

LUCIMAURO DA FONSECA

**DIFERENTES FONTES DE MICROMINERAIS EM RAÇÕES DE FRANGOS DE
CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Melissa Izabel Hannas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F676d
2023
Fonseca, Lucimauro da, 1996-
Diferentes fontes de microminerais em rações de frangos
de corte / Lucimauro da Fonseca. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (47 f.): il.

Orientador: Melissa Izabel Hannas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.166>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Frango de corte - Alimentação e rações. 2. Rações
-Aditivos. 3. Minerais na nutrição animal. I. Hannas, Melissa
Izabel, 1974-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
III. Título.

CDD 22. ed. 636.50855

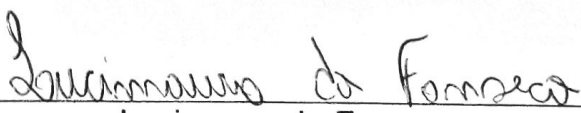
LUCIMAURO DA FONSECA

DIFERENTES FONTES DE MICROMINERAIS EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE

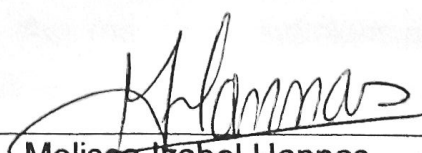
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Lucimauro da Fonseca
Autor



Melissa Izabel Hannas
Orientadora

A Deus pela força, saúde e coragem!
Aos meus pais e amigos por todo o apoio e confiança!
Aos professores, funcionários e demais pessoas que estiveram presentes ao longo
de minha caminhada!
Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a vida, e me dado força para lutar e correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus pais Maria Lucia da Fonseca e Marcelo Batista de Souza, por sempre estarem ao meu lado, me ajudarem e apoiarem em todas as decisões que tomo em minha vida.

A toda minha família: Marcela, Marcelina, Marcilene, Luciano, Maria de Lurde, Sebastião, Rafael, Paloma, Antônio Roberto, José Vicente, Silvana, Daiane, Daira, Valéria, Walerson, Josimar, Josielio, Maria Ducarmo e todos os outros familiares por toda ajuda, conselhos, apoio nos momentos difíceis e por fazerem parte dessa minha caminhada.

A Lorena, que mesmo estando longe sempre me incentivou e torceu para que eu almeje meus sonhos e objetivos.

Aos amigos de republica Romario, Yago, Geovane e Arthur pelas conversas, conselhos, momentos de descontração durante esse importante período de minha vida.

A minha orientadora professora Melissa Izabel Hannas, por todas oportunidades a mim oferecidas, apoio e ensinamentos passados durante a graduação e mestrado, que tanto me ajudaram a crescer e me desenvolver tanto como pessoa quanto profissionalmente.

A equipe NUPENSA, Rogervânia, Joyce, Gustavo, Nathana, Stephane Brighete, Antônio, Careli, Bruno, Davi, Sérgio, Gabriel, Mariana, Maria, Luíza, Gabriela, Beatriz, Dezirrê e Stephane Rodriguês, por todo aprendizado, ajuda durante a condução do experimento e momentos de descontração que tanto favoreceram o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A 'Maria' (Rogervânia) que se tornou uma grande amiga e companheira, por toda ajuda na execução do experimento, nas análises laboratoriais etc...., pela paciência,

carinho, momentos de descontração, brigas e conselhos, que tanto me ajudaram e me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente.

A UFV, todos os professores e funcionários por todos conhecimentos passados, suporte e apoio durante todos esses anos de graduação que tanto favoreceram meu desenvolvimento pessoal e profissional, em especial aos técnicos do LNA (Fabíola, Marcelo e Bernadete), os quais tenho grande carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio na realização do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos e a Alltech pelo apoio durante as pesquisas.

RESUMO

FONSECA, Lucimauro da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Diferentes fontes de microminerais em rações de frangos de corte.** Orientadora: Melissa Izabel Hannas.

Objetivou-se avaliar a suplementação dos microminerais (Cu, Mn, Zn, Fe e Se) em premix fornecidos na forma de proteínatos e selênio levedura e sais inorgânicos em diferentes níveis de suplementação em dietas de frangos de corte sobre desempenho, concentração mineral nos tecidos e status antioxidante nos períodos de 1 a 21 e 1 a 42 dias de idade. 2.475 pintos Cobb-500® machos de 1 dia, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 11 repetições, com 25 aves cada. Os tratamentos foram constituídos por: Dieta basal (DB) + Padrões da indústria brasileira em fonte inorgânica, como controle positivo (CP); DB + Padrão da indústria brasileira, com suplementação micromineral 50% em fonte inorgânica e 50% em fonte orgânica; DB + Minerais em fonte orgânica (MO) em alto nível de suplementação; DB + Minerais em fonte inorgânica (MI) em alto nível de suplementação; DB + MO em nível intermediário de suplementação; DB + MI em nível intermediário de suplementação; DB + MO em baixo nível de suplementação; DB + MI em baixo nível de suplementação e DB sem suplementação micromineral, como controle negativo (CN). Em ambas as fases, houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos para ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e para conversão alimentar (CA) apenas de 1 a 21 dias pelo teste SNK, sendo o tratamento CN o que apresentou os piores resultados. Os resultados dos tratamentos diferiram ($p < 0,05$) do CN e não diferiram ($p > 0,05$) do CP pelo teste de Dunnett. Para atividade da GPx aos 21 e 42 dias, e análise do status antioxidante total aos 42 dias, o tratamento CN proporcionou os piores resultados pelo teste SNK ($p < 0,05$). Para a análise da oxidação proteica aos 42 dias, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos pelo teste SNK, e o tratamento CP-MI/MO diferiu ($p < 0,05$) do CN pelo teste de Dunnet. Já para análise de oxidação lipídica o tratamento CP apresentou o menor resultado, pelo teste SNK ($p < 0,05$). Aos 21 e 42 dias, observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) do tratamento CP-MI/MO sobre a concentração de Mn, Cu e Fe no fígado, ressaltando o efeito benéfico da utilização conjunta de fontes orgânicas e inorgânicas de microminerais. Aves submetidas a dieta CN apresentaram uma menor concentração de Mn, Cu e Fe no fígado aos 21 e 42 dias. A suplementação de microminerais

promove melhora nas respostas de desempenho, parâmetros antioxidantes e concentração mineral nos tecidos, demonstrando a importância da suplementação mineral para manter o desempenho das aves. A suplementação de microminerais em diferentes fontes e níveis não apresentou diferença entre os tratamentos para as respostas dos parâmetros de desempenho, sendo possível utilizar o menor nível de suplementação, o que permite reduzir a quantidade de microminerais na dieta das aves. Enquanto que o status antioxidante no sangue, concentração de microminerais nos tecidos e oxidação tecidual dos frangos de corte são influenciados pelas fontes e níveis de suplementação dos microminerais, indicando que a relação dos microminerais com os mecanismos antioxidante endógenos dos tecidos e deposição tecidual de microminerais devem ser melhor estudados.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Concentração tecidual. Fontes orgânicas. Microminerais.

ABSTRACT

FONSECA, Lucimauro da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2023.
Nutritional supplementation of different sources of microminerals for broilers.
Advisor: Melissa Izabel Hannas.

The objective was to evaluate the supplementation of microminerals (Cu, Mn, Zn, Fe and Se) in premix supplied in the form of proteinates and selenium, yeast and inorganic salts at different levels of supplementation in broiler chicken diets on performance, mineral concentration in tissues and antioxidant status from 1 to 21 and 1 to 42 days. 2,475 male Cobb-500® day-old chicks were distributed in a completely randomized design with 9 treatments, 11 replications, with 25 birds each. Treatments consisted of: Basal diet (BD) + Brazilian industry standards in inorganic source, as positive control (PC); BD + Brazilian industry standard, with micromineral supplementation 50% in an inorganic source and 50% in an organic source; BD + Minerals from an organic source (OM) at a high level of supplementation; BD + Minerals in inorganic source (IM) at high level of supplementation; BD + OM at intermediate level of supplementation; BD + IM at intermediate level of supplementation; BD + OM at low level of supplementation; BD + IM at low level of supplementation and BD without micromineral supplementation, as negative control (NC). In both phases, there was a difference ($p < 0.05$) between treatments for weight gain (WG), feed intake (FI) and feed conversion (FCR) only from 1 to 21 days by the SNK test, with the NC treatment which presented the worst results. Treatment results differed ($p < 0.05$) from NC and did not differ ($p > 0.05$) from PC by Dunnett's test. For GPx activity at 21 and 42 days, and analysis of total antioxidant status at 42 days, the NC treatment provided the worst results by the SNK test ($p < 0.05$). For the analysis of protein oxidation at 42 days, there was no difference ($p > 0.05$) between treatments by the SNK test, and the CP-MI/MO treatment differed ($p < 0.05$) from the NC by the Dunnet test. As for the analysis of lipid oxidation, the PC treatment presented the lowest result, by the SNK test ($p < 0.05$). At 21 and 42 days, there was a significant effect ($p < 0.05$) of the CP-MI/MO treatment on the concentration of Mn, Cu and Fe in the liver, highlighting the beneficial effect of the joint use of organic and inorganic sources of microminerals. Birds submitted to the NC diet showed a lower concentration of Mn, Cu and Fe in the liver at 21 and 42 days. Micromineral supplementation promotes improvement in performance responses, antioxidant parameters and mineral concentration in tissues, demonstrating the importance of

mineral supplementation to maintain bird performance. The micromineral supplementation in different sources and levels showed no difference between the treatments for the responses of the performance parameters, being possible to use the lowest supplementation level, which allows reducing the amount of microminerals in the diet of the birds. While the sources and levels of supplementation of trace minerals influence the antioxidant status in the blood, concentration of microminerals in the tissues and tissue oxidation of broilers, indicating that the relationship of trace minerals with the endogenous antioxidant mechanisms of tissues and tissue deposition of trace minerals must be better studied.

Keywords: Enzymatic activity. Tissue concentration. Organic sources. Microminerals.

SUMÁRIO

Diferentes fontes de microminerais em rações de frangos de corte	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. Introdução	14
2. Material e Métodos.....	16
2.1 Delineamento experimental, animais e dietas	16
2.2 Medições de desempenho	17
2.3 Abate e coleta de amostras.....	17
2.4 Atividade de enzimas antioxidantes	18
2.5 Malondialdeído – MDA.....	18
2.6 Oxidação da proteína carbamoíl	19
2.7 Concentração de microminerais nas dietas e tecidos.....	19
2.8 Análise estatística	20
3. Resultados	20
3.1 Composição das dietas	20
3.2 Medições de desempenho	20
3.3 Atividade de enzimas antioxidantes	21
3.4 Oxidação tecidual.....	22
3.5 Concentração mineral nos tecidos	22
4. Discussão	23
5. Conclusões	31
6. Declarações	32
7. Referências.....	33
8. Tabelas	37

Diferentes fontes de microminerais em rações de frangos de corte

Lucimauro da Fonseca^{1*}, Melissa Izabel Hannas ²

*¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.
lucimauro.fonseca@ufv.br Orcid number (<https://orcid.org/0000-0002-1067-950X>)*

*²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.
melissa.hannas@ufv.br _ Orcid number (<https://orcid.org/0000-0003-3198-0155>)*

* Autor correspondente

O artigo foi formatado de acordo com as normas do periódico Biological Trace Element Research.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a suplementação de microminerais orgânicos e inorgânicos em diferentes níveis sobre desempenho, concentração mineral nos tecidos, status antioxidante e oxidação tecidual de frangos de corte de 1 a 42 dias. 2.475 frangos machos Cobb-500® de 1 dia, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos, 11 repetições, com 25 aves. Os tratamentos consistiram de dieta basal (DB) suplementada com minerais orgânicos e inorgânicos em três níveis (alto, intermediário e baixo). A DB com suplementação inorgânica nos níveis da indústria foi considerada como controle positivo (CP) e a dieta sem suplementação como controle negativo (CN). Também foi considerado um tratamento: DB + nível da indústria, em fonte orgânica 50% e inorgânica 50%. Em ambas as fases o CN apresentou o pior desempenho ($p < 0,05$) e os tratamentos não diferiram ($p > 0,05$) do CP pelo teste de Dunnett. O CN apresentou as piores respostas de atividade da GPx, status antioxidante total e concentrações hepáticas de Mn, Cu e Fe ($p < 0,05$). Houve efeito ($p < 0,05$) do tratamento CP-MI/MO sobre a concentração de Mn, Cu e Fe no fígado. O CP aumentou o MDA no peito aos 42 dias e não houve diferença entre os tratamentos para proteína carbonilada. Os baixos níveis de suplementação não afetam o desempenho dos frangos, sendo possível utilizar o menor nível de suplementação nas dietas. O status antioxidante, concentração de microminerais nos tecidos e oxidação tecidual são influenciados pelas fontes e níveis de suplementação, indicando que a relação dos microminerais com os mecanismos antioxidante e deposição tecidual devem ser melhor estudados.

Palavras-chave: atividade enzimática, concentração tecidual, fontes orgânicas, microminerais

ABSTRACT

The objective was to evaluate the supplementation of organic and inorganic microminerals at different levels on performance, mineral concentration in the tissues, antioxidant status and tissue oxidation of broilers from 1 to 42 days old. 2,475 male Cobb-500® day-old chickens were distributed in a completely randomized design with 9 treatments, 11 replications, with 25 birds. Treatments consisted of a basal diet (BD) supplemented with organic and inorganic minerals at three levels (high, intermediate and low). BD with inorganic supplementation at industry levels was considered as a positive control (PC) and the diet without supplementation as a negative control (NC). A treatment was also considered: BD + industry level, in 50% organic and 50% inorganic source. In both phases, the NC presented the worst performance ($p < 0.05$) and the treatments did not differ ($p > 0.05$) from the PC according to Dunnett's test. The NC showed the worst responses for GPx activity, total antioxidant status and liver concentrations of Mn, Cu and Fe ($p < 0.05$). There was an effect ($p < 0.05$) of the PC-IM/OM treatment on the concentration of Mn, Cu and Fe in the liver. PC increased breast MDA at 42 days and there was no difference between treatments for protein carbonyl. The low levels of supplementation do not affect the performance of the chickens, being possible to use the lowest level of supplementation in the diets. Sources and levels of supplementation, indicating that the relationship of microminerals with antioxidant mechanisms and tissue deposition should be better studied, influence antioxidant status, concentration of microminerals in tissues and tissue oxidation.

Keywords: enzymatic activity, tissue concentration, organic sources, microminerals

1.Introdução

Os microminerais (Cu, Mn, Zn, Fe e Se) são elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento de frangos de corte, por estarem envolvidos em inúmeros processos fisiológicos, participando como cofatores em diversas vias metabólicas essenciais para a manutenção dos tecidos, reprodução, imunidade, formação óssea, atividade antioxidante e metabolismo energético [1, 2].

Na indústria avícola, os microminerais são suplementados às dietas com margem de segurança a fim de se evitar deficiências e assegurar o desempenho. Portanto, é frequente a suplementação de microminerais em excesso, acima das exigências das aves [3]. A suplementação acima da recomendação é motivada pelo fato das principais fontes de suplementação na forma inorgânica (sulfatos, carbonatos, óxidos, cloretos e fosfatos) apresentarem menor custo, baixa biodisponibilidade e taxa de absorção; interações que ocorrem entre os microminerais e escassez de dados sobre as exigências nutricionais de microminerais das aves, uma vez que as últimas recomendações do NRC (1994) [4] e das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos [5], são baseadas em estudos antigos [6] e não refletem as exigências das linhagens atuais.

A baixa biodisponibilidade das fontes inorgânicas de microminerais é um dos principais desafios na sua utilização e está relacionada às suas características químicas [7]. As fontes inorgânicas ao atingirem o trato gastrointestinal precisam ser solubilizadas para que os íons sejam dissociados e posteriormente absorvidos na forma iônica. Na forma iônica os minerais podem se complexar a proteínas, carboidratos, fitatos, oxalatos, taninos ou até mesmo outros minerais, dificultando o processo de absorção, ou ainda os tornando indisponíveis aos animais [8]. Além disso os microminerais inorgânicos dependem da ação de transportadores saturáveis específicos para serem assimilados pelo enterócito e, conseqüentemente, pelo organismo, o que implica em uma baixa biodisponibilidade e absorção de tais fontes [9]. Esses fatores associados ao excesso de minerais comumente utilizados, leva a maior competição e interações negativas entre os minerais, além de aumentar a excreção de minerais no ambiente.

Nesse cenário, o uso de minerais orgânicos é uma opção para substituir as fontes inorgânicas de microminerais, uma vez que em função de sua composição e características químicas, são absorvidos juntamente com as moléculas orgânicas, o

que aumenta sua biodisponibilidade e permite a redução de sua suplementação na dieta, sem diminuir o desempenho animal [2]. Considerando a diferença de digestibilidade, absorção, interação entre minerais e metabolismo, Rostagno et al. [5] sugerem diferentes níveis de suplementação de microminerais para o uso de fontes inorgânicas ou orgânicas em dietas para aves e suínos.

Pesquisas recentes com suplementação dos microminerais Cu, Mn, Zn, Fe e Se na forma de sais inorgânicos ou proteínatos e selênio levedura demonstram o efeito benéfico do uso de fontes orgânicas de microminerais na dieta de frangos de corte. Ferreira Jr. et al. [10, 11] verificaram melhor conversão alimentar nas aves suplementadas com proteínato de Fe e Cu, respectivamente; Carvalho et al. [12] determinaram menor exigência de Mn para ganho de peso e conversão alimentar com a suplementação de proteínato de Mn; Carvalho et al. [13] verificaram que a fonte de Zn proteínato proporcionou o melhor ganho de peso e maior retenção de Zn no fígado e Mn no fígado e tibia; e Arnaut et al. [14] observaram maior biodisponibilidade da selênio levedura quando avaliada a retenção de Se na carcaça, penas e corpo total de frangos de corte. Os menores níveis de suplementação dos microminerais na forma de proteínatos e selênio levedura que garantiram o desempenho das aves, nos distintos ensaios foram próximos aos níveis recomendados por Rostagno et al. [5] para minerais orgânicos. No entanto, os períodos experimentais foram de apenas 10 dias (7 aos 18 dias de idade) e a dieta utilizada era semi-purificada, o que não representa um cenário de produção comercial, sendo necessária a validação dos níveis de suplementação dos microminerais, bem como avaliação de suas interações quando fornecidas as aves durante o período de produção.

Considerando o exposto, as hipóteses a serem testadas são: menores níveis de suplementação de microminerais (Cu, Mn, Zn, Fe e Se) na forma de proteínatos e selênio levedura suportam o desempenho das aves, a concentração de minerais e o status antioxidante obtidos com maiores níveis de microminerais da forma de sais inorgânicos utilizados na indústria. A suplementação de microminerais na forma de proteínatos e selênio levedura e de sais inorgânicos conjuntamente nos níveis da indústria promovem melhores respostas de desempenho, concentração de minerais e status antioxidante das aves.

Com isso, objetivou-se avaliar a suplementação de diferentes níveis de microminerais (Cu, Mn, Zn, Fe e Se) fornecidos na forma de proteínatos e selênio

levedura e sais inorgânicos em dietas de frangos de corte sobre desempenho, concentração mineral nos tecidos e status antioxidante de 1 a 42 dias de idade.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG no período de março a abril de 2022. O mesmo seguiu às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Brasil, 2008) e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Produção Animal da (CEUAP – UFV), da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) protocolo nº057/2022.

2.1 Delineamento experimental, animais e dietas

Um total de 2.475 pintos Cobb-500® machos de 1 dia de idade foram pesados individualmente (peso médio 45g) e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 9 tratamentos (Tabela 1) e 11 repetições, totalizando 99 unidades experimentais com 25 aves cada. A unidade experimental foi constituída por um boxe de concreto (2 m de comprimento x 1 m de largura x 0,6 m de altura) com bebedouros tipo nipple, comedouros de aço inox e piso coberto com maravalha. O período experimental foi de 42 dias e as aves receberam ração e água *ad libitum* de acordo com cada tratamento.

Durante todo o período experimental as aves receberam dietas à base de milho e farelo de soja (Tabela 2) a fim de atender ou superar as exigências estabelecidas por Rostagno et al. [5] de 1 a 21 e de 22 a 42 dias de idade.

Os tratamentos consistiram de uma dieta basal (DB) à base de milho e farelo de soja suplementadas com um complexo enzimático (ALLZYME SSF®). A DB foi formulada considerando a matriz enzimática equivalente para energia, cálcio e fósforo. Os tratamentos dietéticos foram estabelecidos para atingir os diferentes níveis de suplementação de microminerais na forma de premixes inorgânicos (sulfatos de ferro, cobre, zinco e manganês e selenito de sódio) e orgânicos (proteínatos de Manganês, Cobre, Ferro, Zinco e selênio levedura) na inclusão de 2kg/ton de ração. O iodo foi suplementado em ambos os premixes como iodato de cálcio. Os tratamentos foram constituídos por: DB + Padrões da indústria brasileira em fonte inorgânica, como

controle positivo (CP); DB + Padrão da indústria brasileira, com suplementação micromineral 50% em fonte inorgânica e 50% em fonte orgânica (CP-MI/MO); DB + Minerais em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A); DB + Minerais em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A); DB + Minerais em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I); DB + Minerais em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I); DB + Minerais em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B); DB + Minerais em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B) e DB sem suplementação de microminerais, como controle negativo (CN).

As composições dos suplementos microminerais utilizados nos tratamentos experimentais na fase I e na fase II são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

As temperaturas máximas e mínimas foram mensuradas durante toda fase experimental, com a utilização termômetros distribuídos ao longo do galpão. De 1 a 7 dias as aves receberam aquecimento através de lâmpadas incandescentes (Empalux®, modelo de secagem E 27, 250w por 220v), com o objetivo de auxiliar e manter a temperatura do ambiente dentro da zona de conforto para as aves, sendo utilizadas uma lâmpada por boxe. Após essa fase foi realizado manejo das cortinas laterais para a manutenção da temperatura interna do galpão. O programa de luz adotado seguiu as diretrizes do manual da linhagem.

2.2 Medições de desempenho

As aves foram pesadas aos 1, 21 e 42 dias para determinação do peso vivo e posterior cálculo do ganho de peso (GP), do mesmo modo as rações fornecidas e sobras foram quantificadas para posterior cálculo do consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA). A taxa de mortalidade também foi monitorada e utilizada para correção da CA.

2.3 Abate e coleta de amostras

Aos 21 e 42 dias de idade, 1 animal de cada repetição (11aves/tratamento) foi selecionado para coleta de sangue e abatido por deslocamento cervical para coleta das amostras de fígado e peito. Antes do abate, amostras de sangue foram obtidas por meio de punção cardíaca e coletadas utilizando três tubos. Tubos vacutainer

heparinizados contendo heparina de sódio para posterior análise da atividade sanguínea total de glutathione peroxidase (GPx), tubos vacutainer contendo EDTA para análise da atividade da superóxido dismutase (SOD) e tubos de soro vacutainer para análise do status antioxidante total (TAS). Após a coleta de sangue, foi realizada uma incisão na cavidade abdominal das aves e realizada a coleta de amostras de peito e fígado. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análises de concentração mineral e oxidação tecidual.

2.4 Atividade de enzimas antioxidantes

Para análise de SOD, o sangue foi centrifugado por 3 vezes a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C, (Modelo DTR-21000-220V), com sucessivas lavagens utilizando 3 mL de solução salina a 0,9 %, removendo o sobrenadante em cada lavagem a fim de obter somente a massa de hemácias. Para análise de TAS as amostras de sangue também foram imediatamente centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C, para a obtenção do soro. As amostras de sangue destinados para análise de GPx foram acondicionados em caixas térmicas, juntamente com gelo reciclável, e encaminhados para laboratório para realização da análise. Todas as amostras de sangue processadas, exceto amostras para análise de GPx, foram congeladas à temperatura de -80°C para posterior análise. A atividade enzimática foi determinada através dos kits da Randox Laboratories Ltda. (County Antrim, Reino Unido) Ransel®, Ransod® e TAS® respectivamente, seguindo as orientações do fabricante, sendo as análises de GPx e SOD realizadas no equipamento automático Mindlay/BioClin, BS200E e as análises de TAS realizada em um leitor de microplacas.

2.5 Malondialdeído – MDA

Aos 42 dias foi realizada análise do teor de MDA em amostras de tecido do peito, para isso 100mg de amostra de peito foram pesados e homogeneizados com 1mL de tampão fosfato pH 7,0 para lise celular. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10min, o sobrenadante foi usado para análise. A 50 µL do homogenato foi adicionada 350 µL de uma solução de TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25M de ácido clorídrico). Em seguida, foi aquecido em água fervente por 40 minutos, resfriado e adicionado álcool butílico (600µL),

agitado em vórtex e centrifugado a 6.000g. Em seguida foi realizada a quantificação da concentração de MDA em um leitor de microplacas ($\lambda = 535\text{nm}$). A concentração de MDA foi determinada usando uma curva padrão de concentrações conhecidas de 1, 1, 3,3-tetrametoxipropano (TEMPO). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína [15].

2.6 Oxidação da proteína carbamoil

Aos 42 dias foi mensurado teor de proteína carbamoil em tecidos do peito usando o método de Levine et al. [16], que utiliza a reação dos grupos carbonila com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) promovendo melhor especificidade e sensibilidade nas análises. Para esta análise, 100mg de tecido do peito, foram pesados e homogeneizados com 1mL de tampão fosfato pH 7,0 para lise celular. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi usado para análise. 500 μL de uma solução de 10mmol/L de DNPH diluída em ácido clorídrico (7%) foi adicionada à amostra, mantendo-a em temperatura ambiente no escuro e agitando periodicamente por 30 min. Em seguida, 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% gelado foi adicionado a cada tubo, centrifugado (5000g por 10min) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com acetato de etila e etanol (1:1). Por fim, adicionou-se 500 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 6% e mediu-se a absorbância a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

2.7 Concentração de microminerais nas dietas e tecidos

Amostras de peito e fígado foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, moídas em moinho de bolas (Micro spray mill, R-TE 350, TECNAL® - São Paulo, Brasil) e armazenadas para posterior análise de matéria seca (Método G-003/1), cinzas (Método M-001/2) e minerais (M-004/3) [17]. Para análise de minerais, alíquotas de 0,2g foram pesadas em balança analítica (precisão de 0.0001), adicionados 5ml de solução de ácido nitroperclórico 4:1 (4 partes de ácido nítrico e 1 parte de ácido perclórico) e digeridas em bloco digestor a 200°C. A solução mineral final foi filtrada em papel quantitativo utilizando balão de 25 ml, e posteriormente lida

em espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES optima 8300).

Amostras de cada uma das rações experimentais foram coletadas, e submetidas a análise de matéria seca (Método G-003/1), proteína bruta (Método N-001/2), extrato etéreo (Método G-005/2), cinzas (Método M-001/2) e minerais (M-004/3) conforme descritos por Detmann et al. [17].

2.8 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste SNK à 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Cada box foi designado como uma unidade experimental para as variáveis de desempenho e a ave foi designada como uma unidade experimental para as demais variáveis. Após ANOVA todos os tratamentos foram comparados com o controle positivo e negativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett, à 5% de probabilidade. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no programa R version 4.2.1 (RStudio, 2022). Os dados foram expressos na forma de médias \pm SEM.

3.Resultados

3.1 Composição das dietas

Os nutrientes analisados nas dietas utilizadas na alimentação dos frangos nas fases de 1 a 21 dias e 21 a 42 dias, são apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente. De maneira geral, a composição nutricional e os valores de microminerais analisados nas dietas foram próximos dos valores calculados estabelecidos para os tratamentos experimentais.

3.2 Medições de desempenho

Os resultados de desempenho são apresentados nas Tabelas 7 e 8. Houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos para peso corporal (PC), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) pelo teste SNK, na fase de 1 a 21 dias. E para a fase de 1 a 42 dias também houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos para todas as variáveis de desempenho exceto para CA. Sendo que as

aves submetidas ao tratamento CN apresentaram os piores resultados de desempenho PC, GP, CR e CA na fase de 1 a 21 dias e PC, GP, CR de 1 a 42 dias de idade. Os resultados de desempenho obtidos entre os tratamentos não diferiram do CP pelo teste de Dunnett ($p>0,05$). No entanto, os parâmetros de desempenho PC, GP, CR e CA de 1 a 21 dias de idade e PC, GP, e CR de 1 a 42 dias de idade das aves de todos os tratamentos apresentaram diferenças ($p<0,05$) quando comparados ao CN.

3.3 Atividade de enzimas antioxidantes

Os resultados de atividade enzimática e status antioxidante total (TAS) aos 21 e 42 dias são apresentados na Tabela 9. Aos 21 dias o tratamento CN promoveu menor atividade da enzima GPx o qual foi semelhante ao obtido com MO-B e inferior aos demais tratamentos. Todos os tratamentos diferiram do tratamento CN pelo teste de Dunnett ($p<0,05$), enquanto somente os tratamentos MO-B, MI-B, MI-A e MO-I diferiram do tratamento CP pelo teste de Dunnett ($p<0,05$). Aos 21 dias não houve efeito dos tratamentos sobre a atividade da enzima SOD e sobre o TAS ($p>0,05$).

Aos 42 dias a menor atividade da enzima GPx foi verificada no tratamento CN ($p<0,05$), quando comparada aos demais tratamentos, seguida pelo tratamento MO-B, que apresentou valor intermediário e demais tratamentos apresentaram valores superiores de GPx. Pelo teste de Dunnett as aves que receberam dieta com MO-B, MI-B, MO-I apresentaram menor GPx quando comparadas ao CP ($p<0,05$). Na comparação com o CN, o tratamento MO-B foi semelhante a este na atividade da GPX ($p>0,05$).

Aos 42 dias, observou-se diferença entre os tratamentos pelo teste SNK ($p<0,05$) para TAS, onde o tratamento controle negativo foi o que apresentou os piores resultados, sendo este inferior aos observados nos tratamentos com CP-MI/MO, MO-B, MI-B, MO-A e MI-A, os quais foram semelhantes entre si. Os tratamentos CP-MI/MO, MO-B, MI-B, MO-A e MI-A, diferiram também do CN pelo teste de Dunnett ($p<0,05$).

3.4 Oxidação tecidual

Os resultados de oxidação tecidual são apresentados na Tabela 10. Para a análise da oxidação de proteínas através da quantificação da concentração de proteína carbamoil, não foi observado diferença entre os tratamentos pelo teste SNK ($p > 0,05$), no entanto, foi observada uma diferença numérica entre os tratamentos com o CN apresentando os maiores valores. A concentração de proteína carbamoil no tratamento CP-MI/MO diferiu do tratamento CN pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$) e nenhum dos tratamentos diferiu do CP pelo teste de Dunnett ($p > 0,05$).

Para análise da oxidação lipídica através da quantificação da concentração de malondialdeído, observou-se diferença entre os tratamentos pelo teste SNK ($p < 0,05$), sendo que o tratamento controle positivo apresentou o pior resultado diferindo de todos os demais tratamentos. Todos os tratamentos diferiram do CP, apresentando menores valores de MDA, enquanto os tratamentos CP-MI/MO e MO-B apresentaram valores que diferiram do CN pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

3.5 Concentração mineral nos tecidos

Os resultados de concentração mineral nos tecidos peito e fígado dos frangos de corte aos 21 e 42 dias, são apresentados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. Ao avaliar a concentração mineral no peito das aves aos 21 dias de idade foi verificada menor concentração de zinco para o tratamento MO-B quando comparado ao CN, não sendo verificada diferença ($p > 0,05$) entre MO-B ou CN com os demais tratamentos. Sobre a concentração de Fe aos 21 dias não se observou efeito dos tratamentos ($p > 0,05$) no peito das aves. Para o fósforo observou-se menor concentração no peito das aves submetidas ao tratamento MI-B os quais foram inferiores aos obtidos nos tratamentos MO-A, MI-A, MO-I, MI-I e CN.

Para a concentração mineral no fígado aos 21 dias de idade houve uma menor ($p < 0,05$) concentração de manganês para o tratamento CN e maior concentração no tratamento CP-MI/MO. Não houve diferença na concentração mineral entre os tratamentos para zinco e fósforo ($p > 0,05$). A maior concentração de cobre no fígado foi verificada para o tratamento CP-MI/MO, enquanto todos os outros tratamentos apresentaram menores valores, mas não diferiram entre si ($p < 0,05$). Para o ferro observou-se maiores concentrações no fígado para os tratamentos CP, CP-MI/MO,

MO-B, MO-A, MI-A e menores concentrações para os tratamentos MO-I, MI-I e CN. Ao avaliar o teor de cinzas no fígado aos 21 dias, verificou-se que o tratamento MI-I apresentou o maior valor e o tratamento CN apresentou o menor valor.

Não houve diferença para concentração de Zn e P no peito das aves aos 42 dias ($p > 0,05$). Foi observada diferença entre os tratamentos para concentração de Cu no peito ($p < 0,05$), com menores concentrações nos tratamentos CP e CP-MI/MO e maiores com o tratamento MO-A. O tratamento MO-A proporcionou maior concentração de Fe, sendo superior aos tratamentos MI-A, MO-I, MI-I e CN, que apresentaram as menores concentrações de Fe. O percentual de cinzas foi influenciado pelos tratamentos ($p < 0,05$), com os tratamentos CP, CP-MI/MO e CN apresentando os maiores resultados, sendo superiores aos tratamentos MI-A, MO-I e MI-I, com os menores valores. Os frangos de corte submetidos ao tratamento MO-A apresentaram concentrações de Zn, Cu e Fe no peito aos 42 dias de idade superior e que diferiram das concentrações de Zn, Cu e Fe ($p < 0,05$) obtidas nos tratamentos CP e CN pelo teste de Dunnett.

Ao avaliar a concentração mineral no fígado aos 42 dias verificou-se que os tratamentos CP e CP-MI/MO promoveram maiores ($p < 0,05$) teores de manganês, e o tratamento CN apresentou a menor concentração. Para concentração de cobre no fígado, verificou-se que o tratamento CP-MI/MO apresentou a maior concentração ($p < 0,05$) e os tratamentos MO-B e CN apresentaram menores concentrações. Ao avaliar a concentração de ferro no fígado foi observado que o tratamento CP apresentou maior concentração e o tratamento CN apresentou a menor ($p < 0,05$). Houve diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$), para os percentuais de cinzas sendo que o tratamento CP apresentou o maior valor e os tratamentos CP-MI/MO, MO-A, MI-A, MO-I, CN apresentaram menores valores.

4. Discussão

Como podemos observar, os animais que receberam as dietas com baixos níveis de suplementação micromineral na forma de proteinatos (Mn, Fe, Cu, Zn) e selênio levedura apresentaram desempenho semelhante aos animais submetidos às dietas com minerais inorgânicos (sulfatos de ferro, cobre, zinco e manganês e selenito de sódio), nos níveis utilizados pela indústria e em níveis altos de suplementação em ambas as fontes. Essa manutenção das respostas de desempenho pode estar

atrelada às características químicas das fontes orgânicas, proporcionando aumento na biodisponibilidade mineral e eficiência na absorção [14]. Dessa forma, em razão da maior biodisponibilidade evidenciada pelas fontes quelatadas de microminerais, pode-se afirmar que mesmo em baixos níveis de suplementação, os microminerais na forma orgânica são adequados para assegurar o desempenho dos animais. Além de favorecer a redução dos custos de produção e minimizar o impacto ambiental causado pela excreção de minerais nas excretas, diminuindo a carga poluente do sistema de produção [18]. Resultados semelhantes foram relatados por Kong et al. [3] e Zhu et al. [19] que ao suplementarem frangos de corte com baixos níveis de microminerais em fonte orgânica, não observaram efeitos negativos sobre o desempenho das aves.

A suplementação de Zn, Fe, Cu, Mn, Se e I em níveis adequados, ou seja, que supram as exigências das aves, faz-se necessária para que o organismo se mantenha em homeostase e conseqüentemente haja ganho no desempenho [20]. Dessa forma, quaisquer alterações nos níveis de suplementação dos microminerais da dieta podem promover desbalanço mineral no organismo do animal e modular de forma negativa as respostas de desempenho.

Pressupunha-se que os tratamentos com altos níveis de microminerais na fonte orgânica se sobressaíssem sobre os demais, no entanto, como demonstrado pelos nossos resultados torna-se evidente que a suplementação com níveis de microminerais orgânicos acima da exigência não promove efeitos benéficos adicionais no desempenho. Isso possivelmente se deve ao suprimento das necessidades do animal e à excreção do mineral excedente, além da possibilidade de competição pós absorção e efeitos pró-oxidantes dos microminerais. Segundo Kong et al. [3] a suplementação de altos níveis de microminerais na forma orgânica promove excesso de minerais a ser excretado, aumentando o potencial poluente das excretas. Resultados semelhantes foram relatados por Bao et al. [1] ao suplementarem frangos de corte com altos níveis de minerais quelatados, os quais não observaram efeitos adicionais dos altos níveis utilizados.

O organismo animal faz uso de diversas estratégias na tentativa de manter a homeostase mineral [21], priorizando assegurar as funções vitais em detrimento do ganho corporal, dessa forma, em condição de deficiência de microminerais, o animal tende a reduzir o CR e conseqüentemente apresentar piora nas respostas de desempenho [1]. Tal afirmativa valida os resultados obtidos com a dieta CN, na qual a não suplementação dos microminerais Zn, Fe, Cu, Mn, Se e I, deprimiu as respostas

de desempenho em ambas as fases de criação dos frangos de corte. Resultados semelhantes foram relatados por Ghasemi et al. [7] ao avaliarem diferentes níveis de substituição do mineral inorgânico por minerais de fontes orgânicas, os autores observaram que aves não suplementadas apresentaram piora no desempenho.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a concentração de oxidantes e antioxidantes no organismo, devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a redução na taxa de sua remoção pelo sistema de defesa antioxidante. Esse distúrbio metabólico favorece a oxidação dos compostos celulares, fazendo com que a célula perca sua função ou até mesmo ocasiona a morte da mesma [22].

Os minerais por serem cofatores de enzimas antioxidantes como por exemplo, o selênio como um componente da GPx, zinco, cobre e manganês que ativam a SOD e ferro como parte da catalase (CAT) atuam de maneira indireta na redução do estresse oxidativo, e conseqüentemente na melhora do status antioxidante [7]. Nesse sentido o balanço correto dos microminerais proporciona efeitos benéficos no status antioxidante do organismo. Em nossa pesquisa, pode-se observar que as aves que receberam dietas sem suplementação micromineral apresentaram uma menor atividade da enzima glutathione peroxidase aos 21 e 42 dias de idade. Isso deve-se aos efeitos adversos do CN sobre o status antioxidantes das aves, uma vez que por não ser capaz de atender às exigências de microminerais das aves, apresentou maiores danos oxidativos, com menor atividade da enzima glutathione peroxidase aos 21 e 42 dias, menor capacidade antioxidante total e tendência de aumento na oxidação de proteínas aos 42 dias. Segundo Arnaut et al. [14] em espécies aviárias, o Se é necessário para a síntese de selenocisteína (Se-Cys), um aminoácido presente em selenoproteínas de importância biológica no metabolismo avícola, como a família glutathione peroxidase, o que justifica a menor atividade da enzima GPx nas aves não suplementadas, devido à falta de selênio, mineral essencial para atividade dessa enzima, prejudicando de forma drástica a capacidade antioxidante do organismo do animal, o que se refletiu no impacto negativo sobre o desempenho dos frangos.

Aos 21 dias o tratamento MO-B apresentou uma menor atividade sanguínea da enzima glutathione peroxidase não se diferenciando do controle negativo e aos 42 dias o mesmo também apresentou os menores valores de atividade da glutathione peroxidase ficando próximo ao CN, com base nesses resultados hipotetizamos que o baixo nível de selênio possivelmente limitou a ação da enzima, uma vez que como

visto o selênio é o principal cofator da GPx, e embora as fontes orgânicas de selênio apresentem maior biodisponibilidade, a utilização do selênio pelo organismo é diferente quando se trabalha com fontes orgânicas e inorgânicas, uma vez que após ser absorvido no intestino, as fontes diferem quanto às vias metabólicas de incorporação às selenoproteínas [23].

Após a absorção, o Se advindo da fonte inorgânica (selenito de sódio) é convertido em seleneto de hidrogênio (H_2Se) no fígado. O seleneto pode sofrer uma metilação e ser excretado ou pode ser convertido em selenofosfato ($HSePO_3^{2-}$) para ser incorporado às selenoproteínas, como a GPx [24]. A via de incorporação do selênio advindo das fontes orgânicas às selenoproteínas difere principalmente nas etapas anteriores a formação do H_2Se . A selênio metionina (Se-Met) presente na fonte orgânica de selênio (selênio levedura) precisa sofrer uma transsulfuração em selênio cisteína (Se-Cys) antes de ser convertida à H_2Se [25]. Dessa forma, o processo de incorporação do selênio de fontes orgânicas às selenoproteínas requer mais etapas do que o selenito, o que explica, em parte, a menor eficiência de utilização do Se orgânico para produzir tais selenoproteínas, corroborando com nossos resultados. Nossos achados corroboram com a pesquisa de Arnaut et al. [14] que avaliando os efeitos de fonte e nível de selênio sobre o desempenho, retenção de selênio e respostas bioquímicas de pintos de corte em crescimento, observaram que aves alimentadas com dietas contendo selênio levedura e minerais orgânicos exibiram valores mais baixos de atividade de GPx no sangue em comparação com pintos alimentados com selenito de sódio.

De acordo com Carvalho et al. [12] microminerais como Fe, Cu e Zn livres podem agir como pró-oxidantes. Aos 21 e 42 dias os tratamentos com níveis mais altos de microminerais apresentaram maior atividade da enzima GPx. De forma geral, esses tratamentos apresentam alta suplementação de microminerais, o que pode potencializar o efeito pró-oxidantes de alguns microminerais, refletindo no aumento da atividade da enzima. O ferro é um dos principais microminerais com efeito pró-oxidante via reação de Fenton e Haber-Weiss, que consiste na oxidação dos íons de Fe e conseqüente formação de radicais livres. Grande parte do ferro intracelular está na forma de cátion (Fe^{3+}) e para ser utilizado como catalizador da reação de Fenton, é necessário a oxidação para Fe^{2+} , como produto dessa reação tem-se a formação do radical hidroxil e do peróxido de hidrogênio, dois dos principais ROS que causam danos aos tecidos [26].

O excesso de Cu na dieta também pode levar ao aumento na produção de ROS, ocasionando aumento do estresse oxidativo, levando à oxidação de células e tecidos de frangos de corte [11]. Do mesmo modo o Zn quando em excesso ou deficiência pode atuar como um pró-oxidante, por três principais motivos: primeiramente pelo excesso de zinco causar deficiência de Cu, sendo o Cu um componente essencial da enzima SOD, pode haver redução na atividade dessa enzima e conseqüentemente maior oxidação de tecidos; em segundo lugar, em situações de estresse oxidativo a capacidade do Zn de se ligar a metalotioneína é reduzida, aumentando a concentração de Zn livre, o que induz um estado pró-oxidativo, e em terceiro lugar a atividade pró-oxidante do Zn está relacionada a sua baixa concentração, uma vez que essa condição causa a morte celular e produção de ROS [22].

A SOD é uma enzima antioxidante que catalisa o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio que é um radical livre menos danoso as células. Na literatura ela é descrita como a primeira linha de defesa contra os radicais livres, sendo sua atividade importante para manutenção do status antioxidante do organismo [27]. A eficácia da atividade da SOD é dependente da disponibilidade dos microminerais como Cu, Zn e Mn, os quais participam como cofatores essenciais da CuZn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular [28]. Em nossa pesquisa não foi observado efeito dos tratamentos sobre a atividade da SOD aos 21 e 42 dias, fato inesperado, uma vez que se esperava maior atividade da SOD com a suplementação de microminerais na fonte orgânica, devido suas características químicas de maior biodisponibilidade e estabilidade mineral. Arnaut et al. [14] avaliando a utilização de microminerais em fontes inorgânicas e orgânicas em diferentes níveis, também não encontraram diferença nas concentrações de superóxido dismutase independente da fonte ou nível utilizado. No entanto Kong et al. [3] avaliando o efeito de minerais traço baseados em tecnologia de quelato sobre o status antioxidante em frangos de corte, demonstraram que todos os grupos suplementados com microminerais, exibiram um aumento nas atividades séricas de GPx e SOD quando comparados ao grupo que não recebeu nenhum tipo de suplementação mineral.

O malondialdeído (MDA) é uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) gerado durante o processo de oxidação lipídica, que ocorre em condições de estresse oxidativo, e por esse motivo é comumente utilizado como marcador de oxidação lipídica em tecidos [29]. Portanto, juntamente com a análise da atividade de

enzimas antioxidantes como a SOD, GPx e CAT poder ser usado para refletir o status antioxidantes em animais [7].

No presente estudo, a concentração de MDA foi maior nas aves alimentadas com o tratamento CP, constituídos por minerais inorgânicos nos níveis utilizados pela indústria brasileira. Sabe-se que usualmente os níveis de suplementação dos microminerais adotados em dietas comerciais, estão muito acima das exigências das aves e das recomendações do NRC ou das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos [6]. Considerando tal fato associado com a capacidade pró-oxidante de alguns microminerais, como mencionado anteriormente, pode-se sugerir que a maior concentração de MDA encontrada no peito das aves possivelmente se deu pelo excesso de microminerais na dieta e devido ao tipo de fonte de suplementação utilizada.

Como já descrito o Fe é um dos principais microminerais com efeito pró-oxidante, através da reação de Fenton e Haber-Weiss e como produto dessa reação tem-se a formação do radical hidroxil e do peróxido de hidrogênio [30]. Essa reação ocorre naturalmente no organismo animal, principalmente na ação dos macrófagos no combate à infecções bacterianas, no processo de fagocitose [31]. Quando em equilíbrio oxidativo, a produção de radicais pela reação de Fenton não promove prejuízos ao funcionamento normal do organismo, porém, quando em processo de estresse oxidativo, os radicais produzidos na reação de Fenton provocam danos oxidativos principalmente aos lipídeos poliinsaturados das membranas celulares, levando à peroxidação lipídica e como efeito secundário, pode ocorrer dano oxidativo em proteínas e DNA [11]. Além disso é descrito na literatura que a carne de frango tem alto potencial de oxidação devido ao seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados [2].

Ferreira Jr. et al. [11] trabalhando com suplementação micromineral orgânica e inorgânica na dieta de pintos de corte em crescimento relataram uma tendência no aumento na concentração de MDA do músculo do peito de pintos alimentados com a fonte inorgânica. Além disso os autores também demonstraram que microminerais inorgânicos promoveram aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx, tais achados corroboram com a teoria de que minerais inorgânicos têm maior atividade pró-oxidante em comparação com os orgânicos.

Diante do exposto e considerando as maiores concentrações de MDA no peito das aves alimentadas com dieta CP, pode-se supor que níveis de suplementação

micromineral acima das exigências na fonte inorgânica fornecem íons em excesso e potencialmente reativos, uma vez que fontes inorgânicas de microminerais são mais afetadas pela variação de pH, o que reduz sua estabilidade e os torna mais susceptíveis ao processo de dissociação [12], potencializando seu efeito pró-oxidante.

Outro parâmetro utilizado para avaliação do status antioxidante dos animais é a oxidação de proteína, uma vez que as espécies reativas de oxigênio podem causar danos às macromoléculas DNA, lipídeos e proteínas [30]. A oxidação de proteínas resulta na produção de grupos estáveis de carbonil, os quais podem ser utilizados como biomarcadores do dano oxidativo [32].

Podemos observar que não houve diferença estatística entre os tratamentos para a concentração de proteína carbonilada, no entanto houve uma diferença numérica entre eles, com o tratamento CN tendendo a apresentar os maiores valores. Como já discutido anteriormente, os microminerais atuam como cofatores das enzimas antioxidantes [7], dessa forma, pode-se inferir que o aumento da oxidação de proteínas, indicado pela maior concentração de proteína carbonilada, assim como os resultados inferiores de desempenho das aves podem ser consequência do desequilíbrio do sistema antioxidante do organismo das aves causado pela deficiência de microminerais essenciais para ativação das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante.

Considerando os resultados de oxidação tecidual apresentado na Tabela 11, podemos observar que tanto a não suplementação quanto o excesso de microminerais promoveram danos oxidativos distintos aos tecidos, uma vez que a dieta CP promoveu aumento no MDA, enquanto que o CN proporcionou redução no MDA e tendeu a aumentar a concentração de proteína carbonilada. Dessa forma, podemos supor que a oxidação de proteínas não é acompanhada pela oxidação lipídica, indicando que a relação dos microminerais com os mecanismos antioxidante endógenos dos tecidos devem ser melhor estudados.

Os níveis de microminerais da dieta afetam diretamente as concentrações de microminerais nos tecidos [33], dessa forma, a mensuração da concentração de minerais em tecidos alvos é um importante indicador de biodisponibilidade mineral, e pode afetar de forma direta o funcionamento normal do organismo animal.

Aves alimentadas com a dieta CN, ou seja, sem suplementação de microminerais, exibiram menores concentrações hepáticas de Mn, Cu e Fe aos 21 e 42 dias. Como o fígado é um dos principais locais de armazenamento de

microminerais no organismo [34], atuando como órgão alvo na manutenção da homeostase desses no corpo do animal, as menores concentrações observadas com a dieta CN reforçam a importância da correta suplementação de microminerais para o atendimento das exigências e deposição tecidual de microminerais em frangos de corte [20].

Não foi observada leitura para Mn nas amostras de peito em ambas as fases analisadas, possivelmente a não detecção do Mn no peito está relacionada às características intrínsecas do metabolismo do Mn, em virtude da baixa taxa de absorção e às diversas interações que ocorrem entre Mn e outros minerais, como Ca, P, Zn, Cu e Fe além de outras moléculas, como o fitato [35].

Considerando as principais interações antagônicas entre Mn e os microelementos Zn, Cu e Fe, destaca-se a competição por sítios de ligação do transportador DMT1 (Divalente Metal Transporter 1) presente na borda em escova duodenal [36]. O DMT1 atua principalmente no transporte de Mn, mas também transporta íons de ferro, zinco e cobre, o que gera competição por sítios de transporte, prejudicando a absorção do Mn e conseqüentemente reduzindo sua deposição nos tecidos [12]. Aliado a isto, segundo Jasek et al. [37] o Mn possui baixo armazenamento corporal, tendendo a se armazenar na matriz inorgânica do tecido ósseo. Diante do exposto, pode-se supor que a não detecção do Mn nas amostras de peito pode estar relacionados ao efeito conjunto dos fatores listados acima.

Aos 21 e 42 dias, observou-se um efeito benéfico do tratamento CP-MI/MO sobre a concentração de Mn, Cu e Fe no fígado, ressaltando o efeito benéfico da utilização conjunta de fontes orgânicas e inorgânicas de microminerais. Minerais provenientes de fontes inorgânicas interagem entre si durante o processo de absorção e transporte, competindo por sítios de absorção e transportadores de membrana, reduzindo a taxa de absorção [7]. Enquanto, que os minerais na forma orgânica são absorvidos pelas rotas de seus ligantes orgânicos, o que reduz competições e complexações indesejadas [2]. O tratamento correspondente a suplementação 50% na fonte orgânica e 50% na fonte inorgânica, apresentou bons resultados de desempenho, concentração mineral tecidual, resposta das enzimas antioxidantes e parâmetros de oxidação proteica e lipídica, tais resultados demonstram o efeito positivo do uso das diferentes rotas de absorção dos microminerais das fontes utilizadas, favorecendo a absorção mineral simultânea por diferentes rotas. As maiores concentrações dos minerais Cu, Fe e Zn no peito das aves que receberam

dieta com MO-A também corroboram a premissa de que as rotas de utilização das fontes orgânicas na forma de quelatos são distintas das utilizadas pelas formas inorgânicas.

De forma geral, considerando que os tratamentos com a fonte orgânica resultaram em adequadas concentrações de microminerais no peito aos 21 dias (Zn e Cu) e 42 dias (Fe e Cu), assim como no fígado aos 21 dias (Fe e Mn) e 42 dias (Fe, Mn e Cu), pode-se inferir que a forma orgânica de microminerais em níveis baixos foi igualmente eficiente na deposição de microminerais nos tecidos, quando comparada à fonte inorgânica, e em níveis superiores ou quando utilizada em conjunto com a fonte inorgânica promoveu maiores deposições de microminerais, sendo este efeito relacionado ao nível de mineral suplementado, fonte e tecido avaliado. Diversas pesquisas corroboram com nossos achados de que a suplementação de microminerais na fonte orgânica proporciona efeitos benéficos sobre a deposição de microminerais em tecidos alvos [12, 14, 38, 39, 11].

5. Conclusões

A suplementação de microminerais na dieta de frangos de corte promove melhora nas respostas de desempenho, parâmetros antioxidantes e concentração mineral nos tecidos, demonstrando a importância da suplementação mineral para manter o desempenho durante toda a fase de produção, visto a essencialidade dos microminerais em diversas funções do organismo animal.

Na presente pesquisa a suplementação de microminerais em diferentes fontes e níveis não apresentou diferença entre os tratamentos para as respostas dos parâmetros de desempenho, sendo possível utilizar o menor nível de suplementação, o que permite reduzir a quantidade de microminerais na dieta das aves. Enquanto que o status antioxidante no sangue, concentração de microminerais nos tecidos e oxidação tecidual dos frangos de corte são influenciados pelas fontes e níveis de suplementação dos microminerais, indicando que a relação dos microminerais com os mecanismos antioxidante endógenos dos tecidos e deposição tecidual de microminerais devem ser melhor estudados.

6.Declarações

Aprovação ética

Todos os procedimentos seguiram às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Brasil, 2008) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Produção Animal da (CEUAP – UFV), da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) protocolo nº057/2022

Financiamento

A pesquisa recebeu apoio da empresa Alltech

Conflito de interesses

Os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes a divulgar.

Declaração de contribuição de autoria

Lucimauro da Fonseca: Metodologia, Investigação, Curadoria de Dados, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição

Melissa Izabel Hannas: Conceituação, Administração de Projetos, Metodologia, Curadoria de Dados, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição, Visualização, Supervisão.

Disponibilidade de dados

Os conjuntos de dados gerados e/ou analisados durante o estudo serão disponíveis à pedido

Consentimento para participar

Não aplicável.

Consentimento para publicação

Não aplicável.

7.Referências

1. Bao YM, Choct M, Iji PA, Bruerton, K (2007) Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. *Journal of Applied Poultry Research* 16:448-455. <https://doi.org/10.1093/japr/16.3.448>
2. Vieira R, Ferket P, Malheiros R, Hannas M, Crivellari R, Moraes V, Elliott S (2020) Feeding low dietary levels of organic trace minerals improves broiler performance and reduces excretion of minerals in litter. *British poultry Science* 61:574-582. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1764908>
3. Kong J, Qiu T, Yan X, Wang L, Chen Z, Xiao G et al (2022) Effect of replacing inorganic minerals with small peptide chelated minerals on production performance, some biochemical parameters and antioxidant status in broiler chickens. *Frontiers in Physiology* 13: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1027834>
4. National Research Council (NRC) (1994) Nutrient requirements of poultry. 9th Edition, National Academy Press, Washington DC.
5. Rostagno, HS, Albino, LFT, Hannas, MI, Donzele, JL, Sakomura, NK, Perazzo, FG, Saraiva, A., De Abreu, MLT, Rodrigues, PB, Oliveira, RF, De Toledo Barreto, SL e Brito, CO, 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos, composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ª edição . Imprensa Universitária, Viçosa, Brasil.
6. Núñez R, Elliott S, Riboty R (2022) The effect of dietary supplementation of organic trace minerals on performance, mineral retention, lymphoid organs and antibody titres of broilers. *Journal of Applied Animal Nutrition* 10:1-10. <https://doi.org/10.3920/JAAN2022.0002>
7. Ghasemi HA, Hajkhodadadi I, Hafizi M, Taherpour K, Nazaran MH (2020) Effect of advanced chelate technology based trace minerals on growth performance, mineral digestibility, tibia characteristics, and antioxidant status in broiler chickens. *Nutrition & Metabolism* 17:1-12. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00520-5>
8. Medeiros-Ventura WRL, Rabello CBV, Barros MR, Junior RS, Oliveira HB, Faria AG, et al (2020) Zinc, manganese, and copper amino acid complexes improve performance and bone characteristics of layer-type chicks under thermoneutral and cold stress conditions. *Poultry Science* 99:5718-5727. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.022>
9. Zafar MH, Fatima M, (2018) Efficiency comparison of organic and inorganic minerals in poultry nutrition: a review. *PSM Veterinary Research* 3:53-59.
10. Ferreira Júnior HC (2019) Exigências nutricionais de cobre e de ferro para frangos de corte alimentados com duas fontes dos microminerais. Tese, Universidade Federal de Viçosa.
11. Ferreira Júnior HC, da Silva DL, de Carvalho BR, Oliveira HC, Cunha Lima Muniz J, Junior Alves W, et al (2022) Broiler responses to copper levels and sources: growth,

- tissue mineral content, antioxidant status and mRNA expression of genes involved in lipid and protein metabolism. *BMC Veterinary Research* 18:1-27. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03286-5>
12. Carvalho BR, Ferreira Júnior HC, Viana GS, Alves WJ, Muniz JCL, Rostagno HS, et al (2021) In-feed organic and inorganic manganese supplementation on broiler performance and physiological responses. *Animal Bioscience* 34:1811–1821. <https://doi.org/10.5713/ab.20.0797>
 13. Carvalho BR. Nutritional requirements and bioavailability of different sources of zinc and manganese for broilers. Tese. Universidade Federal de Viçosa.
 14. Arnaut PR, da Silva Viana G, da Fonseca L, Alves WJ, Muniz JCL, Pettigrew JE, et al (2021) Selenium source and level on performance, selenium retention and biochemical responses of young broiler chicks. *BMC Veterinary Research* 17:1-13. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02855-4>
 15. Detmann E, Silva LFC, Rocha GC, Palma MNN, Rodrigues JPP (2022) Métodos para Análise de Alimentos. Viçosa, 3 ed.
 16. Buege JA, Aust SA (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1978:302-310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
 17. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186:464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H).
 18. Gayathri SL, Panda N (2018) Chelated minerals and its effect on animal production: A review. *Agric. Rev* 39:314-320. <https://doi.org/10.18805/ag.R-1823>
 19. Zhu Z, Yan L, Hu S, An S, Lv Z, Wang Z, et al (2019) Effects of the different levels of dietary trace elements from organic or inorganic sources on growth performance, carcass traits, meat quality, and faecal mineral excretion of broilers. *Archives of animal nutrition* 73:324-337. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1620050>
 20. Yang XJ, Sun XX, Li CY, Wu XH, Yao JH (2011) Effects of copper, iron, zinc, and manganese supplementation in a corn and soybean meal diet on the growth performance, meat quality, and immune responses of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 20:263-271. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00204>
 21. Omotoso AO, Reyer H, Oster M, Maak S, Ponsuksili S, Wimmers K (2023) Broiler physiological response to low phosphorus diets at different stages of production. *Poultry Science* 102:102-351. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102351>
 22. Marreiro D, Cruz K, Morais J, Beserra JB, Severo JS, Oliveira ARS (2017) Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants* 6:24-33. <https://doi.org/10.3390/antiox6020024>.

23. Rayman MP, Infante HG, Sargent M (2008) Selênio na cadeia alimentar e saúde humana: foco na especiação. *Br J Nutri* 100:238–530. <https://doi.org/10.1017/S0007114508922522>.
24. Burk R F et al (2015). Regulation of selenium metabolism and transport. *Annual review of nutrition*, 35:109-134. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034250>
25. Dalto DB, Matte JJ. Piridoxina (vitamina B6) e o sistema glutatona peroxidase, um elo entre o metabolismo de um carbono e a antioxição (2017). *Nutrientes*. 3:189-202. <https://doi.org/10.3390/nu9030189>
26. Papuc C, Goran GV, Predescu CN, Nicorescu V (2017) Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: A review. *Comprehensive Reviews in food science and food safety* 16: 96-123. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12241>
27. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X (2017) Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry* 44:532-553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
28. Yaqoob MU, Wang G, Sun W, Pei X, Liu L, Tao W, et al (2020) Effects of inorganic trace minerals replaced by complexed glycinate on reproductive performance, blood profiles, and antioxidant status in broiler breeders. *Poultry science* 99:2718-2726. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.058>
29. Silva GC, Nascimento MRBDM, Penha-Silva N, Fernandes EDA, Vilela DR, Souto MM (2015) Suplementação com zinco e selênio em frangos de corte submetidos a estresse cíclico de calor. *Revista Ceres* 62:372-378. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562040006>
30. Wołonciej M, Milewska E, Roszkowska-Jakimiec W (2016) Pierwiastki śladowe jako aktywatory enzymów antyoksydacyjnych. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* 70. <https://doi.org/10.5604/17322693.1229074>
31. Müllebner A, Dorighello GG, Kozlov AV, Duvigneau JC (2018) Interaction between mitochondrial reactive oxygen species, heme oxygenase, and nitric oxide synthase stimulates phagocytosis in macrophages. *Frontiers in medicine* 4:1-10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00252>
32. Hellwig M (2019) The chemistry of protein oxidation in food. *Angewandte Chemie International Edition* 58: 16742-16763. <https://doi.org/10.1002/anie.201814144>
33. Ribeiro DM, Mourato MP, Almeida AM (2019) Assessing mineral status in edible tissues of domestic and game animals: A review with a special emphasis in tropical regions. *Tropical animal health and production* 51:1019-1032. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01848-8>
34. Zaefarian F, Abdollahi MR, Cowieson A, Ravindran V (2019) Avian liver: the forgotten organ. *Animals* 9:63-86. [10.3390/ani9020063](https://doi.org/10.3390/ani9020063)

35. Brooks M A, Grimes J L, Lloyd KE, Valdez F, Spears JW (2012) Relative bioavailability in chicks of manganese from manganese propionate. *Journal of Applied Poultry Research* 21:126-130. <https://doi.org/10.3382/japr.2011-00331>
36. Wolff NA, Garrick MD, Zhao L et al (2018) A role for divalent metal transporter (DMT1) in mitochondrial uptake of iron and manganese. *Scientific Reports* 8:1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18584-4>
37. Jasek A, Coufal CD, Parr TM, Lee JT (2019) Evaluation of Increasing manganese hydroxychloride level on male broiler growth performance and tibia strength. *Journal of Applied Poultry Research* 28:1039-1047. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz065>
38. Faria BD, Silva LM, Ribeiro Junior V, Ferreira AHDN, Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI (2019) Organic trace minerals and calcium levels in broilers' diets to 21 days old. *Scientia Agricola* 77:1-9. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0071>
39. Wang G, Liu L, Wang Z, Pei X, Tao W, Xiao Z et al (2019) Comparison of inorganic and organically bound trace minerals on tissue mineral deposition and fecal excretion in broiler breeders. *Biological trace element Research* 189:224-232. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1460-5>

8. Tabelas

Tabela 1. Tratamentos experimentais.

Tratamentos 1 a 21 dias									
Fonte de microminerais	CP ¹	CP-MI/MO ²	MO-A ³	MI-A ⁴	MO-I ⁵	MI-I ⁶	MO-B ⁷	MI-B ⁸	CN ⁹
Dieta	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB
Mn (ppm)	100	100	73,98	73,98	53,4	53,4	32,83	32,83	-
Zn (ppm)	80	80	68,72	68,72	49,63	49,63	30,54	30,54	-
Cu (ppm)	12	12	10,54	10,54	7,56	7,56	4,58	4,58	-
Fe (ppm)	60	60	52,84	52,84	37,87	37,87	22,91	22,91	-
Se (ppm)	0,3	0,3	0,317	0,317	0,227	0,227	0,138	0,138	-
I (ppm)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	-
Tratamentos 21 a 42 dias									
Mn (ppm)	100	100	58,36	58,36	42,13	42,13	25,9	25,9	-
Zn (ppm)	80	80	54,21	54,21	39,15	39,15	24,09	24,09	-
Cu (ppm)	12	12	8,31	8,31	5,96	5,96	3,61	3,61	-
Fe (ppm)	60	60	41,68	41,68	29,88	29,88	18,07	18,07	-
Se (ppm)	0,3	0,3	0,25	0,25	0,179	0,179	0,109	0,109	-
I (ppm)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	-

^{DB}-Dieta basal; ¹Controle positivo (CP); ² controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação(MO-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação(MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

Tabela 2. Composição centesimal e química de dietas experimentais para frangos de corte.

Ingrediente	1 – 21 dias (%)	21-42 dias (%)
	DB	DB
Milho (7,86%)	46,00	54,00
Farelo de soja (45%)	45,00	37,00
Óleo de soja	4,53	5,28
Sal	0,530	0,490
Fosfato Bicálcico	1,270	0,810
Calcário	0,970	0,840
DL-Metionina (98%)	0,333	0,288
L-Lisina HCl (80%)	0,122	0,156
L-treonina (98%)	0,056	0,058
Cloreto de colina 60%	0,100	0,100
Suplemento Mineral	De acordo com os tratamentos	
Suplemento vitamínico ¹	0,144	0,100
Coccidiostático ²	0,055	0,055
Antioxidante ³	0,020	0,020
Promotor de crescimento	0,010	0,010
Enzima ⁴	0,020	0,020
Inerte ⁵	0,840	0,773
Total	100,000	100,000
Energia alcançada (kcal/kg)	3.066	3.222
Proteína bruta (%)	24,60	21,60
Lisina Dig. (%)	1,326	1,16
Metionina Dig. (%)	0,653	0,575
Met +cis Dig. (%)	0,974	0,862
Treonina Dig. (%)	0,868	0,769
Triptofano Dig. (%)	0,280	0,238
Valina Dig. (%)	1,029	0,900
Cálcio (%)	0,942	0,755
Fósforo Total (%)	0,699	0,591
Fósforo disponível (%)	0,448	0,353
Sódio (%)	0,224	0,208
Cloro (%)	0,213	0,202
Potássio (%)	0,941	0,814

¹ Fornecimento por kg de suplemento vitamínico: Vit. A-9750 U.I.; Vit. D3-2470 U.I.; Vit. E-36.6 U.I.; Vit. B1 - 2,60 mg; Vit. B2 = 6,50 mg; Vit. B6 - 3,64 mg; Vit. B12 - 0,015 mg; Ácido pantotênico - 13,0 g; Biotina - 0,091 mg; Vit. K3 = 1,95 mg; Ácido fólico o - 0,91 mg; Ácido nicotínico - 39,0 mg; ² Salinomicina sódica (12%); ³ Hidroxibutil tolueno - BHT; ⁴ ALLZYME SSF®-200g/tonelada; ⁵ Tixosil.

Tabela 3. Composição do suplemento mineral utilizado nos tratamentos experimentais (1 a 21 dias).

Fonte	Concentração mineral (%)	CP ¹	CP – MI/MO ²	MI-B ⁸	MI – A ⁴	MI – I ⁶	Quantidade (g)		
							MO – B ⁷	MO – A ³	MO – I ⁵
Sulfato de manganês	31,78% Mn	314,7	157,3	103,30	232,79	168,03			
Sulfato de zinco	35,23% Zn	227,1	113,5	86,69	195,06	140,87			
Sulfato de cobre	25,1% Cu	47,8	23,9	18,25	41,99	30,12			
Sulfato de ferro	31,17% Fe	192,5	96,2	73,50	169,52	121,50			
Selenito de sódio	45,42% Se	0,661	0,3	0,304	0,698	0,500			
Iodato de cálcio	61,8% I	1,78	0,9	1,78	1,78	1,80			
Inerte ¹	-	1215,52	507,8	1716,18	1358,16	1537,19			
Total (g)		2000	900	2000	2000	2000			
Bioplex Mn	16,13% Mn	-	309,98	203,53	458,65	331,06			
Bioplex Zn	16,96% Zn	-	235,85	180,07	405,19	292,63			
Bioplex Cu	10,26% Cu	-	58,48	44,64	102,73	73,68			
Bioplex Fe	16,03% Fe	-	187,15	142,92	329,63	236,24			
Sel-Plex Se	0,230 % Se	-	65,19	59,97	152,11	98,65			
Iodato de cálcio	61,80 % I	-	0,89	1,78	1,78	1,80			
Inerte	-	-	242,46	1367,08	549,91	965,93			
Total (g)			1100	2000	2000	2000			

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação(MO-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação(MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN); Tixosil foi adicionado como inerte.

Tabela 4. Composição do suplemento mineral utilizado nos tratamentos experimentais (21 a 42 dias).

Fonte	Concentração mineral (%)	CP ¹	CP – MI/MO ²	MI-B ⁸	MI – A ⁴	MI – I ⁶	Quantidade (g)		
							MO – B ⁷	MO – A ³	MO – I ⁵
Sulfato de manganês	31,78% Mn	314,7	157,3	81,5	183,6	132,6			
Sulfato de zinco	35,23% Zn	227,1	113,5	68,4	153,9	111,1			
Sulfato de cobre	25,1% Cu	47,8	23,9	14,4	33,1	23,7			
Sulfato de ferro	31,17% Fe	192,5	96,2	58,0	133,7	95,9			
Selenito de sódio	45,42% Se	0,661	0,3	0,2	0,6	0,4			
Iodato de cálcio	61,8% I	1,78	0,9	1,8	1,8	1,8			
Inerte ¹	-	1215,52	507,8	1775,7	1493,3	1634,5			
Total (g)		2000	900	2000	2000	2000			
							MO – B ⁷	MO – A ³	MO – I ⁵
Bioplex Mn	16,13% Mn	-	310,0	160,6	361,8	261,2			
Bioplex Zn	16,96% Zn	-	235,8	142,0	319,6	230,8			
Bioplex Cu	10,26% Cu	-	58,5	35,2	81,0	58,1			
Bioplex Fe	16,03% Fe	-	187,1	112,7	260,0	186,4			
Sel-Plex Se	0,230 % Se	-	65,2	47,4	152,1	77,8			
Iodato de cálcio	61,80 % I	-	0,9	1,8	1,8	1,8			
Inerte	-	-	242,5	1500,3	823,7	1183,9			
Total (g)			1100	2000	2000	2000			

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação(MO-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação(MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN); Tixosil foi adicionado como inerte.

Tabela 5. Concentração de micromineral analisada das dietas experimentais.

Dieta	CP ¹		CP- MI/MO ²		MO-A ³		MI-A ⁴		MO-I ⁵		MI-I ⁶		MO-B ⁷		MI-B ⁸		CN ⁹		
Micromineral	Calc. ¹⁰	Anali. ¹¹	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	Calc.	Anali.	
Fase 1 (1 – 21 dias)																			
Mn (ppm)	113,0	89,0	113,0	127,0	87,0	82,0	87,0	71,0	66,0	71,0	66,0	76,0	46,0	43,0	46,0	41,0	-	13,1	
Zn (ppm)	105,0	92,0	105,0	87,0	93,7	84,0	93,7	89,0	74,6	74,0	74,6	83,0	55,5	55,0	55,5	52,0	-	25,1	
Cu (ppm)	12,4	13,0	12,4	12,0	10,9	19,0	10,9	15,0	7,9	11,0	7,9	7,0	5,0	5,0	5,0	4,0	-	0,4	
Fe (ppm)	120,0	113,0	120,0	142,0	112,8	129,0	112,8	120,0	97,8	114,0	97,8	106,0	82,9	86,0	82,9	79,0	-	59,6	
Fase 2 (21 – 42 dias)																			
Mn (ppm)	111,0	84,0	111,0	98,0	69,3	66,0	69,3	86,0	53,1	53,0	53,1	43,0	36,9	37,0	36,9	41,0	-	11,4	
Zn (ppm)	107,0	100,0	107,0	92,0	81,2	75,0	81,2	81,0	66,1	67,0	66,1	67,0	51,0	51,0	51,0	49,0	-	27,3	
Cu (ppm)	13,8	10,0	13,8	11,0	10,1	9,0	10,1	8,0	7,7	6,0	7,7	3,0	5,4	5,0	5,4	1,3	-	1,8	
Fe (ppm)	99,0	107,0	99,0	108,0	80,6	84,0	80,6	80,0	68,8	104,0	68,8	78,0	57,0	76,0	57,0	66,0	-	39,4	

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN). ¹⁰ Calculados (níveis suplementados em cada tratamento + níveis de microminerais da dieta basal) ¹¹ analisados.

Tabela 6. Nutrientes analisados das dietas experimentais.

Nutriente (%)	Tratamentos								
	CP ¹	CP-MI/MO ²	MO-A ³	MI-A ⁴	MO-I ⁵	MI-I ⁶	MO-B ⁷	MI-B ⁸	CN ⁹
	Fase 1 (1 – 21 dias)								
Matéria seca	89,98	89,94	89,88	89,98	89,98	90,22	90,08	89,93	89,98
Cinzas	7,43	7,16	7,63	7,61	7,04	7,35	7,18	7,35	7,54
Proteína bruta	24,98	25,01	26,21	24,78	25,29	24,60	24,95	24,48	24,41
Extrato Étereo	6,44	6,19	6,25	6,25	6,11	6,67	6,91	7,07	6,80
	Fase 2 (21 - 42 dias)								
Matéria seca	90,24	90,13	89,95	90,25	90,25	90,33	90,08	89,93	90,19
Cinzas	6,03	6,14	6,11	6,03	6,27	6,27	7,18	7,35	6,07
Proteína bruta	21,92	22,65	21,10	21,31	21,09	20,72	24,95	24,48	20,51
Extrato Étereo	7,84	7,75	7,17	7,43	8,24	7,41	6,91	7,07	7,82

DB-dieta basal; ¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

Tabela 7. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de microminerais de 1 a 21 dias de idade.

Tratamentos	PC (g)	GP (g/ ave)	CR (g/ ave)	CA
CP ¹	1201,97a	1155,90 ^a	1343,07a	1,162b
CP - MI/MO ²	1195,40a*	1149,32a*	1334,22a*	1,160b*
MO-A ³	1198,79a*	1152,73a*	1352,65a*	1,174b*
MI-A ⁴	1210,39a*	1164,30a*	1359,75a*	1,172b*
MO-I ⁵	1204,48a*	1158,41a*	1365,61a*	1,180b*
MI-I ⁶	1209,59a*	1163,55a*	1365,21a*	1,172b*
MO-B ⁷	1198,47a*	1152,42a*	1346,50a*	1,168b*
MI- B ⁸	1221,29a*	1175,21a*	1361,59a*	1,165b*
CN ⁹	1101,22b	1055,15b	1288,39b	1,222 ^a
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
EPM	4,124	4,123	4,319	0,0030

ab Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste SNK (<0,05).

*Diferente do Controle Negativo pelo teste de Dunnett (<0,05).

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

PC: Peso corporal; GP: ganho de peso; CR: Consumo de ração; CA: conversão alimentar.

Tabela 8. Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de microminerais de 1 a 42 dias de idade.

Tratamentos	PC (g)	GP (g/ ave)	CR (g/ ave)	CA
CP ¹	3509,25a	3463,17a	5005,08a	1,445
CP - MI/MO ²	3489,40a*	3443,31a*	4956,03a*	1,440
MO-A ³	3468,77a*	3422,71a*	5019,82a*	1,450
MI-A ⁴	3518,78a*	3472,70a*	5029,52a*	1,449
MO-I ⁵	3541,78a*	3495,71a*	5063,49a*	1,450
MI-I ⁶	3458,65a*	3412,63a*	5030,15a*	1,463
MO-B ⁷	3465,58a*	3419,52a*	4978,76a*	1,455
MI- B ⁸	3572,50a*	3526,42a*	5102,72a*	1,447
CN ⁹	3264,88b	3218,81b	4672,79b	1,453
ANOVA	0,0006	0,0006	0,0130	0,937
EPM	13,730	13,730	17,647	0,0034

ab Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste SNK (<0,05).

*Diferente do Controle Negativo pelo teste de Dunnett (<0,05).

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação(MO-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

PC: Peso corporal; GP: ganho de peso; CR: Consumo de ração; CA: conversão alimentar.

Tabela 9. Efeito da suplementação de diferentes fontes e níveis de microminerais na dieta de frangos de corte sobre a atividade enzimática sanguínea aos 21 e 42 dias de idade.

Tratamentos	Glutationa Peroxidase (UI/L)		Superóxido Dismutase (UI/mL)		Status antioxidante total (mmol/L)	
	21 dias	42 dias	21 dias	42 dias	21 dias	42 dias
CP ¹	622,000a	369,510a	114,775	98,611	2,338	2,581ab
CP - MI/MO ²	511,428a*	400,923a	110,859	106,782	2,312	2,864a*
MO-A ³	535,375a*	417,884a*	102,848	94,69	2,361	2,826a*
MI-A ⁴	439,857ab***	402,206a*	111,034	88,88	2,356	2,828a*
MO-I ⁵	346,714ab***	249,513a***	105,314	99,303	2,37	2,619ab
MI-I ⁶	584,000a*	323,130a*	108,698	116,614	2,333	2,489ab
MO-B ⁷	194,000bc***	66,569b**	100,631	98,772	2,322	2,804a*
MI- B ⁸	340,833ab***	264,633a***	108,794	86,812	2,355	2,730a*
CN ⁹	28,125c	0,043c	110,049	88,894	2,31	2,253b
ANOVA	0,004	0,003	0,713	0,944	0,673	0,001
EPM	25,735	16,27	2,196	3,499	0,005	0,037

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste SNK (<0,05).

*Difere do Controle Negativo pelo teste de Dunnett (<0,05).

**Difere do Controle Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

***Difere do Controle Negativo e Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação(MO-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

Tabela 10. Efeito da suplementação de diferentes fontes e níveis de microminerais na dieta de frangos de corte sobre a oxidação em tecidos do peito aos 42 dias de idade.

Tratamentos	Proteína carbonilada (nmol/mg)	MDA (nmol/mg)
CP ¹	0,693a	10,262a
CP - MI/MO ²	0,582a*	5,047b***
MO-A ³	0,625a	1,887b**
MI-A ⁴	0,679a	2,016b**
MO-I ⁵	0,634a	2,791b**
MI-I ⁶	0,714a	3,064b**
MO-B ⁷	0,610a	4,708b***
MI- B ⁸	0,672a	2,848b**
CN ⁹	0,765a	2,978b
ANOVA	0,0419	<0,0001
EPM	0,014	0,374

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste SNK (<0,05).

*Difere do Controle Negativo pelo teste de Dunnett (<0,05).

**Difere do Controle Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

***Difere do Controle Negativo e Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO), ³Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B), ⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

Tabela 11. Concentração mineral no peito de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de microminerais aos 21 e 42 dias de idade.

Minerais (mg/kg)	CP ¹	CP-MI/MO ²	MO-A ³	MI-A ⁴	MO-I ⁵	MI-I ⁶	MO-B ⁷	MI-B ⁸	CN ⁹	P-valor	EPM
Peito 21 dias											
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	28,79ab	31,00ab	34,39ab	37,14ab**	35,39ab**	29,36ab	28,39b*	36,27ab**	37,15a	<0,0001	0,69
Cu	1,73b	4,97a***	1,01b	1,59b	1,56ab	2,34ab	1,30b	1,24ab	1,19b	0,034	0,21
Fe	36,57	40,93	35,59	36,09	37,29	37,29	37,44	33,21	37,85	0,872	1,10
P	10047,81ab	10087,90ab	10280,63a	10099,27ab	10471,09a	10392,90a	10092,09ab	9693,18b*	10349,27a	<0,0001	43,92
Cinzas,%	5,77	5,81	5,55	5,56	6,71*	6,92***	6,53	7,04***	5,51	0,588	0,10
Peito 42 dias											
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	31,26	32,73	52,64***	40,04**	34,34	36,66	49,95**	45,65**	40,06	0,244	1,17
Cu	1,30c	1,14c*	7,30 a***	4,79b**	4,63b**	4,83b**	6,05ab **	6,02b**	5,53ab	<0,0001	0,22
Fe	73,46b	77,50b*	114,25 a***	31,09c**	30,56c**	27,71c**	84,18b*	83,79b*	32,51 c	<0,0001	3,69
P	9046,36	9035,90	8642,45*	9041,09	8877,63	9214,45	8893,63	8770,00	9180,50	0,270	47,85
Cinzas,%	6,34a	6,67a	5,83ab	4,98c***	4,97c***	4,96c***	5,48bc***	6,07ab	6,49a	<0,0001	0,10

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste SNK (<0,05).

*Difere do Controle Negativo pelo teste de Dunnett (<0,05).

**Difere do Controle Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

***Difere do Controle Negativo e Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO),

³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I), ⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B),

⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).

Tabela 12. Concentração mineral no fígado de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de microminerais aos 21 e 42 dias de idade.

Minerais (mg/kg)	CP ¹	CP- MI/MO ²	MO-A ³	MI-A ⁴	MO-I ⁵	MI-I ⁶	MO-B ⁷	MI-B ⁸	CN ⁹	P-valor	EPM
	Fígado 21 dias										
Mn	16,13ab	17,84a*	16,36ab***	17,35ab*	14,00bc	13,96bc	16,37ab*	15,03ab*	11,51c	< 0,001	0,331
Zn	109,37	118,41	107,89	101,97	109,83	106,22	110,16	100,72	102,66	0,278	1,102
Cu	18,93b	24,08 a***	20,29b	21,16ab	19,27b	20,40b	20,09b	18,42b	17,74b	0,0536	0,354
Fe	623,87a	591,53 a*	612,70a*	663,23a*	372,39b**	392,52b**	568,95a*	480,22ab	350,07b	< 0,001	18,594
P	12814,78	12558,70	12671,45	12405,82	12629,80	12461,73	12616,44	12466,50	12469,11	0,301	67,925
Cinzas, %	5,47d**	8,16ab**	8,55ab**	9,37ab***	8,64ab**	9,60a***	7,85abc**	6,20cd	7,36bc**	<0,0001	0,18
Fígado 42 dias											
Mn	12,80a	13,68a*	5,62b***	5,88b***	4,93b***	5,20b***	5,23b***	4,31b***	1,28c	< 0,001	0,420
Zn	105,63	135,44***	94,47	94,07	101,31	128,15*	85,66**	88,50**	92,75	0,592	2,596
Cu	20,15ab	22,66a*	11,96cd***	10,85cd**	11,54cd**	16,86bc***	9,46d**	9,88d**	9,80d	< 0,001	0,516
Fe	725,28a	603,50ab*	563,54ab*	451,52bc**	435,58bc**	486,15bc**	506,43bc**	624,08ab*	372,86c	< 0,001	17,141
P	10818,00	11334,60	11218,64	10545,40	10788,82	10922,64	10767,55	10713,36	10417,09	0,151	85,332
Cinzas, %	10,74a	7,74b**	8,25b**	8,02b**	10,35ab*	7,91b**	10,15ab	8,81ab**	7,92b	0,0183	0,20

^{ab} médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste SNK (<0,05).

*Difere do Controle Negativo pelo teste de Dunnett (<0,05)

**Difere do Controle Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

***Difere do Controle Negativo e Positivo pelo teste de Dunnett (<0,05).

¹Controle positivo (CP); ²Controle positivo em substituição parcial 50% mineral em fonte inorgânica e 50% mineral em fonte orgânica (CP-MI/MO),

³ Mineral em fonte orgânica em alto nível de suplementação (MO-A), ⁴Mineral em fonte inorgânica em alto nível de suplementação (MI-A), ⁵Mineral em fonte orgânica em nível intermediário de suplementação (MO-I), ⁶Mineral em fonte inorgânica em nível intermediário de suplementação (MI-I),

⁷Mineral em fonte orgânica em baixo nível de suplementação (MO-B) ⁸ Mineral em fonte inorgânica em baixo nível de suplementação (MI-B),

⁹ Sem suplementação micromineral como controle negativo (CN).