKAMI, A. E.; MARTINS, E. N.; CARNEIRO, T. C. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. **Poultry Science**, n. 93, pp. 104–113, 2014.

SUN, Q.; GUO, Y.; LI, J.; ZHANG, T.; WEN, J. **Effects of Methionine Hydroxy Analog Chelated Cu / Mn / Zn on Laying Performance, Egg Quality, Enzyme Activity and Mineral Retention of Laying Hens, 2012.**

SUN, W.; WANG, G.; PEI, X.; LIU, L.; XIAO, Z.; TAO, W.; YAQOUB, M. U.; WANG, M.; HUAI, M.; LI, L.; PELLETIER, W. Effects of Replacing Inorganic with Respective Complexed Glycinate Minerals on Apparent Mineral Bioavailability and Deposition Rate in Tissues of Broiler Breeders. **Biological Trace Element Research**, 2020.

SUTTLE, N. F. **Mineral Nutrition of Livestock**, 4th Edition (EJ Underwood, Ed.). 4 th ed. Cambridge, MA 02139 USA, 2010.

TASCETTO, D.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; STEFANELLO, C.; KINDLEIN, L.; EBBING, M. A.; SIMÕES, C. T. Iron requirements of broiler breeder hens. **Poultry Science**, n. 96, pp. 3920–3927, 2017.

VENGLOVSKÁ, K.; GREŠÁKOVÁ, L.; PLACHÁ, I.; RYZNER, M.; ČOBANOVÁ, K. Effects of feed supplementation with manganese from its different sources on performance and egg parameters of laying hens. **Czech Journal of Animal Science**, n. 59, pp. 147–155, 2014.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, n. 43, pp. 415–422, 1999.

WHITEHEAD. Overview of bone biology in the egg-laying hen. **Poultry Science**, n. 83, pp. 193–199, 2004.

XIAO, J. F.; WU, S. G.; ZHANG, H. J.; YUE, H. Y.; WANG, J.; JI, F.; QI, G. H. Bioefficacy comparison of organic manganese with inorganic manganese for eggshell quality in Hy-Line Brown laying hens. **Poultry Science**, n. 94, pp. 1871–1878, 2015.

XIAO, J. F.; ZHANG, Y. N.; WU, S. G.; ZHANG, H. J.; YUE, H. Y.; QI, G. H. Manganese supplementation enhances the synthesis of glycosaminoglycan in eggshell membrane: A strategy to improve eggshell quality in laying hens. **Poultry Science**, n. 93, pp. 380–388, 2014.

XIE, C.; ELWAN, H. A. M.; ELNESR, S. S.; DONG, X. Y.; ZOU, X. T. Effect of iron glycine chelate supplementation on egg quality and egg iron enrichment in laying hens. **Poultry Science**, n. 98, pp. 7101–7109, 2019.

YAN, F.; WALDROUP, P. W. Evaluation of Mintrex® manganese as a source of manganese for young broilers. **International Journal of Poultry Science**, n. 5, pp. 708–713, 2006.

ZAMANI, A.; RAHMANI, H. R.; Pourreza, J. Supplementation of a corn-soybean Meal diet with manganese and zinc improves eggshell quality in laying hens. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, n. 9 pp. 1311–1317, 2005.

ZHANG, Y. N.; WANG, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; QI, G. H. Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. **Poultry Science**, n. 96, pp. 2184–2193, 2017.

## CAPÍTULO II

---

Ultraestrutura da casca do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com dietas contendo metais-aminoácidos a base de zinco, manganês, cobre e ferro

## RESUMO

Hipotetizamos que aves suplementadas parcialmente com minerais de Zn, Mn e Cu complexados a aminoácidos (MCA) desde as fases iniciais de criação e a manutenção desta suplementação até a fase final de produção em associação ao complexo de ferro aminoácido (MCA-Fe) apresentam melhorias na ultraestrutura das cascas dos ovos. No período de um dia de vida até as 30 semanas de idade, dois grupos de aves foram alimentadas com duas fontes minerais: inorgânicas (70, 70 e mg/kg de Zn, Mn e Cu) ou inorgânicas reduzidas (40, 40, 2,75 mg/kg Zn, Mn e Cu) associadas com minerais complexados a aminoácidos (30, 30, e 5,25 mg/kg). E durante o período de 30 às 93 semanas de idade, 640 galinhas poedeiras, 320 de cada grupo inicial, foram redistribuídas em quatro grupos, definindo o arranjo fatorial 2 x 4 com oito repetições de 10 aves. Os tratamentos consistiram em: 1) MI – contendo 70, 70, 8 mg/kg de Zn, Mn, Cu provenientes de fontes minerais inorgânicas; 2) MCA-AMC – substituição parcial das fontes minerais inorgânicas por 30, 30 e 5,25 mg de Zn, Mn e Cu complexados a aminoácidos; 3) MCA-ZMCFe – substituição parcial das fontes inorgânicas por 30, 30, 5, 25 e 40 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe; 4) MCA-Fe - substituição parcial da fonte de ferro inorgânico por 40 mg/kg de Fe complexado a aminoácido. Três ovos por tratamento produzidos pelas aves às 93 semanas de idade foram selecionados em função do peso médio e analisados a partir da microscopia eletrônica de varredura e por espectroscopia de raio-X de dispersão de energia; as imagens obtidas foram analisadas a partir do programa imagJ e pelo software INCA (Oxford) EDS. A partir das imagens foram obtidas o comprimento das camadas mamilar e paliçada, e largura dos botões mamilares, assim como a distribuição dos elementos minerais sobre a superfície transversal da casca e o peso atômico relativo dos elementos minerais. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Observou-se efeito de interação para camada paliçada ( $P = 0,018$ ), mamilar ( $P < 0,01$ ) e largura dos botões mamilares da casca dos ovos das aves suplementadas parcialmente com MCA. A utilização de MCA promoveu aumento na espessura da camada paliçada, camada mamilar e redução na largura dos botões mamilares da casca. A suplementação parcial com MCA desde as fases iniciais de criação e a manutenção desta suplementação até o período final de produção em associação ao MCA-Fe reduziram os efeitos da idade das aves sobre as diferentes estruturas da casca dos ovos, promovendo cascas de melhor qualidade no final do período de produção.

**Palavras-chave:** Botões mamilares; Camada mamilar; Camada paliçada; Complexo mineral; Microscopia eletrônica; Qualidade de casca, Suplementação

## ABSTRACT

We hypothesized that birds partially supplemented with Zn, Mn, and Cu minerals complexed to amino acids (ACM) from early rearing stages and maintaining this supplementation until the final production stage in association with complex iron amino acid (ACM-Fe) show improvements in eggshell ultrastructure. A total of 640 laying hens were distributed in DIC in a 2x4 factorial arrangement with 8 repetitions of 10 birds. The treatments consisted of: 1) MI – containing 70, 70, 8 mg/kg of Zn, Mn, Cu from inorganic mineral sources; 2) MCA-AMC – partial replacement of inorganic mineral sources by 30, 30 and 5.25 mg of Zn, Mn and Cu complexed to amino acids; 3) MCA-ZMCFe – partial replacement of inorganic sources by 30, 30, 5, 25 and 40 mg/kg of Zn, Mn, Cu and Fe; 4) MCA-Fe - partial replacement of the inorganic iron source by 40 mg/kg Fe complexed to amino acid. Three eggs per treatment produced by the birds at 93 weeks of age were selected according to the average weight and analyzed by scanning electron microscopy and energy-dispersive ray-X spectroscopy. The images obtained were analyzed using the ImageJ program and the INCA (Oxford) EDS software. From the images, the length of the mammary and palisade layers, and width of the mammary buds were obtained, as well as the distribution of mineral elements over the cross-sectional surface of the shell and the relative atomic weight of the mineral elements. The data obtained were submitted to variance analysis and the means were compared using Tukey's test ( $P < 0.05$ ). An interaction effect was observed for the palisade layer ( $P = 0.018$ ), mammillary layer ( $P < 0.01$ ), and width of the mammary buttons of the eggshell of birds supplemented partially with MCA. The use of ACM promoted an increase in the thickness of the palisade layer, nipple layer and a reduction in the width of the nipple buds of the shell. The partial supplementation with MCA from the initial stages of rearing and the maintenance of this supplementation until the final production period in association with ACM-Fe reduced the effects of bird age on the different eggshell structures, promoting better quality shells at the end of the production period.

**Keywords:** Knob mammillary; Mammillary layer; Palisade layer; Mineral complex; Electron microscopy; Shell quality; Supplementation.

## INTRODUÇÃO

Entre os principais objetivos almejados dentro do sistema de produção de galinhas poedeiras está a persistência de uma boa qualidade de casca ao longo do ciclo produtivo das aves, característica de impacto financeiro relevante, já que 8 a 15% dos ovos perdidos são decorrentes de problemas relacionados à qualidade da casca dos ovos (GHEISARI *et al.*, 2011; STEFANELLO *et al.*, 2014).

Os problemas de casca podem ser decorrentes de diversos fatores, no entanto, um dos principais está relacionado à idade da ave. Isso porque, à medida que as aves envelhecem ocorrem modificações que influenciam a deposição dos minerais nos ovos (HEFLIN *et al.*, 2010), influenciando diretamente na formação da casca. Fisiologicamente, os impactos das modificações são observadas na metade do período de produção (49 semanas de idade) (WISTEDT *et al.*, 2019), e é promovido inicialmente pela diminuição da captação de cálcio duodenal a partir das 37<sup>a</sup> semana de idade (AL-BATSHAN *et al.*, 1994) e, posteriormente, pela redução na eficiência de mobilização dos minerais no epitélio endometrial, a qual é ocasionada pela ocorrência de deformações histológicas na glândula da casca (PARK; SOHN, 2018), redução na atividade da anidrase carbônica e modificações no equilíbrio dos receptores de estrogênio ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (WISTEDT *et al.*, 2019).

A casca é uma estrutura altamente ordenada, constituída por membranas (externa e interna), camada mamilar, paliçada, camada de cristais verticais e cutícula. Estas estruturas serão o resultado da precipitação sequencial de carbonato e matriz orgânica durante os estágios iniciais de formação da casca (FENG *et al.*, 2020). Durante estes, os microminerais Zn, Mn e Cu atuam como ativadores de enzimas (anidrase carbônica, lisil oxidase e Gal $\beta$  1,3-glucuronasiltransferase), envolvido na formação inicial da casca ou interagindo com cristais de cálcio durante a formação da casca (RICHARDS *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2014).

Habitualmente são empregadas na nutrição avícola fontes minerais inorgânicas (MI), que apresentam baixa capacidade de aproveitamento (ARAÚJO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2019a) e alta taxa de excreção, acarretando na poluição ambiental (JACKSON *et al.*, 2003).

Recentemente, estudos vêm sendo desenvolvidos e focados em moléculas minerais com alta estabilidade química a nível intestinal, conferindo alta capacidade de absorção e menor ocorrência de interações antagônicas com outros componentes dietéticos (STEFANELLO *et al.*, 2014), que é promovido pelo fato de estes minerais estarem ligados a um carreador orgânico, como os aminoácidos, proporcionando ao mineral uma rota de absorção alternativa (GAO *et al.*, 2014), e que conseqüentemente podem atuar reduzindo o efeito da idade das aves sobre a qualidade da casca dos ovos (SWIATKIEWICZ; KORELESKI, 2008)

Embora, alguns estudos tenham sido desenvolvidos ao avaliar os efeitos de fontes minerais ligadas a moléculas orgânicas na microestrutura da casca do ovo, nenhum estudo até o momento mediu os efeitos da suplementação parcial dos complexos minerais na ultraestrutura da casca dos ovos de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas desde as fases iniciais do crescimento até o período final de produção.

Desse modo, hipotetizamos que as aves suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu (MCA) desde as fases iniciais de criação e a manutenção desta suplementação até a fase final de produção em associação ao complexo ferro aminoácido (MCA-Fe) apresentam melhorias na ultraestrutura das cascas dos ovos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O protocolo para a realização deste estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número da licença 064/2016.

### ***Local***

O Experimento foi conduzido na Granja Ovo Novo, localizada no município de Caruaru (Latitude: 08°17'00" S e Longitude: 35°58'34" W), mesorregião do Agreste de Pernambuco, Brasil.

### ***Aves e Instalações***

Foram utilizadas 640 galinhas poedeiras da linhagem Lohmann Brown Lite, a partir das 50 semanas de idade, alojadas em gaiolas medindo 100 x 40 x 45 cm (10 aves/gaiola), ocupando um espaço de 450 cm<sup>2</sup>/ave, equipadas com comedouros tipo calha e bebedouros tipo *nipple*, com fornecimento de água *ad libitum* e ração controlada durante todo o período experimental. O fotoperíodo adotado foi 17 horas (natural + artificial). Durante todo o período experimental a temperatura e umidade relativa do ar no interior do galpão foram registradas diariamente por meio de Datalogger (modelo Hobo U12-013, onset), sendo verificada uma temperatura média de 26,93°C ± 1,48 e umidade relativa de 68% ± 5,10.

### ***Delineamento e Dietas experimentais***

O período experimental teve duração de 280 dias. As aves foram distribuídas nas parcelas experimentais de acordo com o peso (1821.35g ± 114.80) e produção (95.84 % ± 1.44)



em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x4, constituído de duas dietas fornecidas de um dia até as 30 semanas de idade (Fase de crescimento, FC), as quais constituíram o primeiro fator, e quatro dietas utilizadas a partir das 30 até as 50 semanas de idade (Fase de produção, FP), as quais constituíram o segundo fator (Fase de produção, FP), compondo dessa forma oito grupos.

A constituição dos tratamentos ocorreu da seguinte forma: durante o período de um dia a 30 semanas de idade, dois grupos de aves foram alimentados com duas fontes minerais que consistiram na suplementação de 70, 70 e 8 mg/kg de Zn, Mn e Cu inorgânicos (IM) e 40, 40 e 2,75 mg/kg de inorgânicos associados com 30, 30 e 5,25 mg/kg de Zn, Mn e Cu complexados a aminoácidos (MCA-ZMC). Ao atingirem as 30 semanas de idade, 800 poedeiras, 400 de cada grupo inicial, foram distribuídas em quatro grupos: 1) MI- contendo 70, 70 e 50 mg/kg, respectivamente de Zn, Mn e Cu inorgânicos; 2) MCA-ZMC - contendo 40, 40, 2,75 e 50 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe inorgânicos associados com 30, 30 e 5,25 mg/kg de MCA-ZMC; 3) MCA-ZMCFe – contendo 40, 40, 2,75 e 10 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe inorgânicos mais 30, 30 e 5,25 de MCA-ZMC e 40 mg/kg de Fe complexado a aminoácidos (MCA-Fe); 4) MCA-Fe – Contendo 70, 70, 8 e 10 mg/kg de Zn, Mn, Cu e Fe inorgânicos mais 40 mg/kg de MCA-Fe. Após atingirem as 50 semanas de idade 640 aves foram selecionadas em função do peso e produção, e em seguida distribuídas entre as parcelas experimentais, as quais constituíram 8 tratamentos com 8 repetições de 10 aves.

Os premixes minerais foram formulados de acordo com os níveis comumente utilizados na indústria. A suplementação por quilograma de premix mineral encontra-se descrita na Tabela 1, e as dietas experimentais detalhadas na Tabela 2. Os seguintes ingredientes foram usados como fontes inorgânicas: óxido de zinco (73% ZnO), óxido de manganês (57% MnO), sulfato de cobre (34,5% CuSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O), sulfato ferroso (30% SO<sub>4</sub>Fe), iodato de cálcio (62% I) e selenito de sódio (45% Se). Os minerais complexados com aminoácidos foram Zn, Mn, Cu e Fe.

**Tabela 1.** Composição mineral calculada e analisada das dietas experimentais (mg/kg)

Calculada, mg/kg	MI	MCA-ZMC		MCA-ZMC-Fe		MCA-Fe	
	Premix I	Premix II		Premix III		Premix IV	
		IM	MCA	IM	MCA	IM	MCA
Zinco	70	40	30	40	30	70	
Manganês	70	40	30	40	30	70	
Cobre	8	2,75	5,25	2,75	5,25	8	
Ferro	50	50		10	40	10	40
Iodo	1,0	1,0		1,0		1,0	
Selênio	0,25	0,25		0,25		0,25	
Analisada, mg/kg	MI	MCA-ZMC		MCA-ZMC+Fe		MCA-Fe	
Zinco	95,46	95,03		95,08		95,27	
Manganês	90,57	90,38		92,78		92,60	
Cobre	12,06	12,91		12,82		12,28	
Ferro	107,84	107,14		107,95		107,04	
Cálcio, g/kg	45,63	45,81		45,54		45,65	
Fósforo, g/kg	4,08	4,14		4,12		4,04	

Suplementação por quilo de produto: <sup>1</sup>Óxido de Zinco 799g / kg (Mín.); <sup>2</sup>Óxido de manganês, 60-62% de MnO, 600g / Kg (Mín.); <sup>3</sup>Sulfato de cobre, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 250g de Cu; <sup>4</sup>Sulfato de Ferro, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 300g / kg (Mín.); <sup>5</sup>AvailaZMC (descrição física 750g / ton); <sup>6</sup>AvailaFe (descrição física 400g / ton): ferro: 40,000 mg.

### *Variáveis Analisadas*

Amostras de casca das regiões apical, basal e equatorial foram analisadas em relação às diferentes camadas da casca.

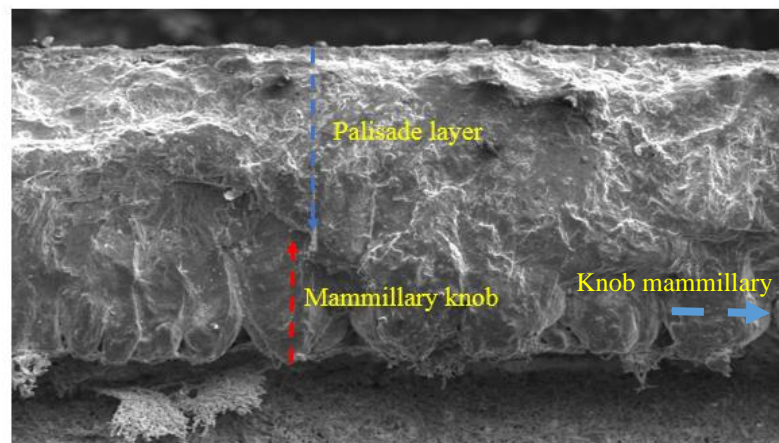
**Tabela 2.** Composição calculada e analisada das dietas experimentais

<b>Ingredientes, %</b>	<b>MI</b>	<b>MCA-ZMC</b>	<b>MCA-ZMCFe</b>	<b>MCA-Fe</b>
Milho moído	63,403	63,403	63,403	63,403
Farelo de soja	24,876	24,876	24,876	24,876
Óleo de soja	0,200	0,200	0,200	0,200
Calcário calcítico	9,900	9,900	9,900	9,900
Fosfato bicálcico	0,341	0,341	0,341	0,341
Bicarbonato de sódio	0,150	0,150	0,150	0,150
Sal comum	0,232	0,232	0,232	0,232
DL-Metionina 99	0,253	0,253	0,253	0,253
L-Treonina 98,5	0,038	0,038	0,038	0,038
Biobonde	0,150	0,150	0,150	0,150
Clostat <sup>2</sup>	0,050	0,050	0,050	0,050
Fitase <sup>3</sup>	0,006	0,006	0,006	0,006
Premix Vitamínico <sup>4</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Mineral I	0,100	-	-	-
Premix Mineral II	-	0,100	-	-
Premix Mineral III	-	-	0,100	-
Premix Mineral IV	-	-	-	0,10
MCA-ZMC <sup>5</sup>	-	0,075	0,075	-
MCA-Fe <sup>6</sup>	-	-	0,040	0,040
Caolin	0,200	0,125	0,085	0,160
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição Ntricional</b>				
EM (kcal/kg)	2756	2756	2756	2756
Proteína Bruta, %	16,42	16,42	16,42	16,42
Proteína Bruta <sup>7</sup> , %	16,65	16,15	16,40	16,06
Matéria seca <sup>7</sup> , %	90,63	91,23	90,95	91,00
Matéria Mineral <sup>7</sup> , %	15,71	15,16	15,28	15,64
Lisina	0,78	0,78	0,78	0,78
Metionina	0,47	0,47	0,47	0,47
Metionina + Cistina	0,71	0,71	0,71	0,71
Treonina	0,59	0,59	0,59	0,59
Arginina	1,00	1,00	1,00	1,00
Isoleucina	0,62	0,62	0,62	0,62
Triptofano	0,20	0,20	0,20	0,20
Cálcio, %	4,10	4,10	4,10	4,10
Fósforo disponível,%	0,35	0,35	0,35	0,35
Sódio	0,15	0,15	0,15	0,15
B. eletrolítico, mEq/kg	175,57	175,57	175,57	175,57

<sup>1</sup>Aditivo adsorvente de micotoxinas: Aluminossilicato de sódio e cálcio (600g/kg) e parede celular de levedura (400g/kg). <sup>2</sup>Bacillus subtilis (min): 1 x 10<sup>11</sup> CFU\*/lb (2,2 x 10<sup>8</sup> CFU/g): <sup>3</sup>Fitase (mín) 10.000 FTU/g. <sup>4</sup> Vitamina A (mín): 8.000,000 UI/kg, Vitamina D3 (mín):2.500,000 UI/kg, Vitamina E (mín): 6.00 UI/kg, Vitamina K3 (mín): 4.500 mg/kg, Vitamina B6 (mín): 2.000mg/kg, Vitamina B12 (mín) 12.000 mcg / kg, Niacina (mín): 15 g/kg, Pantotenato de cálcio (mín): 6.000 mg/kg, ácido fólico (mín): 400 mg/kg, Biotina (mín): 25 mg/kg. <sup>5</sup>Availa-ZMC (750g/ton): 40 mg/kg de Zn aminoácidos, 40 mg/kg de Mn aminoácidos 7 mg/kg de Cu aminoácidos. <sup>6</sup>Availa-Fe (400 g/ton): 40 mg/kg de Fe aminoácidos. <sup>7</sup> Valores analisados.

### *Avaliação da ultraestrutura da casca do ovo*

Para a avaliação da ultraestrutura da casca do ovo através da microscopia eletrônica de varredura, foram selecionados três ovos por tratamentos (24 ovos total), de acordo com o peso médio dos ovos da parcela às 93 semanas de idade; estes, posteriormente, foram quebrados e todas as cascas lavadas com água destilada para remoção do albúmen. Em seguida, as cascas foram secas em temperatura ambiente e segmentadas em três regiões (basal, equatorial e apical), com auxílio de uma micro retífica (Modelo Dremel 3000, 120W, 220V), acoplada com disco de corte com diâmetro de 23 mm e espessura de 0.8 mm. Posteriormente, fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> foram retirados de cada região da casca do ovo e armazenados em tubos ependorff® e mantidos em geladeira por sete dias (BARBOSA *et al.*, 2012; ZANG *et al.*, 2017). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFRPE e ao Núcleo de Plataforma Tecnológica-NPT/FIOCRUZ. Os fragmentos foram fixados em suportes metálicos (stubs) e submetidos à secagem por meio de uma estufa 35°C por 10 min, cobertos com 20 nm de ouro em metalizador JFC-1100 e visualizados pelo microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200. As camadas (mamilar e paliçada) foram identificadas em aumento de 300x para cada região da casca do ovo (Figura 2). O comprimento de cada camada foi mensurado em cinco pontos com auxílio do programa computacional ImageJ®, sendo considerada cada mensuração uma repetição.

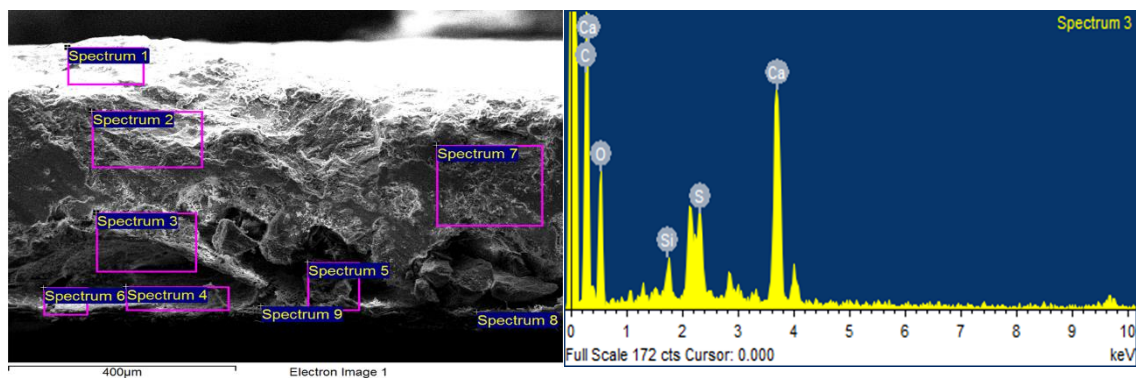


**Figura 1.** Microscopia eletrônica de Varredura da casca do ovo de galinhas poedeiras às 93 semanas de idade.

### *Espectroscopia por dispersão de raio-x*

As amostras das diferentes regiões da casca (apical, equatorial e basal) foram submetidas a detecção de elementos químicos pela emissão de raios-X. Para isso, as cascas, após terem sido submetidas aos processos citados anteriormente, foram analisadas com relação

à composição elementar e distribuição dos elementos por espectroscopia de raio-X de dispersão de energia a partir de um software INCA (Oxford) EDS, operado a 20 kV e a uma distância de trabalho de 20 mm. Os espectros de picos elementares foram analisados de forma cruzada e os dados obtidos como porcentagem de peso atômico relativo. A determinação da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X continha varredura de linha e varredura de mapeamento da superfície transversal da casca do ovo com uma ampliação de  $400 \times (400 \mu\text{m})$ . As medições foram realizadas em diferentes pontos e camadas da casca. A metodologia para análise foi realizada a partir de adaptações da descrita por Li *et al.* (2019), conforme mostra a Figura 2.



**Figura 2 (A, B).** Espectroscopia de raio- X dispersiva de energia de picos elementares (EDS) e a distribuição dos elementos sobre a superfície transversal da casca do ovo.

### *Análise Estatística*

As hipóteses de normalidade e homocedasticidade foram testadas para a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O seguinte modelo estatístico foi utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \beta_j\gamma_k + e_{ijk}$$

Em que:  $Y_{ijk}$  é a resposta na unidade de observação;  $\mu$  é a média geral esperada da variável resposta;  $\alpha_i$  é o efeito diferencial atribuível ao tratamento de controle  $i$ ;  $\beta_j$  é o efeito diferencial atribuível ao tratamento de ZMC  $i$ ;  $\gamma_k$  é o efeito diferencial atribuível ao tratamento de Fe  $i$ ;  $\beta_j\gamma_k$  é a interação entre o efeito atribuível aos tratamentos ZMC $i$  e Fe $j$  e  $e_{ijk}$  é o erro aleatório associado à unidade experimental  $j$  no grupo de tratamento  $i$ . Os dados foram analisados pelo procedimento PROC GLM do software Statistical Analysis System versão 3.1 (SAS, 2009).

## **RESULTADOS**

Observou-se efeito de interação para a camada paliçada ( $P=0,018$ ), mamilar ( $P < 0,01$ ) e largura dos botões mamilares ( $P < 0,01$ ) da casca do ovo (Tabela 3) das aves suplementadas

parcialmente com fontes MCA. A partir do desdobramento da interação identificou-se que a suplementação parcial com MCA desde a FC promoveu aumento da espessura da camada paliçada da casca dos ovos dos grupos que consumiram durante a FP as dietas MI, MCA-ZMC, MCA-ZMCFe e MCA-Fe, e maior espessura da camada mamilar das cascas dos ovos das aves que consumiram durante a FP as dietas MCA-ZMC e MCA-ZMCFe e menor largura dos botões mamilares para as aves que consumiram MCA-ZMCFe.

**Tabela 3.** Médias da espessura das camadas mamilar e paliçada da casca dos ovos de galinhas poedeiras suplementadas parcialmente com complexos minerais de Zn, Mn, Cu e Fe ao final da fase de produção

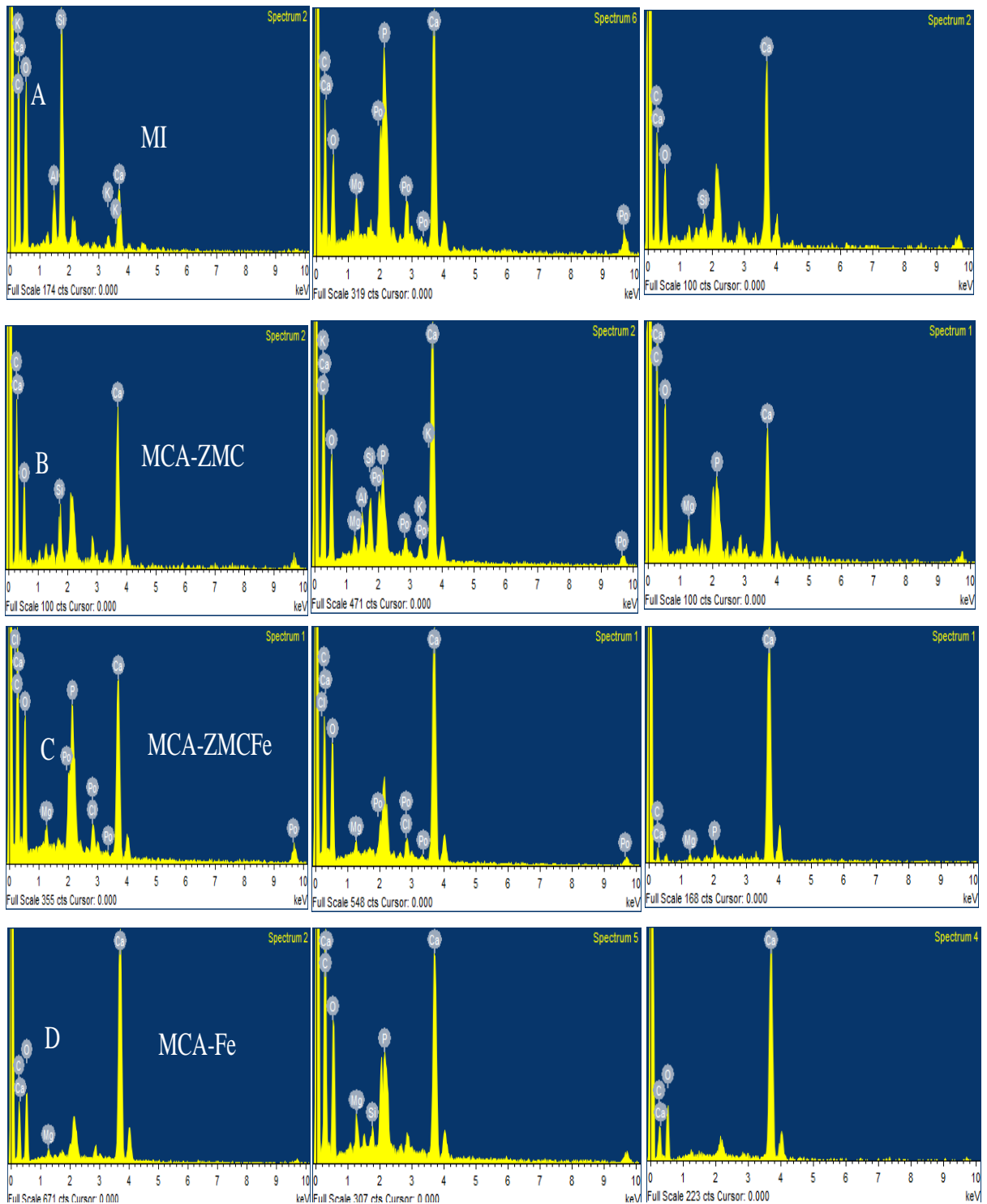
Fase crescimento	Fase Produção	Paliçada $\mu\text{m}$	Mamilar $\mu\text{m}$	Botões Mm
MI		160,60 <sup>b</sup>	49,83 <sup>b</sup>	76,41
MCA-ZMC		186,10 <sup>a</sup>	63,98 <sup>a</sup>	72,08
	MI	169,70 <sup>b</sup>	61,16 <sup>a</sup>	88,90 <sup>a</sup>
	MCA-ZMC	186,08 <sup>a</sup>	53,44 <sup>b</sup>	69,38 <sup>c</sup>
	MCA-ZMC+Fe	186,67 <sup>a</sup>	59,08 <sup>b</sup>	65,84 <sup>d</sup>
	MCA-Fe	150,95 <sup>c</sup>	53,93 <sup>b</sup>	71,47 <sup>b</sup>
MI	MI	150,05 <sup>bB</sup>	63,53 <sup>aA</sup>	99,14 <sup>aA</sup>
	MCA-ZMC	172,35 <sup>aB</sup>	42,79 <sup>bB</sup>	61,02 <sup>cbB</sup>
	MCA-ZMC+Fe	176,47 <sup>aB</sup>	41,84 <sup>bB</sup>	68,58 <sup>cA</sup>
	MCA-Fe	143,51 <sup>bB</sup>	51,16 <sup>bA</sup>	70,76 <sup>bA</sup>
MCA-ZMC	MI	189,34 <sup>aA</sup>	58,79 <sup>bA</sup>	78,66 <sup>aA</sup>
	MCA-ZMC	199,82 <sup>aA</sup>	64,09 <sup>bA</sup>	74,39 <sup>aA</sup>
	MCA-ZMC+Fe	196,87 <sup>aA</sup>	76,33 <sup>aA</sup>	63,10 <sup>bB</sup>
	MCA-Fe	158,38 <sup>bA</sup>	56,70 <sup>bA</sup>	72,19 <sup>aA</sup>
P-Value	FC	< 0,01	< 0,01	0,517
	FP	< 0,01	0,0097	<0,01
	FCxFP	0,0184	< 0,01	<0,01
	SEM	3.415	1.914	1.957

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a forma de suplementação durante a FC. <sup>a,b</sup> Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre a fonte mineral suplementada durante a FP. Análise pelo teste de Tukey (P <0.05).

Aves alimentadas durante a FC com dietas contendo MI apresentaram maior espessura da camada paliçada ao consumir durante a FP dietas parcialmente suplementadas com MCA-ZMC e MCA-ZMCFe, e menor largura dos botões mamilares ao serem suplementadas com MCA-ZMC. A suplementação com MI na FP promoveu redução na espessura da camada mamilar quando comparada com as outras dietas da FP. Aves alimentadas com dietas com MCA na FC tiveram a espessura da camada mamilar reduzida quando foram alimentadas com dietas suplementadas parcialmente com MCA-Fe. A suplementação parcial na FP com MCA-ZMCFe promoveu um aumento significativo da camada mamilar das cascas dos ovos em relação aos outros tratamentos. Já a largura dos botões mamilares demonstrou ser reduzida com

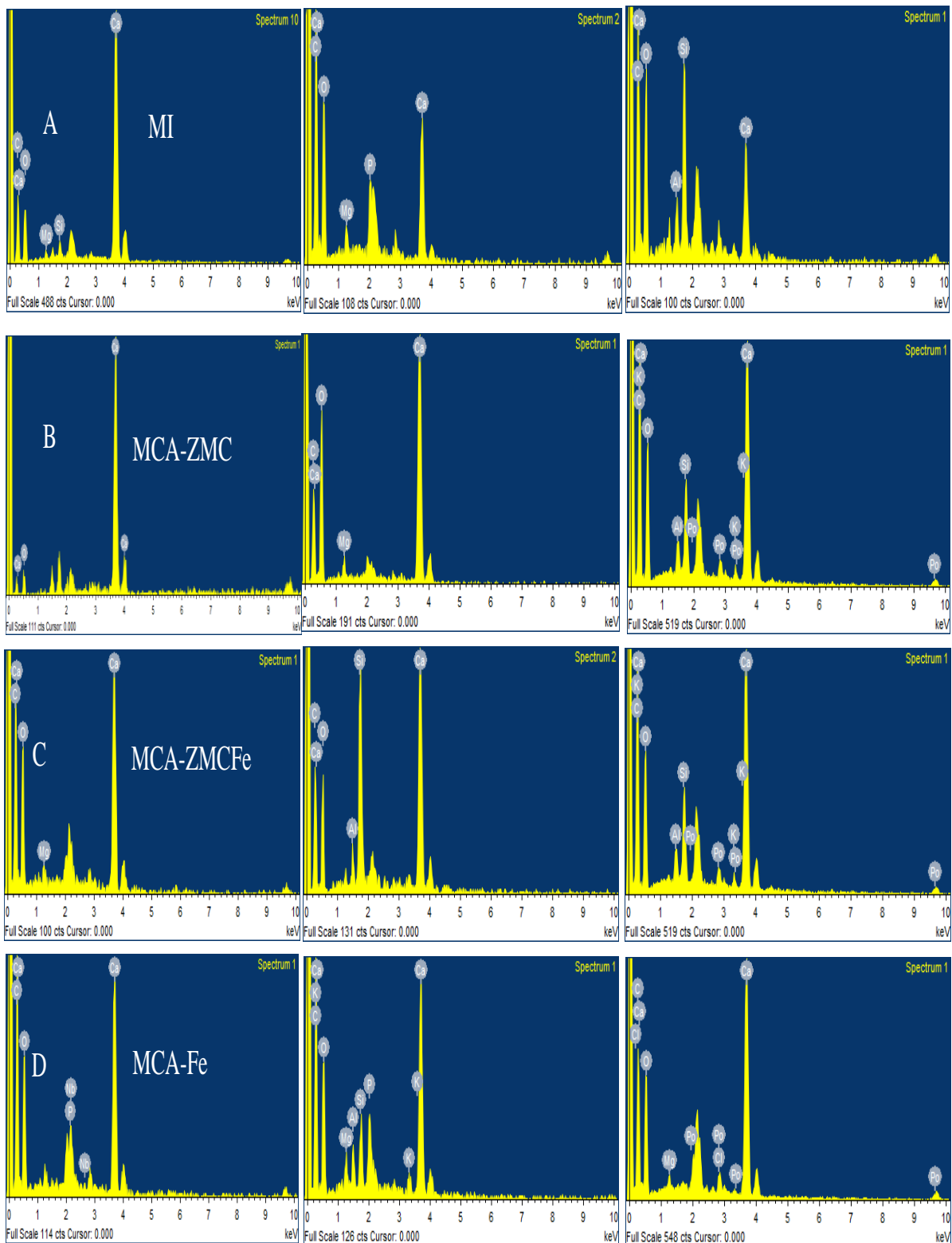
a utilização de ambas as fontes dos MCA quando fornecido às aves suplementadas com MI durante a FC, resposta semelhante à observada para o grupo de aves suplementadas com MCA durante a FC e que durante a FP consumiram MCA-ZMCFe.

Considerando os resultados obtidos para espectroscopia de dispersão de raio-X, pode-se observar a partir das Figuras 3 e 4 que os elementos mais abundantes na superfície transversal da casca do ovo foram o carbono (C), oxigênio (O) e o cálcio (Ca), sendo observado a partir da análise maiores médias (Figura 5 e 6) de peso atômico relativo do Ca e maior intensidade de sinal de Ca para as aves suplementadas com MCA independente da fase de criação.

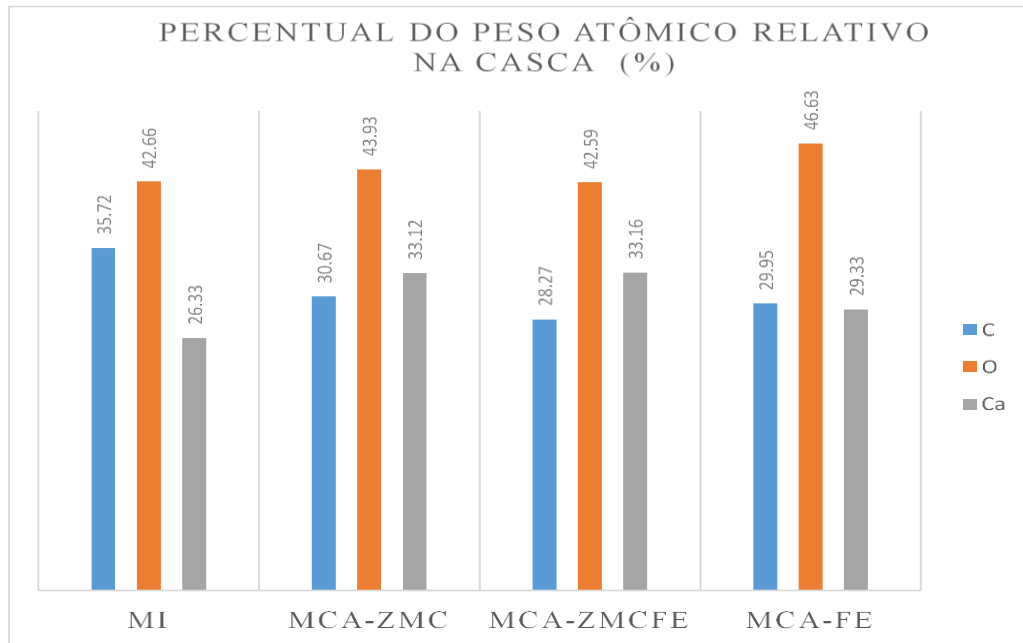


**Figura 3 (A, B, C, D).** Distribuição dos elementos minerais sobre a superfície transversal das diferentes regiões da casca (apical, equatorial e basal), suplementadas durante as fases iniciais de criação com minerais inorgânicos (MI) e que durante a fase de produção foram suplementadas com minerais complexados a aminoácidos (MCA).

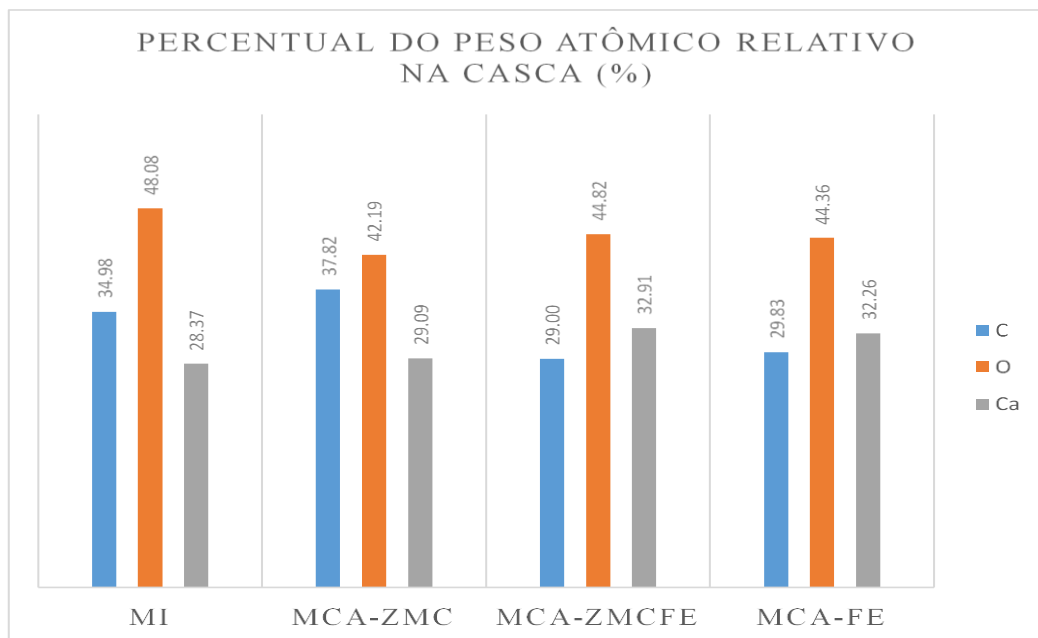




**Figura 4 (A, B, C, D).** Distribuição dos elementos minerais sobre a superfície transversal das diferentes regiões da casca do ovo (apical, equatorial e basal) de galinhas poedeiras semipesadas suplementadas parcialmente com MCA durante as fases iniciais de criação e que permaneceram consumindo MCA até a fase final de produção.



**Figura 5.** Médias do peso atômico relativo dos elementos minerais na casca dos ovos das aves suplementadas durante as fases iniciais de criação com MI e que passaram a consumir MCA durante a fase de produção.



**Figura 6.** Médias do peso atômico relativo dos elementos minerais na casca dos ovos das aves suplementadas durante as fases iniciais de criação com MCA e que permaneceram consumindo MCA durante a fase de produção.

## DISCUSSÃO

À medida que as aves envelhecem, ocorrem modificações fisiológicas no epitélio da glândula da casca, tais como fibrose, atrofia e perdas de células ciliares do endométrio, as quais aumentam gradualmente e ocasionam a redução da secreção do fluido uterino composto por elementos minerais importantes para a formação da casca (PARK *et al.*, 2017; PARK; SOHN, 2018). Desse modo, as alterações observadas na glândula da casca em função da idade das aves contribuem para redução na espessura da camada paliçada e aumento no tamanho dos botões mamilares, levando à redução da espessura e diminuição da resistência da casca (PARK; SOHN, 2018).

Nossos estudos demonstraram que a utilização de complexo mineral pode retardar o efeito da idade das aves na microestrutura da casca no final do período produtivo (93 semanas de idade). Resultados esses que concordam com os achados de Stefanello *et al.* (2014) e Qiu *et al.* (2019), que verificaram aumento da espessura da camada paliçada e diminuição no número e tamanho do botões mamilares, que refletiram diretamente na resistência e espessura total da casca dos ovos de galinhas poedeiras Hy-Lyne W36 e White com 47 e 50 semanas, respectivamente, ao utilizarem na alimentação complexo de metal (Zn, Mn e Cu) aminoácido e proteinato de Zn, Mn, Cu e Fe. Já Li *et al.* (2018) verificaram redução na largura dos cones mamilares da casca dos ovos ao suplementar a dieta de galinhas poedeiras (Jinghong-1 com 53 semanas de idade) com 60 e 80 mg/kg de Mn-metionina.

O aumento da camada paliçada, associada à redução dos botões mamilares e arranjo regular das colunas calcificadas da casca dos ovos são modificações importantes para resistência da casca (QIU *et al.*, 2019). As modificações observadas na estrutura das cascas podem ser o reflexo da ação conjunto das fontes minerais (Cu, Mn e Zn) de maior biodisponibilidade, atuando no metabolismo de enzimas e proteínas envolvidas na síntese da casca. Entre as enzimas encontra-se a lisil oxidase, responsável pela catalização da reação de oxidação de resíduos de lisina e hidroxilisina em aldeídos, os quais atuarão como centros ativos onde as ligações cruzadas inter e intramoleculares do colágeno e elastina serão formadas (HARRIS *et al.*, 1980b), dando origem a uma estrutura estável (membrana da casca) antes da formação da casca propriamente dita (HARRIS *et al.*, 1980a).

Mais precisamente, alterações na estrutura das diferentes camadas da casca vêm sendo associada ao Mn (XIAO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017b). Quando suplementado nas dietas de galinhas de postura, o Mn tem demonstrado atuar modulando a atividade da enzima Gal $\beta$  1,3- glucuronosiltransferase (GLcAT-I) que atuam na síntese de GAGs (glucosaminoglicanos)

(VENKATESAN *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2014), componentes da matriz orgânica da casca dos ovos (NAKANO *et al.*, 2001, 2002), que podem se ligar covalentemente para formar os proteoglicanos (KJEUIN; LINDAHL, 1991). Os proteoglicanos estão envolvidos nos estágios iniciais de formação da casca que atuam no controle da estrutura e textura da casca (NYS *et al.*, 2004), influenciando diretamente na resistência e espessura (XIAO *et al.*, 2014). Além disso, a glândula da casca desempenha papel fundamental no processo de cristalização e crescimento dos cristais de calcita. Para isso, secretam fluido uterino constituídos por proteínas, entre as quais encontram-se as ovocleidina 17, proteína que pode modificar o hábito de cristalino do carbonato de cálcio e o padrão de crescimento do cristal de calcita, essa proteína interage diretamente com o ânion de bicarbonato, formando um mecanismo potencial responsável por diferentes efeitos sobre o processo de nucleação e crescimento dos cristais (ROSE; HINCKE, 2009).

Desse modo, a suplementação com Zn, Mn e Cu a partir de MCA podem ter promovido uma maior biodisponibilidade destas fontes, a qual atuou na modulação da síntese de GAGs, proteínas e enzimas envolvidos na formação inicial da casca, alterando a espessura das diferentes camadas.

Além desses fatores, um outro ponto que deve ser levado em consideração é a contribuição dos MCA na formação do epitélio da glândula da casca, o qual é composto por células (ex. granulares e ciliadas) responsáveis pela secreção de fluido uterino, que, além de conter elementos minerais, também apresentam proteínas específicas, tais como ovocleidinas, ovocaxinas e osteopontinas, importantes para o processo de formação das estruturas iniciais (membranas da casca ) e posteriormente calcificação da casca (HINCKE *et al.*, 2008). No entanto, a literatura ainda é escassa sobre o efeito dos metais aminoácidos na formação do sistema reprodutor e nas estruturas histológicas destes órgãos das aves de postura, devendo esta avaliação ser levada em consideração em pesquisas futuras.

Os efeitos observados para a distribuição dos elementos sobre a superfície transversal da casca do ovo (Figuras 5 e 6) em que o Ca foi um dos elementos dominantes, distribuído de maneira mais uniforme sobre a superfície transversal das diferentes regiões da casca quando as aves foram suplementadas com MCA-ZMCFe, assemelham-se aos obtidos por Li *et al.* (2019), no qual verificaram que o Ca foi um dos elementos dominantes e distribuídos de maneira uniforme quando as aves ( Hy-Line, 38 semanas de idade) foram suplementadas com 80 mg/kg de Zn- metionina na dieta. De acordo com os autores, essa diferença pode ser, eventualmente, causada por mudanças induzidas por Zn nos depósitos de Ca da casca do ovo, em que o Zn aumentaria a utilização de Ca para formação da casca pelo aumento da atividade da anidrase

carbônica na glândula da casca. Associado ao efeito do Zn na atividade da anidrase carbônica, também podemos salientar uma ação conjunta ao Fe, tendo em vista que este mineral atua sobre o metabolismo ósseo, induzindo a reabsorção dos minerais (TSAY *et al.*, 2010; BALOGH *et al.*, 2018), que serão utilizados para formação da casca. Desse modo, é possível que o Fe tenha provido maiores taxas de reabsorção óssea, proporcionando maiores concentrações de Ca e, o Zn potencializando a ação da anidrase carbônica na glândula da casca, contribuindo para uma maior eficiência na deposição desse mineral nas diferentes superfícies da casca.

## CONCLUSÃO

A suplementação parcial com MCA desde as fases iniciais de criação e a manutenção desta suplementação até o período final de produção em associação ao MCA-Fe reduziram os efeitos da idade das aves sobre as diferentes estruturas da casca dos ovos, promovendo cascas de melhor qualidade no final do período de produção, assim como uma deposição de minerais mais uniforme sobre as diferentes superfícies transversais da casca.

## REFERÊNCIAS

- AL-BATSHAN, H. A.; SCHEIDELER, S. E.; BLACK, B. L.; GARLICH, J. D.; ANDERSON, K. E. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. **Poultry science**, n. 73, pp. 1590–1596, 1994.
- ARAÚJO, J. A. de; HUMBERTO, J.; SILVA, V. da; LIMA AMÂNCIO, A. L. de; LIMA, C. B.; ROGER, E.; OLIVEIRA, A. de. Fontes de Minerais para Poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, pp. 53–60, 2008.
- BALOGH, E.; Paragh, G. Jeney, V. Influence of iron on bone homeostasis. **Pharmaceuticals**, n. 11, pp. 1–18, 2018.
- BARBOSA, V. M.; POMPEU, M. A.; NELSON, D. L.; CUNHA, C. E.; CARDOSO, D. M.; CARDEAL, P. C. Avaliação da qualidade da casca dos ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 64, pp. 1036–1044, 2012.
- FENG, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; QI, G. H.; WANG, J. Uterine transcriptome analysis reveals mRNA expression changes associated with the ultrastructure differences of eggshell in young and aged laying hens. **BMC Genomics**, n. 21, pp. 1–15, 2020.
- FERNANDES, J. I. M., MURAKAMI, A. E.; SAKAMOTO, M. I.; SOUZA, L. M. G.; MALAGUIDO, A.; MARTINS, E. N. Effects of organic mineral dietary supplementation on production performance and egg quality of white layers. **Revista Brasileira de Ciência**

**Avícola**, n. 10, pp. 59–65, 2008.

GAO, S.; YIN, T.; XU, B.; MA, Y.; HU, M. Amino acid facilitates absorption of copper in the Caco-2 cell culture model. **Life Sciences**, n. 109, pp. 50–56, 2014.

GHEISARI, A. A.; SANEI, A.; SAMIE, A.; GHEISARI, M. M.; TOGHYANI, M. Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. **Biological Trace Element Research**, n. 142, pp. 557–571, 2011.

HARRIS, E. D.; BLOUNT, J. E.; LEACH, R. M. Localization of lysyl oridase in hen oviduct: Implications in egg shell membrane formation and composition. **Science**, n. 208, pp. 55–56, 1980a.

HARRIS, E. D.; RAYTON, J. K.; BALTHROP, J. E.; DiSilvestro, R. A.; Garcia-de-Quevedo, M. Copper and the synthesis of elastin and collagen. **Ciba Foundation symposium**, n. 79, pp. 163–182, 1980b.

HEFLIN, L. E.; MALHEIROS, R.; ANDERSON, K. E.; JOHNSON, L. K.; RAATZ, S. K. Mineral content of eggs differs with hen strain, age, and rearing environment. **Poultry Science**, n. 97, pp. 1605–1613, 2010.

HINCKE, M. T.; CHIEN, Y. C.; GERSTENFELD, L. C.; MCKEE, M. D. Colloidal-gold immunocytochemical localization of osteopontin in avian eggshell gland and eggshel. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, n. 56, pp. 467–476, 2008.

JACKSON, B. P.; BERTSCH, P. M.; CABRERA, M. L.; CAMBERATO, J. J.; SEAMAN, J. C.; WOOD, C. W. Trace Element Speciation in Poultry Litter. **Journal of Environmental Quality**, n. 32, pp. 535–540, 2003.

KJEUIN, L.; LINDAHL, U. PROTEOGLYCANS: STRUCTURES AND INTERACTIONS. **Annual Review of Biochemistry**, n. 60, pp. 443–464, 1991.

LI, L. L.; ZHANG, N. N.; GONG, Y. J.; ZHOU, M. Y.; ZHAN, H. Q.; ZOU, X. T. Effects of dietary Mn-methionine supplementation on the egg quality of laying hens. **Poultry Science**, n. 97, pp. 247–254, 2018.

NAKANO, T.; IKAWA, N.; OZIMEK, L. Extraction of glycosaminoglycans from chicken eggshell. **Poultry Science**, n. 80, pp. 681–684, 2001.

\_\_\_\_\_. Galactosaminoglycan composition in chicken eggshell. **Poultry Science**, n. 81, pp. 709–714, 2002.

NYS, Y.; GAUTRON, J.; GARCIA-RUIZ, J. M.; HINCKE, M. T. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. **Comptes Rendus Palevol**, n. 3, pp. 549–562, 2004.

PARK, J. A.; CHO, E. J.; PARK, J. Y.; SOHN, S. H. Histological Change of Uterus Endometrium and Expression of the Eggshell-related Genes according to Hen Age Ji. **Korean journal poultry Sci**, n. 44, pp. 19–28, 2017.

PARK, J. A.; SOHN, S. H. The influence of hen aging on eggshell ultrastructure and shell mineral components. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, n. 38, pp. 1080–1091, 2018.

QIU, J. L.; ZHOU, Q.; ZHU, J. M.; LU, X. T.; LIU, B.; YU, D. Y.; Lin, G.; AO, T.; XU, J. M.

Organic trace minerals improve eggshell quality by improving the eggshell ultrastructure of laying hens during the late laying period. *Poultry Science*, n. 99, pp. 1483–1490, 2019.

RICHARDS, J. D.; ZHAO, J.; HARREIL, R. J.; ATWELL, C. A.; DIBNER, J. J. Trace mineral nutrition in poultry and swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, n. 23, pp. 1527–1534, 2010.

STEFANELLO, C.; SANTOS, T. C.; MURAKAMI, A. E.; MARTINS, E. N.; CARNEIRO, T. C. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. *Poultry Science*, n. 93, pp. 104–113, 2014.

SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. *Veterinarni Medicina*, n. 53, pp. 555–563, 2008.

TSAY, J.; YANG, Z.; ROSS, F. P.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; LIN, H.; COLEMAN, R.; MAYER-KUCKUK, P.; DOTY, S. B.; GRADY, R. W.; GIARDINA, P. J.; BOSKEY, A. L.; VOGIATZI, M. G. Bone loss caused by iron overload in a murine model: Importance of oxidative stress. *Blood*, n. 116, pp. 2582–2589, 2010.

VENKATESAN, N.; BARRÉ, L.; BENANI, A.; NETTER, P.; MAGDALOU, J.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; OUZZINE, M. Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: A strategy to promote cartilage repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, n. 101, pp. 18087–18092, 2004.

WANG, G.; LIU, L. J.; TAO, W. J.; XIAO, Z. P.; PEI, X.; LIU, B. J.; WANG, M. Q.; LIN, G.; AO, T. Y. Effects of replacing inorganic trace minerals with organic trace minerals on the production performance, blood profiles, and antioxidant status of broiler breeders. *Poultry Science*, n. 98, pp. 2888–2895, 2019.

WISTEDT, A.; RIDDERSTRÅLE, Y.; WALL, H.; HOLM, L. Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids. *Acta Veterinaria Scandinavica*, n. 61, pp. 1–14, 2019.

XIAO, J. F.; ZHANG, Y. N.; WU, S. G.; ZHANG, H. J.; YUE, H. Y.; QI, G. H. Manganese supplementation enhances the synthesis of glycosaminoglycan in eggshell membrane: A strategy to improve eggshell quality in laying hens. *Poultry Science*, n. 93, pp. 380–388, 2014.

ZANG, Y. N.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; WANG, J.; QI, G. H. Dietary manganese supplementation modulated mechanical and ultrastructural changes during eggshell formation in laying hens. *Poultry Science*, n. 96, pp. 2699–2707, 2017.