

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo nano cobre e outras fontes de cobre como promotor de crescimento

Joyce Pereira Lopes

Pelotas, 2021.

Joyce Pereira Lopes

Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo nano cobre e outras fontes de cobre como promotor de crescimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração: Nutrição de Não Ruminantes.

Orientador: Prof. Ph.D. Eduardo Gonçalves Xavier

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll

Co-orientadora: Prof. Dra. Débora Cristina Nichelle Lopes

Pelotas, 2021.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L864d Lopes, Joyce Pereira

Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo nano cobre e outras fontes de cobre como promotor de crescimento / Joyce Pereira Lopes ; Eduardo Gonçalves Xavier, orientador ; Victor Fernando Büttow Roll, Débora Cristina Nichelle Lopes, coorientadores. — Pelotas, 2021.

68 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Avicultura. 2. Desempenho. 3. Gelatina. 4. Hematologia. 5. Nano minerais. I. Xavier, Eduardo Gonçalves, orient. II. Roll, Victor Fernando Büttow, coorient. III. Lopes, Débora Cristina Nichelle, coorient. IV. Título.

CDD : 636.50852

Joyce Pereira Lopes

Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo nano cobre e outras fontes de cobre como promotor de crescimento

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 13 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Ph.D. Eduardo Gonçalves Xavier.
Ph.D. em *Animal Sciences* pela *University of Kentucky*.

Prof. Ph.D. Fernando Rutz.
Ph.D. em *Animal Sciences* pela *University of Kentucky*.

Profa. Dra. Fabiane Pereira Gentilini.
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dra. Aline Arassiana Piccini Roll.
Doutora em Nutrição Animal pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e por me colocar no caminho certo.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao professor Ph.D. Eduardo Gonçalves Xavier, pela orientação, apoio e paciência.

Aos meus coorientadores Prof.^a Dr^a. Débora Cristina Nichelle Lopes e Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll.

Aos professores Ph.D. Fernando Rutz, Dr^a Fabiane Pereira Gentilini, Dr^a Ana Paula Nunes, Dr^a Isabel Soares Chaves e Dr. Anderson Schwingel Ribeiro.

Aos técnicos e servidores da UFPel Dr. André Silveira da Silva, Dr. Luis Augusto Xavier Cruz, M.Sc. Ana Elice Furtado da Silva, Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, Norma Dias Brauner e José Ulisses Azambuja da Silva.

À Polinutri Alimentos S.A., representada pelo Dr. Everton Elibert Rodrigues.

Aos meus pais José e Terezinha, por sempre me apoiarem nesta e em tantas outras caminhadas, sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês.

Aos meus irmãos Jose, Patrick e Isadora, pela ajuda, incentivo e parceria de sempre. E aos meus sobrinhos, Gabriel e Miguel. Amo vocês.

À M.Sc. Daísa Bönemann e a Dr^a Edenilse Gopinger, obrigada por todo auxílio.

Aos colegas de Pós-Graduação Aline, Suelen, Carol O., Carol B., Diciane, Renata, Débora, Brenna, Michelle e Allan e ao aluno de graduação Igor. Obrigada por todo apoio, incentivo e conselhos e em especial a Suelen, por ter assumido uma bronca que muitas vezes não era dela. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigada por tudo!

Aos amigos Paula, Lari, Léo, Maurício, Karen, Gabi, Marco, Betina e Ju. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

A todos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e fazem parte dessa conquista. Muito obrigada!

Resumo

LOPES, Joyce Pereira. **Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo nano cobre e outras fontes de cobre como promotor de crescimento.** Orientador: Eduardo Gonçalves Xavier. 2021. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, 2021.

Com o presente estudo avaliou-se a utilização do mineral cobre (Cu), na forma de nanopartículas (< 50 nm), em dietas semipurificadas para codornas de postura e seu efeito sobre o desempenho produtivo, estado metabólico e biodisponibilidade, a fim de definir o melhor nível de inclusão desse mineral na dieta, para que tenha ação promotora de desempenho. Foram utilizadas 160 aves (*Coturnix coturnix japonica*) em postura, alojadas duas aves por gaiola e distribuídas aleatoriamente aos tratamentos em delineamento inteiramente casualizado. As dietas diferiram apenas em relação às fontes que foram utilizadas, sulfato de cobre (CuSO₄), óxido de cobre (CuO) e nano óxido de cobre (nano CuO) e aos níveis (200, 400 e 800 ppm) de inclusão de Cu, totalizando 10 tratamentos (sendo um controle negativo, sem inclusão de Cu), cada um com oito repetições. O período experimental foi de 21 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, avaliando-se o efeito das fontes e dos níveis, assim como a presença de interação entre as fontes e níveis. Quando houve interação foi avaliado separadamente o efeito das fontes pelo teste de Tukey e o efeito dos níveis pela análise de regressão ambos a 5% de probabilidade. As variáveis produção e peso dos ovos foram avaliadas diariamente e o ganho de peso e consumo de ração, semanalmente. Para essas variáveis não se verificou diferença significativa entre os tratamentos, mas detectou-se um baixo consumo das dietas em geral, afetando negativamente as demais variáveis de desempenho. Ao final do período experimental, aleatoriamente foi coletado sangue de quatro aves por tratamento para realização das análises hematológicas, que mostraram maiores valores de hemoglobina naquelas que receberam dietas com 200 ppm de nano Cu. Para o hematócrito, verificou-se um aumento linear crescente à medida que aumentaram os níveis de inclusão de CuSO₄. Posteriormente, essas aves foram eutanasiadas e foram coletados órgãos (coração, fígado, moela e intestino) para verificação do peso e tecidos (fígado e tibia) para avaliar a presença de Cu. Em relação ao peso dos órgãos, somente o fígado apresentou resposta quadrática para as fontes de CuSO₄ e CuO, reduzindo até o nível de 400 ppm e aumentando posteriormente. O peso do fígado das aves que consumiram nano CuO apresentou redução linear com o aumento dos níveis do mineral na dieta. Os resultados obtidos demonstram que a utilização de 200 ppm de nano CuO na dieta de codornas de postura proporciona maior peso de carcaça. A inclusão de 200 e 400 ppm de nano CuO aumenta a hemoglobina e o nível de 400 ppm, o hematócrito. O CuO na forma nano (< 50 nm) é mais biodisponível do que na forma convencional.

Palavras-chave: Açúcar, Avicultura, Desempenho, Gelatina, Hematologia, Nano minerais.

Abstract

LOPES, Joyce Pereira. **Performance of quails fed semi-purified diets containing nano copper and other sources of copper as growth promoter.** Advisor: Eduardo Gonçalves Xavier. 2021. 68 f. Thesis (Master in Animal Sciences) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil, 2021.

The study evaluated the feeding of nano copper (< 50 nm) in semi-purified diets for quails and its effect on performance, metabolism and bioavailability aiming to establish the best level of the mineral as a growth promoter. A total of 160 laying quails (*Coturnix coturnix japonica*) were used. Two birds were placed in each cage and randomly allotted to the treatments in a completely randomized design. The diets differed only in relation to the copper (Cu) source: copper sulfate (CuSO₄), copper oxide (CuO) and nano copper oxide (nano CuO) and levels (200, 400 and 800 ppm). Therefore, a total of 10 treatments (including a negative control, without Cu) and eight replications were used. There were 21 days of experimental period. Data were analyzed with ANOVA at 5% and the effect of sources and levels of Cu as well as their interactions were evaluated. When interaction was observed, the sources were analyzed with the Tukey test and the effect of levels with polynomial regression, both at 5% probability. Egg production and egg weight were evaluated at a daily basis. Weight gain and feed consumption were evaluated every week. No significant difference was observed for any of the variables. However, there was a low consumption of the diets in general, negatively affecting the other performance variables. At the end of trial, four birds per treatment were randomly selected for blood collection. Birds fed 200 ppm nano CuO showed higher hemoglobin. A linear increase of hematocrit was observed as the levels of CuSO₄ were increased in the diets. The same birds were euthanized and organs (heart, liver, gizzard and intestine) weighed. Cu concentration was analyzed in the liver and tibias. Only liver weight showed a quadratic response for CuSO₄ and CuO, reducing until 400 ppm and increasing with higher levels. Liver weight of birds fed nano CuO showed a significant linear reduction as the levels of the mineral in the diets increased. The results showed that 200 ppm of nano CuO in the diets of laying quails promotes higher carcass weight. The inclusion of 200 and 400 ppm of nano CuO increase hemoglobin, and 400 ppm increase hematocrit. Nano CuO is more bioavailable than conventional CuO.

Keywords: Gelatin, Hematology, Nano minerals, Performance, Poultry, Sugar.

Lista de Figuras

Figura 1: Sala experimental com gaiolas metálicas.....	22
Figura 2: Aparência das dietas semipurificadas (tratamentos 1 a 10).	25
Figura 3: Codorna com anilha plástica numerada para identificação.....	27
Figura 4: A - retirada da sobra de ração dos comedouros. B - pesagem da sobra da ração.....	28
Figura 5: Pesagem das aves.....	29
Figura 6: Coleta de sangue na veia ulnar de codornas.	31
Figura 7: Centrífuga para micro-hematócrito.	32
Figura 8: Tubo capilar de micro hematócrito após centrifugação. A - plasma; B - eritrócitos; C - massa para vedação da extremidade do tubo.....	33
Figura 9: Leitura de hematócrito na escala específica.....	33
Figura 10: Espectrofotômetro de absorção atômica com chama.	35
Figura 11: Concentração de cobre (mg/kg) no fígado de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis do mineral.	60
Figura 12: Concentração de cobre (mg/kg) nas tíbias de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis do mineral.	60
Figura 13: Biodisponibilidade relativa (%) de cobre no fígado de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis do mineral.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das dietas semipurificadas, à base de açúcar e gelatina, para codornas japonesas em postura.....	23
Tabela 2: Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).	38
Tabela 3: Produção e peso dos ovos de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre.....	40
Tabela 4: Ganho de peso e consumo total de ração de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).....	42
Tabela 5: Mortalidade de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão)	43
Tabela 6: Peso inicial e final de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).	45
Tabela 7: Peso de carcaça (g) e de órgãos (g) de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).....	47
Tabela 8: Peso da carcaça e carcaça eviscerada de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).....	49
Tabela 9: Peso do fígado e coração de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).	51
Tabela 10: Peso da moela e intestino de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).	53
Tabela 11: Hematócrito e hemoglobina em codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).	54

Tabela 12: Hemoglobina em codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média ± desvio padrão).	55
Tabela 13: Hematócrito em codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média ± desvio padrão).	56
Tabela 14: Concentração de cobre no fígado e nas tíbias de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre.	57
Tabela 15: Desdobramento da interação da concentração de cobre no fígado e nas tíbias (mg/kg) de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre.	58
Tabela 16: Equação de regressão, coeficiente de determinação (r^2) e biodisponibilidade de cobre considerando a concentração do mineral no fígado.	61

Sumário

1 Introdução	12
2 Revisão bibliográfica	14
2.1 Avicultura	14
2.2 Coturnicultura.....	14
2.3 Minerais.....	15
2.4 Metabolismo do cobre	16
2.5 Efeitos do uso do cobre na alimentação de aves - deficiência e excesso.....	17
2.6 Cobre como promotor de crescimento	18
2.7 Nanotecnologia na alimentação e nutrição.....	19
2.8 Nano cobre (Nano CuO)	19
3 Materiais e métodos	21
3.1 Aprovação ética	21
3.2 Local, duração do experimento e condições experimentais.....	21
3.3 Animais.....	22
3.4 Tratamentos e dietas experimentais.....	22
3.4.1 Gelatina.....	25
3.4.2 Nano cobre (Nano CuO).....	26
3.5 Manejos.....	26
3.5.1 Pesagem dos animais.....	26
3.5.2 Pesagem de ração.....	27
3.6 Variáveis analisadas	28
3.6.1 Peso das aves	28
3.6.2 Produção de ovos	29
3.6.3 Peso dos ovos	29
3.6.4 Consumo de ração.....	30
3.6.5 Mortalidade.....	30
3.6.6 Peso dos órgãos e carcaça.....	30
3.6.7 Análises hematológicas	31
3.6.7.1 Hematócrito.....	32
3.6.7.2 Hemoglobina.....	33
3.6.8 Determinação do cobre.....	34
3.6.9 Biodisponibilidade de cobre	35

3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas	35
4 Resultados e discussão	37
4.1 Desempenho zootécnico.....	37
4.2 Peso da carcaça e órgãos.....	46
4.3 Análises sanguíneas.....	54
4.4 Pesquisa de cobre nos tecidos	57
4.5 Biodisponibilidade de cobre.....	60
5 CONCLUSÕES	63
6 REFERÊNCIAS	64

1 Introdução

A avicultura brasileira teve início com produtores familiares e era considerada uma atividade voltada à subsistência das famílias, sendo comercializado apenas o excedente da produção (ZEN et al., 2015). Com o passar dos anos, essa produção foi se intensificando e atingindo o patamar que se conhece atualmente, com ótimos índices produtivos e reconhecimento mundial, uma vez que o país é um dos maiores produtores de carne de frango e o maior exportador do produto (ABPA, 2021).

Dentre os vários setores da avicultura, tem-se a coturnicultura, que consiste na criação de codornas de corte ou postura. Devido ao sabor único e valor nutricional, tanto os ovos quanto a carne de codornas são produtos importantes na dieta em muitos países, além de serem considerados um “nicho” de mercado (KNAGA et al., 2018).

A codorna apresenta rápido crescimento, precocidade sexual, alta produtividade, além de ser uma ave pequena que demanda menor espaço quando comparada com galinhas poedeiras (PASTORE; OLIVEIRA; MUNIZ, 2012). Por todas essas características, a criação de codornas é uma atividade rentável e com boas perspectivas de crescimento para os próximos anos.

Na avicultura, dentre as limitações nutricionais para aves em postura, a deficiência de minerais recebe destaque, já que os alimentos que formam a base de sua alimentação, como é o caso do milho e farelo de soja, comumente, não contemplam as exigências desses animais (ARAUJO et al., 2008).

Um dos minerais que podem ser suplementados nas dietas das aves é o cobre (Cu), que apesar de estar presente no organismo animal em baixas concentrações é um elemento fundamental no metabolismo, exercendo papel importante no metabolismo do ferro e de várias enzimas (GATTÁS; BARBOSA, 2004).

As formas cloreto (CuCl), óxido (CuO) e sulfato de cobre (CuSO₄), apesar de serem as principais fontes minerais para suplementação animal, apresentam relatos de baixa disponibilidade, sendo necessária uma maior inclusão dietética (ZHAO et al., 2014). Inclusive o Cu quando usado em níveis superiores às exigências nutricionais tem sua atuação relacionada como aditivo melhorador de desempenho, pelas suas características antibacterianas e bacteriostáticas (OLIVEIRA, 2016).

Entretanto, com a proibição de várias moléculas usadas como promotores de crescimento e o banimento dos antimicrobianos com essa finalidade em vários países, a busca por alternativas a esses produtos se faz necessária.

Nesse sentido, as nanopartículas apresentam características únicas, como tamanho reduzido e alta área de superfície (KHURANA et al., 2019). Se valendo dessas características, estudos sugerem que as nanopartículas, como é o caso do nano CuO, apresentem maior biodisponibilidade, sendo melhor aproveitado pelo animal, quando comparado com as formas convencionais usadas na dieta (RAJE et al., 2018).

Nesse contexto, a busca por respostas acerca da biodisponibilidade e da atuação no desempenho animal, de diferentes fontes de Cu é necessária para que se tenha maior conhecimento sobre os efeitos no organismo animal. Com isso objetivou-se avaliar a utilização do mineral cobre (Cu), na forma de nanopartículas (< 50 nm), em dietas semipurificadas para codornas de postura e seu efeito sobre o desempenho produtivo, estado metabólico e biodisponibilidade, a fim de definir o melhor nível de inclusão desse mineral na dieta, para que tenha ação promotora de desempenho.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Avicultura

A avicultura brasileira ocupa lugar de destaque no cenário mundial, sendo o país o terceiro maior produtor de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Já em relação a exportação, o Brasil ocupa um lugar de maior destaque, sendo o maior exportador do produto, o que gerou uma receita de 6,097 milhões de dólares no ano de 2020 (ABPA, 2021).

A produção avícola ainda compreende uma série de segmentos, como a produção de carne de outras espécies, entre elas patos e perus, além dos nichos de mercado, como a produção de aves coloniais ou caipiras e orgânicas. Outro segmento da avicultura que tem apresentado grande expansão é a produção de ovos. Segundo dados do relatório anual de 2021 da Associação Brasileira de Proteína Animal, a produção brasileira, no ano de 2020, ultrapassou a marca dos 53 bilhões de unidades. A grande maioria dessa produção (mais de 99%) é destinada ao mercado interno, sendo apenas 0,31% exportado, gerando uma receita de cerca de 10 mil dólares (ABPA, 2021).

É notável todo o desenvolvimento ocorrido ao longo dos anos para que se chegasse a uma avicultura de excelência tanto a nível mundial quanto nacional. Esse desenvolvimento se dá principalmente em função do melhoramento genético dos plantéis, assim como maior controle sanitário e maiores informações nutricionais, para que cada vez mais se tenha a total expressão produtiva desses animais.

2.2 Coturnicultura

A coturnicultura é o setor da avicultura que compreende a criação de codornas, sejam elas com a finalidade de corte ou postura. De acordo com

Pastore; Oliveira; Muniz (2012), originárias do norte da África, Europa e Ásia, as codornas foram criadas inicialmente na China e Coréia, por pessoas que apreciavam seu canto. Os primeiros cruzamentos se deram posteriormente no Japão, utilizando codornas trazidas da Europa e espécies selvagens, chegando então a *Coturnix coturnix japonica*, conhecida popularmente como codorna japonesa, e foi a partir desse fato que se iniciou a exploração com o objetivo de produzir carne e ovos (REIS, 1980).

No Brasil, a criação de codornas tem por objetivo principal a produção de ovos, sendo destinado ao abate animais em final de produção ou aqueles erroneamente classificados no momento da sexagem (REIS, 2011).

A criação de codornas, antes vista apenas como de subsistência, com o passar dos anos foi expandindo, seja pelo aumento de informações provenientes da pesquisa científica, ou ainda, por se tratar de uma espécie que apresenta características muito favoráveis à criação (PASTORE; OLIVEIRA; MUNIZ, 2012). Dentre as características atrativas para a criação de codornas pode-se destacar o rápido crescimento, precocidade da produção e maturidade sexual (35 a 42 dias), alta produtividade (média de 300 ovos/ano), baixo investimento e consequente rápido retorno financeiro, além de menor susceptibilidade a doenças quando comparada ao frango doméstico (KNAGA et al., 2018).

No Brasil, o efetivo do rebanho de codornas ultrapassou 16 milhões de cabeças no ano de 2018, segundo dados da Pesquisa da Pecuária Municipal do IBGE (2019), sendo que os estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo são os maiores produtores nacionais. A mesma pesquisa revela que a produção de ovos alcançou a marca superior a 298 mil dúzias, também no ano de 2018.

2.3 Minerais

Os minerais são elementos essenciais na dieta dos animais, uma vez que assumem papel importante no metabolismo, visto que a deficiência ou o excesso desses compostos prejudicam o animal, impossibilitando que atinja o desenvolvimento máximo (ALVES 2002).

Esses elementos são classificados quanto as suas concentrações nos tecidos, podendo ser macro ou microminerais (BERTECHINI, 2006).

Segundo Silva (2011), na avicultura os macrominerais considerados mais críticos são o cálcio, fósforo, potássio, sódio, enxofre, cloro e magnésio, sendo necessária maior inclusão nas dietas. Já em relação aos microminerais, o mesmo autor destaca o ferro, cobre, iodo, manganês, cobalto, zinco e selênio podendo ser incluídos em menor quantidade nas rações, mas ainda assim considerados essenciais.

2.4 Metabolismo do cobre

O Cu é um elemento fundamental para o organismo animal e tem inúmeras funções para o adequado funcionamento do metabolismo (RICHARDS et al., 2010). A importância dos minerais-traço, como é o caso do Cu, se dá pela sua participação em vários processos bioquímicos necessários para o desenvolvimento, principalmente do sistema esquelético, sistema nervoso central e funcionamento do músculo cardíaco (OLIVEIRA, 2016; RICHARDS et al., 2010).

Esse mineral ainda faz parte da composição de inúmeras enzimas que necessitam deste elemento para realizarem suas atividades metabólicas, como é o caso da citocromo oxidase, fundamental no processo de respiração celular (OLIVEIRA, 2016). Outras enzimas que também são dependentes de Cu são a superóxido dismutase, que atua na desintoxicação de radicais livres, a lisil oxidase, que é responsável pela formação de tecido conjuntivo, e a ceruloplasmina, responsável pela mobilização de ferro, dentre outras (SUTTLE, 2010).

O Cu também tem papel importante no metabolismo do ferro, atuando na síntese de hemoglobina e na produção de eritrócitos (OGNIK et al., 2018). De acordo com Oliveira (2016), a atuação do Cu na síntese da hemoglobina se dá pela sua participação no transporte de ferro através da ceruloplasmina, que é constituída na sua grande maioria pelo Cu sérico total. A ceruloplasmina é indispensável para a oxidação do ferro, convertendo Fe^{2+} em Fe^{3+} e isso aumenta a velocidade de incorporação do mineral em transferrina, proteína específica transportadora de ferro (McDowel, 1992).

A absorção de Cu, por sua vez, se dá principalmente no duodeno das aves (BORTOLUZZI; VIEIRA; APPLGATE, 2020). Essa taxa de absorção pode ser influenciada por diversos fatores, como o estado fisiológico do animal, a forma química do elemento e o nível dietético (JENKINS & HIDIROGLOU, 1989; GONZÁLEZ & SILVA, 2006).

Já em relação ao armazenamento, o fígado é o principal órgão de depósito do Cu após sua absorção, onde aproximadamente 50% está presente no citosol, 20% no núcleo e o restante nas demais organelas (ORTOLANI, 2002). O Cu que é armazenado no fígado, quando em níveis adequados, é liberado para ser incorporado à ceruloplasmina, que posteriormente é secretada na corrente sanguínea. Essa proteína exerce papel fundamental no metabolismo do mineral, uma vez que a grande maioria do Cu sérico total está ligado a ela (GATTÁS; BARBOSA, 2004). Quando se fala na sua eliminação do organismo, a principal forma de excreção do Cu se dá pela via biliar, para posteriormente ser eliminado nas fezes, sendo que nas aves o cobre biliar é indisponível para reabsorção (DÍAZ et al., 2015).

2.5 Efeitos do uso do cobre na alimentação de aves - deficiência e excesso

Como o Cu é um elemento essencial ao funcionamento de diversas enzimas, a sua deficiência implica em alguns problemas como anemia, redução da concentração de hemoglobina e desordens ósseas (ROSA & MATTIOLI, 2002). Além desses problemas, ainda pode-se destacar a formação inadequada de cartilagem, e em perus pode-se salientar a desmielinização e ruptura da aorta, pela falha na síntese de colágeno (DÍAZ et al., 2015).

A anemia é uma condição comum quando se tem deficiência de Cu, principalmente quando é uma deficiência severa ou prolongada. Essa condição se estabelece pois o Cu atua diretamente no metabolismo do ferro, favorecendo sua absorção e mobilização do fígado, por isso quando há uma deficiência desse mineral consequentemente haverá a baixa utilização de ferro, que é um elemento indispensável na síntese de hemoglobina (GATTÁS; BARBOSA, 2004)

Por sua vez, as desordens ósseas são também causadas na deficiência de Cu, pela incapacidade da enzima lisil oxidase atuar na síntese de tecido

conjuntivo (SUTTLE, 2010). Essa enzima é responsável pela correta integração do colágeno e elastina nos tecidos, permitindo estabilidade às estruturas (KIM; NEVITT; THIELE, 2008; LÖNNERDAL, 2008).

Em relação aos efeitos tóxicos devido ao consumo de níveis elevados de Cu tem-se principalmente a redução na taxa de crescimento e consequente queda de desempenho produtivo, que é um indício de toxicidade a alguns minerais e isto se dá principalmente pelo nível utilizado e a interação com outros minerais (OLIVEIRA, 2016). Problemas de moela também podem ser observados, causando sérios danos à mucosa interna do órgão (FISHER et al., 1973; POUPOULIS & JENSEN, 1976). Poupoulis & Jensen (1976) sugerem que o dano à moela das aves pode ser causado pela deficiência de outros minerais, como o selênio, cuja deficiência poderá ser induzida por altos níveis de Cu.

2.6 Cobre como promotor de crescimento

Na avicultura, muitos estudos são direcionados a formas de aumentar o desempenho produtivo dos animais. O uso de promotores e crescimento é uma dessas formas, sendo usados principalmente os antibióticos, em doses subterapêuticas, adicionados à dieta (SANTOS, et al., 2005).

Como alternativa ao uso desses antimicrobianos muitos alimentos têm sido estudados, dentre eles o Cu, que possui ação promotora de crescimento para aves e suínos (GATTÁS; BARBOSA, 2004). Os mecanismos de ação do Cu como promotor de crescimento ainda não são claros, mas pode-se destacar a sua atividade bacteriostática e bactericida, agindo diretamente nos microrganismos (SILVEIRA, et al., 2017).

Outro mecanismo de ação descrito para o Cu como promotor de crescimento se dá a nível metabólico, onde altas concentrações dietéticas do mineral aumentam os níveis de grelina, que por sua vez estimula a produção do hormônio do crescimento, favorecendo então o crescimento dos animais (YANG et al., 2012).

2.7 Nanotecnologia na alimentação e nutrição

A nanotecnologia é a ciência que estuda estruturas e materiais de tamanho nanométrico, ou seja, muito pequenos, visto que um nanômetro equivale a um bilionésimo de milímetro (SILVA et al., 2019). Essa ciência é uma promessa para medicamentos e nutrição, pois os materiais na escala nanométrica apresentam propriedades diferentes daquelas observadas na forma convencional, como por exemplo, incremento da área de interação com outros elementos (ALBRECHT; EVANS; RASTON, 2006).

Além da aplicação da nanotecnologia na biomedicina e indústrias de tecnologia, tem-se ainda a aplicação na área de alimentos com o uso de nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanocápsulas e nanocompostos para embalagem (ASSIS, et al., 2012).

Dentre as utilizações dessas moléculas tem-se o emprego na nutrição animal, com o uso dos nano minerais. Esses produtos têm mostrado efeitos significativos mesmo em doses mais baixas do que as usadas de fontes minerais convencionais, tendo efeitos satisfatórios quando administrados como promotores de crescimento, imunomoduladores e antimicrobianos (RAJE et al., 2018). Segundo os mesmos autores, as nanopartículas apresentam maior potencial do que as fontes convencionais, o que faz com que possam ser usadas em menor quantidade sem prejudicar os resultados. Ainda, de acordo com Khurana et al (2019), nanopartículas de elementos minerais têm maior biodisponibilidade por apresentarem maior área de superfície, alta eficiência catalítica e maior capacidade de absorção.

2.8 Nano cobre (nano CuO)

O nano CuO pode ser usado como aditivo alimentar para aves com o propósito de incrementar o seu crescimento e melhorar o desempenho produtivo, visando diminuir a carga de micro-organismos nocivos e estimular o crescimento de bactérias benéficas no organismo. Dessa forma, há uma melhora do estado

sanitário juntamente com redução da excreção do mineral no ambiente (SCOTT et al., 2018a).

O tamanho reduzido dessa partícula pode elevar a taxa de absorção no trato gastrointestinal, tornando-o mais eficiente mesmo em doses inferiores, quando comparado com o Cu na forma convencional (CIVARDI et al., 2015). Isso se dá pois a interação com materiais orgânicos e inorgânicos é facilitada pela maior área de superfície (ZABOLI et al., 2013). Gonzales-Eguia et al. (2009), estudando a suplementação dietética de nanopartículas de Cu em leitões desmamados, observaram maior biodisponibilidade do mineral, redução da excreção fecal e ainda melhora no desempenho, quando comparado com o sulfato de cobre convencional.

Pressupõe-se que o incremento do desempenho produtivo com a suplementação de nano CuO pode estar relacionado com o aumento da absorção de nutrientes, já que estes estarão mais disponíveis para absorção (SCOTT et al., 2018a). Os autores ainda citam que a utilização de nano CuO na dieta animal já foi avaliada em diferentes espécies e categorias, levando a inúmeros benefícios ao crescimento e eficiência alimentar, redução na produção de toxinas bacterianas, aumento na síntese de vitaminas e outros fatores de crescimento, resultando em aumento de ganho de peso e eficiência alimentar. Por outro lado, durante a absorção intestinal do Cu podem ocorrer inúmeras interações com outros elementos, como zinco e ferro. Essas interações podem levar a distúrbios metabólicos, uma vez que o acúmulo de nanopartículas de Cu no intestino interferirá na absorção dos minerais (OGNIK et al., 2018). Os mesmos autores, trabalhando com nanopartículas de Cu para frangos, observaram um acúmulo desse elemento na parede intestinal e sugeriram que esse acúmulo reduziu a absorção de cálcio e zinco.

3 Materiais e métodos

3.1 Aprovação ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 36970.

3.2 Local, duração do experimento e condições experimentais

A pesquisa foi executada no Biotério Experimental de Avicultura do Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Professor Renato Rodrigues Peixoto (31°48'30,8" S; 52°24'40,7" O) do Departamento de Zootecnia (DZ) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão/RS. A duração do período experimental foi de 21 dias, sendo executado no mês de junho de 2021.

Foi utilizada sala de alvenaria, climatizada com sistema de ar-condicionado, mantendo-se uma temperatura média de 22,8°C durante todo o período experimental (Figura 1). Foram alojadas duas aves por gaiola. As gaiolas eram metálicas, medindo 50 x 50 cm, agrupadas em baterias com cinco andares cada uma, equipadas com bebedouros do tipo *nipple* com taça e um comedouro manual metálico do tipo calha. O regime de iluminação era de 17 horas de luz e 7 horas de escuro (entre 22h e 5h), controladas por temporizador analógico.



Figura 1: Sala experimental com gaiolas metálicas.

Fonte: acervo pessoal.

3.3 Animais

Foram utilizadas 160 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) com 180 dias de idade e 95% de postura. As aves foram adquiridas de uma granja comercial na cidade de Pelotas - RS.

3.4 Tratamentos e dietas experimentais

As dietas semipurificadas foram formuladas para atender às necessidades nutricionais de codornas japonesas em postura considerando-se os níveis recomendados por Silva & Costa (2009) e Rostagno et al. (2017). Sua composição centesimal e níveis nutricionais calculados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das dietas semipurificadas, à base de açúcar e gelatina, para codornas japonesas em postura.

Tratamentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ingredientes (%)										
Açúcar	62,50	62,42	62,34	62,18	62,48	62,45	62,40	62,48	62,45	62,40
Gelatina	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
CuSO ₄ .5H ₂ O (25% Cu)	-	0,0800	0,1600	0,3200	-	-	-	-	-	-
CuO convencional (75% Cu)	-	-	-	-	0,02666	0,05332	0,10667	-	-	-
CuO nano (75% Cu)	-	-	-	-	-	-	-	0,02666	0,05332	0,10667
Óleo de soja	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fosfato monossódico	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Calcário calcítico	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Inerte (areia)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Sulfato de magnésio	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
Cloreto de potássio	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Óxido de zinco	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Óxido de manganês	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Iodeto de potássio	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016	0,00016
Selenito de sódio	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011	0,00011
Sulfato ferroso	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032
L-lisina HCl	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
DL-metionina	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
L-treonina	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
L-triptofano	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
L-cistina	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
Premix vitamínico ¹	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cloreto de colina-60	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Total	100,00									
Composição calculada (%)										

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Energia metabolizável, kcal/kg	2.935	2.932	2.929	2.923	2.934	2.933	2.931	2.934	2.933	2.931
Cálcio	3,161	3,161	3,161	3,161	3,161	3,161	3,161	3,161	3,161	3,161
Fósforo total	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336
Fósforo disponível	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336	0,336
Cobre	0,00001	0,020001	0,04001	0,08001	0,020001	0,04000	0,08001	0,020001	0,04000	0,08001
Magnésio	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051	0,051
Potássio	0,462	0,462	0,462	0,462	0,462	0,462	0,462	0,462	0,462	0,462
Proteína bruta	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00
Zinco	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Manganês	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072	0,00072
Iodo	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010	0,00010
Selênio	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005
Ferro	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096	0,0096
Lisina	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Metionina	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Cistina	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
Metionina + Cistina	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Treonina	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
Triptofano	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Arginina	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
Glicina	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Colina (mg/kg)	2098	2098	2098	2098	2098	2098	2098	2098	2098	2098

¹Composição por quilo de produto: Vitamina A: 8.000.000 UI/kg; Vitamina D3: 2.500.000 UI/kg; Vitamina E: 6.000 UI/kg; Vitamina K3: 1.000 mg/kg; Vitamina B1: 1.000 mg/kg; Vitamina B2: 4.500 mg/kg; Vitamina B6: 2.000 mg/kg; Vitamina B12: 12.000 mcg/kg; Niacina: 15 g/kg; Pantotenato de Cálcio: 6.000 mg/kg; Ácido fólico: 400 mg/kg; Biotina: 25 mg/kg. Produto utilizado: Poli-vita poedeiras®, fornecido pela empresa Polinutri Alimentos S.A.

CuSO₄ – sulfato de cobre; CuO convencional - óxido de cobre no tamanho convencional; e CuO nano - nano óxido de cobre (< 50 nm).

Os dez tratamentos continuam a mesma dieta semipurificada, variando apenas quanto a fonte e níveis de Cu utilizados. A aparência física das dietas pode ser verificada na Figura 2.

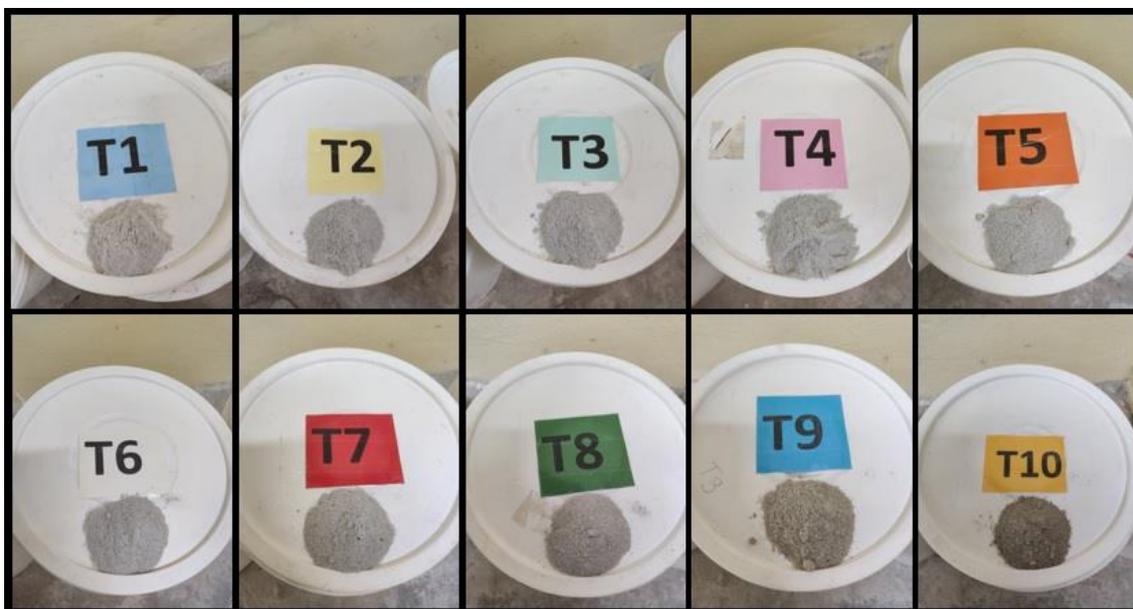


Figura 2: Aparência das dietas semipurificadas (tratamentos 1 a 10).
Fonte: acervo pessoal.

Assim, os 10 tratamentos foram: T1 – dieta semipurificada sem adição de Cu (controle negativo); T2 - dieta semipurificada + 200 ppm de CuSO_4 ; T3 - dieta semipurificada + 400 ppm de CuSO_4 ; T4 - dieta semipurificada + 800 ppm de CuSO_4 ; T5 - dieta semipurificada + 200 ppm de CuO ; T6 - dieta semipurificada + 400 ppm de CuO ; T7 - dieta semipurificada + 800 ppm de CuO ; T8 - dieta semipurificada + 200 ppm de nanoCuO ; T9 - dieta semipurificada + 400 ppm de nanoCuO ; e T10 - dieta semipurificada + 800 ppm de nanoCuO .

3.4.1 Gelatina

A gelatina utilizada no estudo foi gelatina em pó sem sabor da marca C2 alimentos, com a seguinte composição: 90% de proteína bruta; 11,0% de alanina; 9,0% de arginina; 6,7% de ácido aspártico; 0,1% de cistina; 11,4% de ácido glutâmico; 27,0% de glicina; 0,8% de histidina; 13,8% de hidroxiprolina;

1,5% de isoleucina; 3,3% de leucina; 4,3% de lisina; 0,8% de metionina; 2,4% de fenilalanina; 16,0% de prolina; 4,1% de serina; 2,2% de treonina; 0,3% de tirosina; e 2,7% de valina.

3.4.2 Nano cobre (nano CuO)

O nano CuO utilizado foi da marca Sigma Aldrich, em forma de pó, com tamanho inferior a 50 nm, peso molecular de 79,55 g/mol. Código do produto: 544868.

3.5 Manejos

As codornas eram manejadas diariamente, no período da manhã, sendo realizado o arraçãoamento e a limpeza dos bebedouros e bandejas de coleta de excretas. Além disso, eram anotadas a temperatura e a umidade, medidas em três diferentes pontos da sala com o uso de termo-higrômetros digitais. Caso houvesse mortalidade de alguma ave, a mesma era pesada e necropsiada, ficando registrado o peso e a causa da morte. Os comedouros também eram observados diariamente e, havendo ração molhada, eram limpos, sendo a ração retirada e pesada para posterior cálculo do consumo.

3.5.1 Pesagem dos animais

No primeiro dia do experimento as aves foram pesadas, identificadas com anilhas plásticas numeradas (Figura 3) e alojadas duas a duas por gaiola. A pesagem era realizada semanalmente.



Figura 3: Codorna com anilha plástica numerada para identificação.
Fonte: acervo pessoal.

3.5.2 Pesagem de ração

Semanalmente, era feita a retirada total de ração dos comedouros e a sua pesagem, para o cálculo do consumo (Figura 4). As aves recebiam diariamente 30 g de ração cada uma, sendo a quantidade semanal para cada unidade experimental ($30 \text{ g} \times 2 \text{ aves} \times 7 \text{ dias} = 420 \text{ g}$), composta por duas aves por gaiola, armazenada em baldes plásticos com tampa, que também eram pesados ao final da semana para fins de cálculo.



Figura 4: A - retirada da sobra de ração dos comedouros. B - pesagem da sobra da ração.
Fonte: acervo pessoal.

3.6 Variáveis analisadas

Foram analisadas variáveis de desempenho zootécnico (produção de ovos, peso dos ovos, peso inicial e final das aves, ganho de peso e consumo de ração), peso dos órgãos (fígado, coração, moela e intestino) e da carcaça, hematologia (hematócrito e hemoglobina) e determinação de Cu no fígado e tíbias.

3.6.1 Peso das aves

As aves foram pesadas individualmente no primeiro dia do experimento e ao final de cada semana em balança digital, com precisão de 0,05 g (Figura 5). O peso das duas codornas era somado e calculada a média, que correspondia ao peso da unidade experimental.



Figura 5: Pesagem das aves.
Fonte: acervo pessoal.

3.6.2 Produção de ovos

Os ovos eram recolhidos diariamente e a produção da unidade experimental anotada em planilha. A partir desses dados foi calculada a taxa de postura (%), que é a produção total de ovos dentro do período experimental multiplicado por 100 e dividida pelo número de dias do período, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Taxa de postura (\%)} = \frac{(\text{produção total de ovos} * 100)}{\text{n}^{\circ} \text{ dias do período}}$$

3.6.3 Peso dos ovos

Os ovos eram pesados diariamente em balança digital com precisão de 0,01 g.

3.6.4 Consumo de ração

As aves recebiam diariamente 30 g de ração cada uma, sendo colocadas 60 g em cada gaiola, uma vez que a unidade experimental era formada por duas aves, conforme anteriormente descrito. Cada unidade experimental tinha um correspondente balde plástico, identificado com o tratamento e a repetição. Era pesada a quantidade total de ração para as duas aves da unidade para a semana (sete dias). Assim, cada balde recebia 420 g, de onde era retirada a ração para aquela unidade experimental. No final de cada semana, os baldes eram pesados em balança digital (precisão 0,05 g) a fim de se obter a quantidade adicionada nos comedouros.

No dia da pesagem das aves, também eram pesadas as sobras de ração dos comedouros. O valor obtido para cada gaiola foi utilizado no cálculo da quantidade de ração consumida na semana, conforme a seguir:

$$\begin{aligned} \text{Quantidade consumida (g)} \\ = 420 - (\text{sobra do balde} + \text{sobra do comedouro}) \end{aligned}$$

3.6.5 Mortalidade

As aves que eventualmente morressem durante o período experimental eram pesadas e necropsiadas. Anotava-se em planilha o peso e qualquer anormalidade encontrada na necropsia. A quantidade de ração a ser fornecida para a unidade experimental era ajustada.

3.6.6 Peso dos órgãos e carcaça

Ao final do período experimental, quatro codornas por tratamento foram separadas aleatoriamente para que fossem coletados órgãos para posteriores análises. As aves foram submetidas a jejum alimentar de 10 horas e eutanasiadas com a utilização de câmara de concentração de gás, com anestésico inalatório isoflurano.

A eutanásia foi realizada em sala específica no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica e conduzida pelo Médico Veterinário responsável técnico pelo Setor de Avicultura. Foram pesados em balança analítica (precisão 0,05 g) a carcaça inteira e eviscerada, a moela, o coração, o fígado e os intestinos.

3.6.7 Análises hematológicas

Anterior à eutanásia, foi coletado sangue de quatro aves de cada tratamento, ao acaso, para realização de análises hematológicas no Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As coletas foram feitas na veia ulnar com seringas descartáveis de 3 mL e agulhas calibre 20x8 (Figura 6). O sangue foi acondicionado em tubos com anticoagulante (EDTA).



Figura 6: Coleta de sangue na veia ulnar de codornas.
Fonte: acervo pessoal.

3.6.7.1 Hematócrito

O hematócrito foi medido a partir da Técnica de Micro-hematócrito. A técnica consiste em preencher tubos capilares com sangue até $\frac{3}{4}$ da sua altura, selar uma das extremidades e levar os capilares à centrífuga de micro-hematócrito (Sigma 1-15P) por cinco minutos a uma velocidade de 12000 rotações por minuto (RPM) (Figura 7).



Figura 7: Centrífuga para micro-hematócrito.
Fonte: acervo pessoal.

Após a centrifugação ocorre a separação do plasma e dos eritrócitos do sangue em tubos capilares, conforme a Figura 8. A interpretação do resultado é feita em uma escala de leitura onde se limitam as marcas de 0 a 100, observando-se na escala o limite de separação dos eritrócitos com o plasma (Figura 9). O resultado é expresso em porcentagem de eritrócitos em relação ao sangue total.

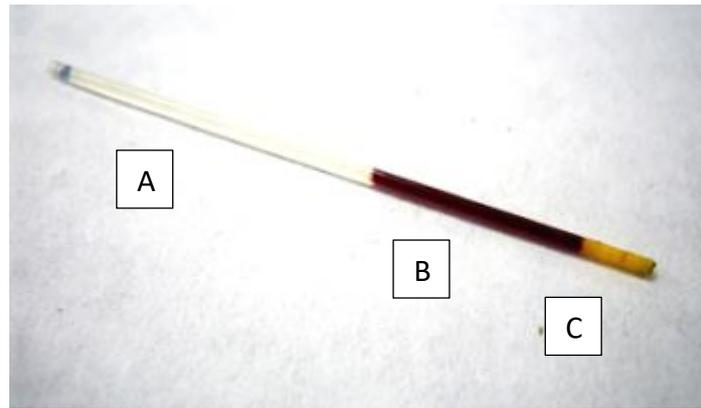


Figura 8: Tubo capilar de micro hematócrito após centrifugação. A - plasma; B - eritrócitos; C - massa para vedação da extremidade do tubo.

Fonte: Ádamo Porto Gama.



Figura 9: Leitura de hematócrito na escala específica.

Fonte: acervo pessoal.

3.6.7.2 Hemoglobina

A concentração da hemoglobina no sangue das codornas foi mensurada a partir da técnica de colorimetria de cianeto de hemoglobina (HiCN), utilizando kit comercial (Kit hemoglobina, ref.43 da Labtest Diagnóstico S.A. - Lagoa Santa, MG), conforme descrito por Van Kampen & Zijlstra (1961). A técnica consiste

basicamente em pipetar 5 µL de sangue total (com EDTA) e 1250 µL de reagente de cor (R1), previamente diluído conforme as orientações do fabricante, homogeneizar a mistura, aguardar 5 minutos e realizar a leitura da reação. É necessário o preparo de uma mistura padrão, em que se utiliza 5 µL de padrão para hemoglobina e 1250 µL do reagente de cor. Para a realização da leitura, foi usada placa de fundo chato para micro titulação, onde foi pipetado em cada poça 350 µL de cada uma das soluções (sangue+R1 e padrão+R1) e uma poça com água de injeção, que foi considerada como branco. Após a montagem da placa com as soluções, foi realizada a leitura no equipamento (FilterMax F5 MultiMode Microplate Readers – Molecular Devices). A absorbância foi lida a 520 nm.

Após a leitura dos dados, o valor do branco era descontado dos valores da amostra e padrão e posteriormente era aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Hemogl. (g/dL)} = \frac{\text{absorbância amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times 10$$

3.6.8 Determinação do cobre

A pesquisa de Cu foi realizada no fígado e na tíbia das codornas, coletados logo após à eutanásia. Os tecidos foram armazenados em sacos plásticos vedados, identificados e levados ao freezer (média de -12°C) até a execução das análises no Laboratório de Metrologia Química da UFPel.

A técnica utilizada foi a espectrofotometria de absorção atômica com chama. Alíquotas de cerca de 2 g de tecido (fígado ou tíbia) eram pesados em balança digital (precisão 0,01 g) diretamente dentro de tubos digestores de vidro, onde eram adicionados 7,5 mL de HNO₃. Os tubos eram levados ao bloco digestor a 130°C por 180 minutos, conforme descrito por Pinto et al., (2019). Após o período de digestão, as amostras eram transferidas dos tubos de vidro para tubos Falcon de 50 mL e o volume preenchido com água deionizada até a marca de 20 mL.

A determinação era feita no espectrofotômetro de absorção atômica com chama (PerkinElmer, modelo Analyst 200, Waltham, Massachusetts, EUA) (Figura 10). Primeiro era feita uma calibração inicial do instrumento com uma série de soluções com concentrações conhecidas, denominadas padrões, dentro

de uma faixa de trabalho pré-estabelecida. A partir de então, cada amostra era aspirada pelo equipamento e a concentração do mineral era determinada.



Figura 10: Espectrofotômetro de absorção atômica com chama.
Fonte: acervo pessoal.

3.6.9 Biodisponibilidade de cobre

A biodisponibilidade de Cu foi determinada por *slope ratio* utilizando-se a concentração de Cu no fígado, da qual se obteve as equações de regressão lineares. A biodisponibilidade foi calculada em função da fonte padrão, o CuSO_4 , no qual o Cu é considerado 100% disponível. Para cada fonte de Cu, foi obtida uma equação de regressão linear ($Y = a + bX$) e o valor de b (*slope*) da fonte teste foi dividida pelo valor de b obtido para a fonte padrão e expressa em porcentagem.

3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em um esquema fatorial $3 \times 3 + 1$, em que foram testadas três fontes de Cu em três diferentes níveis e comparadas com uma dieta sem a inclusão de Cu, que era considerada controle negativo.

Os dados foram submetidos a análise de variância a 5% de probabilidade, avaliando-se o efeito da fonte e dos níveis de Cu e também a presença de interação entre as fontes e os níveis de inclusão do mineral. Quando não houve interação significativa foram avaliados separadamente o efeito das fontes e dos níveis de inclusão de Cu pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise do desdobramento, o efeito das fontes dentro de cada nível de Cu foi comparado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, e o efeito dos níveis em cada fonte de Cu foi avaliado pela análise de regressão polinomial a 5% de probabilidade.

Foi considerado a dieta basal zero, como nível zero para todas as fontes de Cu testadas. Os dados foram analisados comparando-se o efeito dos níveis dentro de cada fonte pela análise de regressão e o efeito da fonte em cada nível pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 Resultados e discussão

4.1 Desempenho zootécnico

Não foi verificada interação significativa ($P > 0,05$) entre as fontes de Cu e os níveis de inclusão do mineral sobre as variáveis de desempenho zootécnico (produção de ovos, peso dos ovos, peso final das aves, ganho de peso, consumo de ração e mortalidade). Ao avaliar-se separadamente o efeito das fontes de Cu e dos níveis de sua inclusão também não foi verificado efeito significativo sobre as variáveis de desempenho (Tabela 2).

Tabela 2: Desempenho de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média ± desvio padrão).

Fontes de cobre	Produção de ovos, %	Peso ovos, g	Peso inicial, g/ave	Peso final, g/ave	Ganho de peso (1-21 dias), g/ave	Consumo total de ração (1-21 dias), g	Mortalidade total, %
CuSO ₄	21,71±6,19	9,66±0,64	175,77±9,36	112,19±16,34	-63,20±18,96	413,18±87,18	18,00±24,49
CuO	24,50±6,05	9,50±0,69	171,81±9,71	117,67±12,89	-52,65±13,80	427,89±101,16	37,50±33,78
Nano CuO	21,82±5,42	9,62±0,53	174,23±12,45	113,67±18,64	-62,01±23,84	375,47±109,56	37,50±36,86
Controle negativo	24,33±7,21	9,30±0,71	178,58±10,72	124,81±16,67	-55,25±20,81	410,16±148,32	16,66±25,00
Nível de inclusão							
0	24,33±7,21	9,30±0,71	178,58±10,72	124,81±16,67	-55,25±20,81	410,16±148,32	16,66±25,00
200	23,61±7,36	9,58±0,73	177,09±10,55	118,68±13,84	-58,61±19,77	414,83±94,62	31,25±32,34
400	23,71±4,73	9,48±0,56	169,93±8,40	114,66±14,41	-55,10±15,29	414,04±101,54	27,08±29,41
800	20,76±5,25	9,71±0,56	174,83±11,56	109,66±19,12	-65,14±22,80	388,70±107,05	34,00±37,41
Valores de P							
Fontes	0,2117	0,6776	0,4017	0,5047	0,1868	0,2317	0,0559
Nível	0,1733	0,4919	0,0562	0,2453	0,2977	0,6171	0,7087
Fontes x nível	0,5336	0,8435	0,4495	0,6890	0,8632	0,9490	0,7745

CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Também foi avaliado o efeito dos níveis de Cu dentro de cada fonte utilizada nas dietas, bem como o efeito da fonte em cada nível. Com relação ao desempenho, não houve diferença significativa das fontes do mineral dentro de cada nível testado, assim como não houve efeito significativo dos níveis de inclusão dentro de cada fonte para produção e peso dos ovos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Produção e peso dos ovos de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre.

Nível/ fonte	Produção de ovos, %				Peso dos ovos, g			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	24,33±7,21	24,33±7,21	24,33±7,21	1,000	9,30±0,71	9,30±0,71	9,30±0,71	1,000
200	23,51±7,68	26,78±9,06	20,53±3,80	0,244	9,70±0,58	9,34±0,95	9,71±0,64	0,541
400	23,21±4,17	23,80±3,81	24,10±6,41	0,934	9,47±0,62	9,42±0,60	9,55±0,51	0,900
800	18,78±5,76	22,91±3,80	20,83±5,65	0,280	9,79±0,74	9,72±0,46	9,60±0,48	0,803
*p linear	0,055	0,452	0,396		0,195	0,186	0,445	
P quadrática	0,140	0,676	0,701		0,430	0,404	0,517	

*p- Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre

Na Tabela 3, embora não se tenha verificado diferença significativa entre as variáveis e os tratamentos, pode-se observar que a produção de ovos tendeu a diminuir quando se utilizou o nível de 800 ppm de Cu, independentemente da fonte. E, para o CuSO_4 , essa tendência se manteve de forma linear decrescente à medida que os níveis aumentaram. Porém, o contrário é observado em relação ao peso dos ovos, em que os ovos numericamente mais leves são observados quando não se teve a inclusão de Cu nas dietas. Isso se deve ao fato de que quanto menor a produção maior é o peso os ovos, uma vez que permanecem mais tempo no folículo.

De modo semelhante, também não se observou diferença para ganho de peso e consumo total (tabela 4). Quanto a mortalidade (tabela 5), a fonte de CuO apresentou diferença significativa em relação aos níveis de inclusão ($p=0,039$), tendo uma resposta linear crescente à medida que se aumentou o nível de inclusão.

Em relação ao ganho de peso e ao consumo de ração apesar de não se observar diferença significativa, pode-se verificar que quando o consumo foi maior a perda de peso foi menor, uma vez que não se teve ganho de peso no presente estudo. Em contrapartida, em todas as fontes e níveis pode-se observar a perda de peso das aves.

Quanto a mortalidade, por sua vez, embora não tenha sido verificada diferença significativa entre os tratamentos, a inclusão de 800 ppm de CuO na dieta apresentou a maior taxa média numérica (50%) de mortalidade, evidenciando um provável efeito tóxico. Esse efeito também pode ser evidenciado através da resposta linear crescente ($P = 0,039$) observada, ou seja, conforme aumentou-se a concentração de CuO nas dietas houve um aumento crescente significativo na taxa de mortalidade das aves.

Tabela 4: Ganho de peso e consumo total de ração de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).

Nível/ fonte	Ganho de peso (1-21 dias), g/ave				Consumo total de ração (1-21 dias), g			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	-55,25 \pm 20,81	-55,25 \pm 20,81	-55,25 \pm 20,81	1,000	410,16 \pm 148,32	410,16 \pm 148,32	410,16 \pm 148,32	1,000
200	-64,65 \pm 16,98	-48,39 \pm 11,13	-61,92 \pm 26,93	0,255	405,62 \pm 68,86	453,00 \pm 105,21	385,87 \pm 104,33	0,361
400	-54,40 \pm 12,45	-51,93 \pm 13,23	-59,53 \pm 20,88	0,644	429,18 \pm 90,93	436,37 \pm 108,09	376,56 \pm 107,19	0,456
800	-70,56 \pm 24,18	-58,58 \pm 17,30	-64,57 \pm 26,81	0,644	405,66 \pm 105,07	394,31 \pm 93,70	364,00 \pm 129,59	0,731
*p linear	0,184	0,584	0,495		0,977	0,637	0,445	
P quadrática	0,365	0,544	0,788		0,944	0,583	0,726	

*p Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Tabela 5: Mortalidade de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão)

Nível/ fonte	Mortalidade, %			**p
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	
0	16,66 \pm 25,00	16,66 \pm 25,00	16,66 \pm 25,00	1,000
200	25,00 \pm 26,72	31,25 \pm 37,20	37,50 \pm 35,35	0,758
400	12,50 \pm 23,14	31,25 \pm 25,87	37,50 \pm 35,35	0,215
800	16,66 \pm 25,00	50,00 \pm 37,79	37,50 \pm 44,32	0,180
*p linear	0,788	0,039	0,293	
P quadrática	0,965	0,124	0,362	
	Y=18,746+0,03 87x, r ² =0,94			

*p- Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, o peso final reduziu de forma linear conforme aumentou a concentração de CuSO₄ e nano CuO nas dietas (P = 0,008). Com isso pode-se verificar que níveis muito elevados de Cu, 800 ppm de CuSO₄ e nano CuO, levam a diminuição no peso dos animais. Esse resultado corrobora com aqueles obtidos por Mendonça Jr. (1999), que suplementou 200, 400, 600 e 800 ppm de Cu na forma de CuSO₄ pentahidratado na dieta de poedeiras comerciais e observou queda no desempenho produtivo das aves conforme aumentou a concentração do mineral.

Antes da realização do presente estudo, as codornas estavam recebendo uma dieta comercial padrão a base de milho e farelo de soja, com o uso de premix vitamínico e mineral comercial para codornas em postura, formulada de acordo com os níveis recomendados por Silva e Costa (2009) e Rostagno et al. (2017). As aves estavam nas mesmas instalações e submetidas ao mesmo manejo descrito no presente estudo. Seu desempenho produtivo estava dentro do esperado, assim como seu estado sanitário (dados não publicados).

No entanto, ao avaliar-se os resultados deste estudo, em termos gerais, observou-se um baixo desempenho das aves, sendo que a introdução das dietas semipurificadas a base de açúcar e gelatina levou a uma redução imediata no consumo. Consequentemente, todo o desempenho foi afetado negativamente. O peso diminuiu e a produção e peso dos ovos também, demonstrando assim a sensibilidade das codornas e a não adaptação às dietas semipurificadas testadas. Além do baixo consumo de ração e consequente queda no

desempenho produtivo, à medida que o experimento foi avançando (cerca de 15 dias) foi possível verificar um aumento considerável da taxa de mortalidade das aves, além de mudança no comportamento das mesmas, que visivelmente pareciam estar abatidas e prostradas, com baixo empenamento, possivelmente pelo baixo consumo de ração e deficiente aporte nutricional.

Optou-se pelo uso de dietas semipurificadas para que não houvesse a interferência nos níveis de Cu provenientes de outras fontes, como por exemplo milho e farelo e soja. Sendo assim, a única inclusão de Cu nas dietas foi a fornecida pelo CuSO_4 , CuO e pelo nano CuO.

Funk & Baker (1991), trabalhando com frangos, também utilizaram dieta semipurificada (a base de dextrose e caseína) e dietas práticas (a base de milho e farelo de soja) para comparar a toxicidade de Cu nas diferentes dietas. As dietas semipurificadas são recomendadas também quando se trabalha com minerais com a finalidade de minimizar ou mesmo eliminar a ação de fatores antinutricionais que podem estar presentes nos ingredientes convencionalmente utilizados nas dietas (LOVELL, 1998; HARDY & BARROWS, 2002; NRC, 2011).

Tabela 6: Peso inicial e final de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).

Nível/ fonte	Peso inicial, g				Peso final, g			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	178,58 \pm 10,72	178,58 \pm 10,72	178,58 \pm 10,72	1,000	124,81 \pm 16,67	124,81 \pm 16,67	124,81 \pm 16,67	1,000
200	181,96 \pm 7,45	173,25 \pm 6,43	176,06 \pm 14,96	0,250	117,31 \pm 15,86	123,35 \pm 10,10	115,57 \pm 15,34	0,563
400	170,75 \pm 10,50	165,75 \pm 8,11	173,31 \pm 4,70	0,191	116,34 \pm 10,05	113,81 \pm 12,07	113,71 \pm 21,62	0,926
800	174,72 \pm 7,28	176,43 \pm 11,57	173,34 \pm 16,06	0,875	102,93 \pm 19,43	116,20 \pm 16,32	111,75 \pm 21,15	0,433
*p linear	0,189	0,649	0,361		0,008	0,587	0,204	
P quadrática	0,336	0,03	0,587		0,031	0,284	0,35	
		Y=179,37- 0,0556x+0,00006x ² , r ² =0,90			Y=124,49- 0,0261x, r ² =0,96			

*p Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Scott et al. (2018b) realizaram a injeção *in ovo* de nanopartículas de Cu e verificaram que tal fato pode melhorar o desempenho de frangos de corte de forma mais eficiente do que a injeção de CuSO₄. De acordo com os autores, a suplementação com nanopartículas de Cu melhorou não somente o desempenho dos frangos de corte, mas também o uso de energia e nitrogênio.

De forma semelhante ao presente estudo, Olgun et al. (2020) ao testarem os níveis de 0, 5, 10 e 20 mg/kg de Cu orgânico em dietas práticas de codornas de postura, não observaram efeito significativo dos níveis utilizados sobre a produção de ovos, o peso dos ovos, a massa de ovos e a conversão por massa de ovos.

4.2 Peso da carcaça e órgãos

Os dados de peso de carcaça e de órgãos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Peso de carcaça (g) e de órgãos (g) de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).

Fontes de cobre	Carcaça	Carcaça eviscerada	Fígado	Coração	Moela	Intestino
CuSO ₄	95,85 \pm 9,74	75,37 \pm 7,76	3,20 \pm 0,49	1,00 \pm 0,00	3,16 \pm 0,86	6,75 \pm 0,83
CuO	87,37 \pm 14,60	69,45 \pm 11,40	3,04 \pm 0,83	1,00 \pm 0,00	3,00 \pm 0,56	5,95 \pm 0,98
Nano CuO	94,45 \pm 17,50	76,54 \pm 14,99	2,91 \pm 0,66	1,04 \pm 0,14	3,04 \pm 0,62	6,00 \pm 0,85
Controle negativo	115,62 \pm 1,70	88,37 \pm 7,38	5,00 \pm 0,91	1,12 \pm 0,25	3,00 \pm 0,57	6,62 \pm 0,47
Nível de inclusão						
0	115,62 \pm 1,70	88,37 \pm 7,38	5,00 \pm 0,91	1,12 \pm 0,25	3,00 \pm 0,57	6,62 \pm 0,47
200	97,08 \pm 12,32	77,33 \pm 11,38	3,16 \pm 0,61	1,00 \pm 0,00	3,08 \pm 0,97	6,29 \pm 1,11
400	87,27 \pm 16,02	70,29 \pm 13,39	2,87 \pm 0,64	1,04 \pm 0,14	2,95 \pm 0,54	6,00 \pm 0,82
800	93,33 \pm 14,05	73,75 \pm 10,53	3,12 \pm 0,77	1,00 \pm 0,00	3,16 \pm 0,44	6,41 \pm 0,90
Valores de P						
Fontes	0,300	0,319	0,629	0,579	0,823	0,066
Nível	0,250	0,372	0,584	0,579	0,752	0,511
Fontes x nível	0,976	0,981	0,797	0,696	0,218	0,633

CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Não foi observada interação significativa ($P>0,05$) entre as fontes de Cu e os níveis de inclusão sobre o peso da carcaça e de órgãos. Avaliando-se isoladamente as fontes de Cu, bem como os níveis de inclusão, também não foram observados efeitos significativos ($P>0,05$) nas mesmas variáveis.

Ao avaliar o efeito dos níveis dentro de cada fonte de Cu e o efeito da fonte em cada nível sobre o peso da carcaça e de órgãos, também não foi observada diferença significativa entre as fontes de Cu avaliadas em quaisquer dos níveis que foram testados, como demonstram as Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 8: Peso da carcaça e carcaça eviscerada de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).

Nível/ fonte	Carcaça, g				Carcaça eviscerada, g			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	115,62 \pm 1,70	115,62 \pm 1,70	115,62 \pm 1,70	1,000	88,37 \pm 7,38	88,37 \pm 7,38	88,37 \pm 7,38	1,000
200	98,75 \pm 13,21	92,75 \pm 12,88	99,75 \pm 13,32	0,726	77,25 \pm 11,34	72,75 \pm 7,94	82,00 \pm 15,05	0,562
400	90,70 \pm 8,38	84,00 \pm 13,47	87,12 \pm 25,68	0,864	71,62 \pm 6,40	67,25 \pm 10,05	72,00 \pm 22,28	0,878
800	98,12 \pm 7,06	85,37 \pm 19,36	96,50 \pm 13,08	0,415	77,25 \pm 4,83	68,37 \pm 17,04	75,62 \pm 5,76	0,490
*p linear	0,064	0,019	0,150		0,139	0,04	0,194	
P quadrática	0,002	0,006	0,059		0,02	0,02	0,25	
	Y= 115,54 – 0,1033x+0,000 1x ² , r ² =0,99	Y= 114,98- 0,1246x+0,0 001x ² , r ² =0,99			Y=88,38- 0,0698x+0,0 0006x ² , r ² =0,99	Y= 87,873- 0,0839x- 0,00007x ² , r ² = 0,98		

*p- Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Na avaliação do efeito dos níveis dentro de cada fonte de Cu testada, observou-se efeito quadrático significativo dos níveis utilizados nas aves alimentadas com dietas contendo CuO e CuSO₄ sobre o peso da carcaça e da carcaça eviscerada (Tabela 8). O peso da carcaça e carcaça eviscerada diminuiu até o nível de 400 ppm e voltou a aumentar quando se incluiu 800 ppm de CuSO₄ e CuO.

Para o peso do fígado (Tabela 9), por sua vez, as aves que foram alimentadas com dietas contendo CuSO₄ e CuO também apresentaram uma resposta quadrática decrescente até o nível de 400 ppm e posteriormente aumentando.

Tabela 9: Peso do fígado e coração de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média ± desvio padrão).

Nível/ fonte	Fígado, g				Coração, g			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	5,00±0,91	5,00±0,91	5,00±0,91	1,0000	1,12±0,25	1,12±0,25	1,12±0,25	1,0000
200	3,25±0,64	3,12±0,75	3,12±0,62	0,955	1,00±0	1,00±0	1,00±0	.
400	3,12±0,47	2,62±0,62	2,87±0,85	0,593	1,00±0	1,00±0	1,12±0,25	0,405
800	3,25±0,50	3,37±1,10	2,75±0,64	0,525	1,00±0	1,00±0	1,00±0	.
*p linear	0,029	0,112	0,009		0,249	0,249	0,477	
P quadrática	0,002	0,003	0,002		0,279	0,279	0,779	
	Y= 4,8781- 0,008x+0,000008x ² , r ² =0,92	Y=4,9348- 0,0103x+0,00001x ² , r ² =0,98	Y=4,877- 0,0087x +0,000006 x ² , r ² =0,94					

*p Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

O peso do fígado das aves alimentadas com dietas contendo nano CuO também apresentou resposta quadrática ($P = 0,002$), diminuindo até o nível máximo, 800 ppm (Tabela 9). De modo semelhante, Scott et al. (2018b) avaliaram a utilização dos níveis de 0, 20 e 50 mg/kg de nano CuO e CuSO₄ em dietas de frangos e observaram que o peso relativo do fígado foi afetado por ambas as formas de Cu, sendo menor em concentrações mais altas de Cu. Já Lee et al., (2016), apontam que a alta concentração de nano CuO afeta negativamente a histologia do fígado, rins e baço, mas não do coração e dos pulmões em ratos, sendo estas mudanças acompanhadas também no peso de órgãos, corroborando com os dados encontrados no presente estudo. Esses resultados podem estar relacionados à queda de desempenho observada acima.

Em relação ao peso da moela e intestino (Tabela 10), também não foi observada diferença significativa em relação aos níveis e fontes de Cu adicionados na dieta.

Tabela 10: Peso da moela e intestino de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de cobre (média \pm desvio padrão).

Nível/ fonte	Moela, g				Intestino, g			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	3,00 \pm 0,57	3,00 \pm 0,57	3,00 \pm 0,57	1,000	6,62 \pm 0,47	6,62 \pm 0,47	6,62 \pm 0,47	1,000
200	3,37 \pm 1,49	2,50 \pm 0,57	3,37 \pm 0,47	0,374	7,12 \pm 0,47	6,00 \pm 1,47	5,75 \pm 0,86	0,185
400	3,12 \pm 0,47	3,12 \pm 0,47	2,62 \pm 0,62	0,353	6,25 \pm 1,04	6,00 \pm 0,70	5,75 \pm 0,86	0,733
800	3,00 \pm 0,40	3,37 \pm 0,25	3,12 \pm 0,62	0,521	6,87 \pm 0,85	5,87 \pm 0,94	6,50 \pm 0,81	0,310
*p linear	0,838	0,126	0,918		0,936	0,330	0,901	
P quadrática	0,873	0,222	0,858		0,900	0,517	0,143	

*p- Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

4.3 Análises sanguíneas

Com relação às análises sanguíneas, não foi verificada interação significativa ($P>0,05$) entre as fontes de Cu e os seus níveis de inclusão sobre o hematócrito. Da mesma forma, ao avaliar-se separadamente os fatores, não se observou efeito significativo ($P>0,05$) dos níveis de inclusão e das fontes de Cu sobre esta variável (Tabela 11).

Tabela 11: Hematócrito e hemoglobina em codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).

Fontes de cobre	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)
CuSO ₄	32,64 \pm 4,61	25,07 \pm 4,16 B
CuO	30,00 \pm 6,15	25,71 \pm 7,59 B
Nano CuO	31,46 \pm 5,84	32,24 \pm 5,73 A
Basal semipurificada	28,40 \pm 3,36	26,52 \pm 2,53 AB
Nível de inclusão		
0	28,40 \pm 3,36	26,52 \pm 2,53
200	31,86 \pm 4,77	28,07 \pm 7,62
400	31,60 \pm 4,48	26,40 \pm 6,35
800	30,50 \pm 7,43	28,80 \pm 6,41
Valores de P		
Fontes	0,3638	0,0007
Nível	0,8694	0,4879
Fontes x nível	0,1270	0,0046

*P Nível de significância pela equação de regressão. Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Na avaliação de hemoglobina, por outro lado, houve efeito significativo ($P=0,0007$) das fontes de Cu (Tabela 11), em que as aves alimentadas com dietas contendo a suplementação com nano CuO apresentaram maior concentração de hemoglobina do que as alimentadas com dietas suplementadas com CuO e CuSO₄.

Observou-se também interação significativa ($P=0,0046$) entre as fontes de Cu e os níveis de inclusão sobre a hemoglobina (Tabela 11). Pode ser verificado na Tabela 12 que as codornas alimentadas com dietas contendo 200 ppm de nano CuO apresentaram maior hemoglobina (36,70), diferindo daquelas que foram alimentadas com dietas suplementadas com CuO (24,77) e CuSO₄ (22,73), as quais não diferiram entre si.

Tabela 12: Hemoglobina (g/dL) em codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).

Nível /fonte	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	26,52 \pm 2,53	26,52 \pm 2,53	26,52 \pm 2,53	1,0000
200	22,73 \pm 3,91 B	24,77 \pm 6,64 B	36,70 \pm 1,25 A	0,0007
400	27,01 \pm 4,45 AB	20,86 \pm 5,96 B	31,34 \pm 4,08 A	0,017
800	25,58 \pm 3,52	31,49 \pm 7,07	28,69 \pm 7,42	0,421
*p linear	0,873	0,215	0,841	
P quadrática	0,942	0,04	0,085	

$$Y=27,20-0,03x+0,00004x^2$$

$$r^2=0,31$$

*p- Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. Letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

De modo semelhante, as aves que receberam dietas com 400 ppm de nano CuO apresentaram maior hemoglobina (31,34) do que as que foram alimentadas com dietas contendo CuO (20,86), não diferindo daquelas que receberam dietas com CuSO₄ (27,01).

Ao avaliar-se o efeito dos níveis de Cu dentro de cada uma das fontes utilizadas nas dietas, somente o CuO promoveu efeito significativo, sendo observado uma resposta quadrática decrescente (P=0,04), em que o aumento dos níveis de CuO na dieta levou a uma redução na hemoglobina até o nível de 400 ppm, aumentando posteriormente, quando foi utilizado 800 ppm do mineral.

Conforme pode ser verificado na Tabela 13, as codornas alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de CuSO₄ apresentaram um aumento linear crescente e significativo do hematócrito conforme aumentou a inclusão do mineral (P = 0,013). As aves alimentadas com níveis crescentes das demais fontes do mineral não apresentaram diferença significativa no hematócrito (P>0,05).

Tabela 13: Hematócrito (%) em codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre (média \pm desvio padrão).

Nível /fonte	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	**p
0	28,40 \pm 3,36	28,40 \pm 3,36	28,40 \pm 3,36	1,000
200	31,00 \pm 4,94	34,00 \pm 3,80	30,60 \pm 5,68	0,503
400	31,80 \pm 3,27	29,60 \pm 6,30	33,40 \pm 3,28	0,435
800	35,75 \pm 5,18	26,40 \pm 6,46	30,40 \pm 8,32	0,177
*p linear	0,013	0,263	0,581	
P quadrática	0,053	0,211	0,390	
Y= 28,64 + 0,008x, r ² =0,30				

*p- Nível de significância pela equação de regressão, **p – nível de significância pela análise de variância. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Ao avaliarem os níveis menores de Cu do que os utilizados no presente estudo (0, 5, 10, 20 mg/kg) e na forma orgânica, em dietas comerciais de codornas de postura, Olgun et al. (2020) não observaram efeito sobre hematócrito e hemoglobina.

Pesquisas demonstraram que o Cu desempenha um papel significativo no metabolismo do ferro, na síntese de hemoglobina e na produção de eritrócitos (Sharma et al. 2009; Samanta et al. 2011). Os resultados do presente estudo demonstraram maior hemoglobina nas aves que receberam nano CuO. O aumento de hemoglobina sugere que se tenha um aumento no número de hemácias, porém como o hematócrito não foi alterado e não se realizou a contagem de células, não se pode afirmar que o número de hemácias realmente tenha sido aumentado. Esse aumento de hemoglobina pode ser explicado pelo fato de haver mais moléculas sendo inseridas nas células para suprir uma demanda de oxigênio, não alterando o número de hemácias ou então o número de hemácias pode estar sendo subestimado por uma possível desidratação. De forma semelhante, Miroshnikov et al. (2015) observaram aumento da hemoglobina no sangue de aves que receberam administração de nanopartículas de Cu por via intramuscular.

4.4 Pesquisa de cobre nos tecidos

A concentração de Cu no fígado e nas tíbias é apresentada na Tabela 14, onde observa-se que houve interação significativa ($P < 0,0001$) entre as fontes e os níveis de Cu.

Tabela 14: Concentração de cobre no fígado e nas tíbias de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre.

Fontes de cobre	Concentração de cobre no fígado (mg/kg)	Concentração de cobre na tibia (mg/kg)
CuSO ₄	18,44±17,59	1,73±0,53
CuO	10,20±2,38	1,81±0,20
Nano CuO	9,01±5,99	6,30±3,68
Basal semipurificada	2,31±0,66	1,40±0,12
Nível de inclusão		
0	2,31±0,66	1,40±0,12
200	6,51±2,054	1,58±0,28
400	8,95±2,28	3,69±3,52
800	23,77±15,46	4,35±3,29
	Valores de P	
Fontes	<0,0001	<0,0001
Nível	<0,0001	<0,0001
Fontes x nível	<0,0001	<0,0001

CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

O desdobramento da interação para a concentração no fígado entre as fontes e os níveis de Cu é apresentado na Tabela 15.

Tabela 15: Desdobramento da interação da concentração de cobre no fígado e nas tíbias (mg/kg) de codornas alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis de inclusão de cobre.

Nível /fonte	Concentração de cobre no fígado (mg/kg)				Concentração de cobre nas tíbias (mg/kg)			
	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	P**	CuSO ₄	CuO	Nano CuO	P**
0	2,31±0,66	2,31±0,66	2,31±0,66	1,000	1,40±0,12	1,40±0,12	1,40±0,12	1,000
200	7,49±0,70 A	8,14±0,60 A	3,90±0,87 B	<0,0001	1,35±0,33	1,69±0,16	1,69±0,24	0,153
400	9,12±1,30 AB	10,67±2,24 A	6,43±0,75 B	0,027	1,45±0,22 B	1,84±0,28 B	9,13±0,71 A	<0,0001
800	45,48±5,77 A	12,33±2,14B	16,06±3,28 B	<0,0001	2,38±0,15 B	1,89±0,11 B	8,79±0,59 A	<0,0001
P*	<0,0001	<0,0001	<0,0001		0,0001	0,0041	<0,0001	
	Y= -0,886+0,0414x, r ² =0,90	Y=4,530+0,0117x, r ² =0,76	Y=1,492+0,0154x r ² =0,97		Y=1,4079- 0,0009x +0,00003x ² , r ² = 0,99	Y=1,4046+0,0016x -0,00001x ² , r ² =0,99	Y= 0,3999+ 0,0227x- 0,00001x ² , r ² = 0,78	

Letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. *p- Nível de significância pela equação de regressão. CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

As aves que foram alimentadas com dietas contendo 200 ppm de nano CuO apresentaram menor concentração de Cu no fígado (3,90 mg/kg), diferindo daquelas que foram alimentadas com dietas contendo a mesma concentração (200 ppm) de CuO (8,14 mg/kg) e de CuSO₄ (7,49 mg/kg) ($P < 0,0001$). Quando foi utilizado o nível de 400 ppm, as codornas que receberam dietas suplementadas com nano CuO apresentaram menor concentração do mineral no fígado (6,43 mg/kg) do que aquelas que receberam a dieta com a mesma concentração (400 ppm) de CuO (10,67 mg/kg), ambas não diferindo das aves que foram alimentadas com dieta contendo 400 ppm de CuSO₄ (9,12 mg/kg).

Quando foi verificado o efeito do fornecimento do nível mais elevado de Cu (800 ppm) na dieta das codornas, aquelas que foram alimentadas com esse nível do mineral na forma de CuSO₄ apresentaram o valor mais elevado de concentração de Cu no fígado (45,48 mg/kg), um valor praticamente três vezes maior do que a concentração verificada no fígado das codornas que foram alimentadas com dietas contendo 800 ppm de CuO (12,33 mg/kg) e nano CuO (16,06 mg/kg), evidenciando a elevada biodisponibilidade daquela forma de Cu.

Ao avaliar-se o efeito dos níveis utilizados em cada uma das fontes, pela análise de regressão, observou-se em ambas as fontes uma resposta linear crescente ($P < 0,0001$), em que conforme aumentou o nível de inclusão nas dietas ocorreu um aumento correspondente na concentração de Cu no fígado. Esse resultado era esperado, uma vez que o fígado é um dos principais órgãos de armazenamento de Cu no organismo.

Na Tabela 15 também é apresentado o desdobramento da interação para concentração de Cu nas tíbias. Independentemente da fonte de Cu utilizada, conforme aumentou a sua concentração na dieta, houve uma resposta quadrática na concentração do mineral nas tíbias de codornas ($P < 0,001$). As aves que foram alimentadas com dietas contendo os níveis mais elevados de Cu (400 e 800 ppm) na forma de nano CuO apresentaram concentração significativamente maior do mineral nas tíbias ($P < 0,0001$), praticamente quatro vezes maior, evidenciando ser este um tecido em que o acúmulo do mineral nesta forma é considerável.

As Figuras 11 e 12 evidenciam a maior concentração de Cu no fígado e tíbias, respectivamente, conforme a elevação dos níveis, independentemente da fonte utilizada.

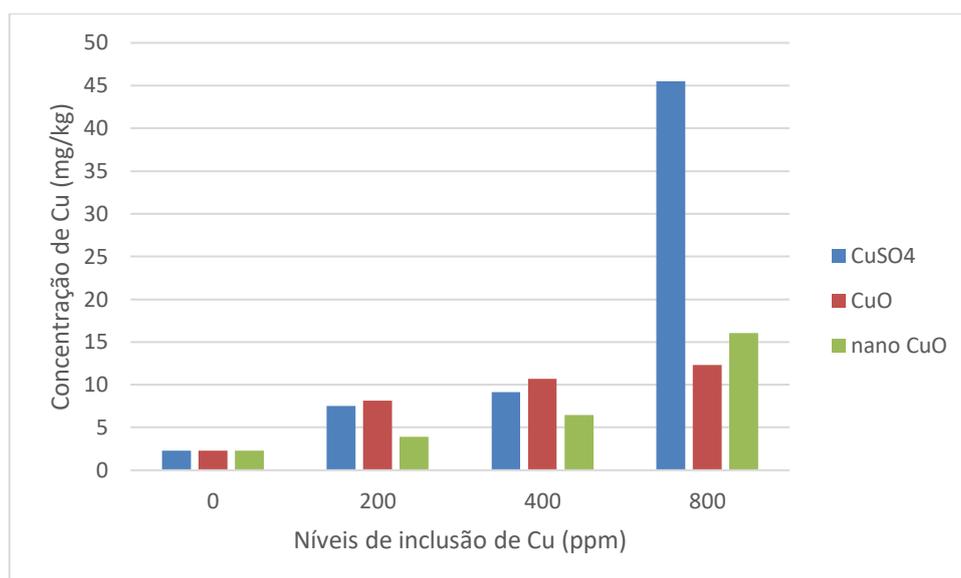


Figura 11: Concentração de cobre (mg/kg) no fígado de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis do mineral.

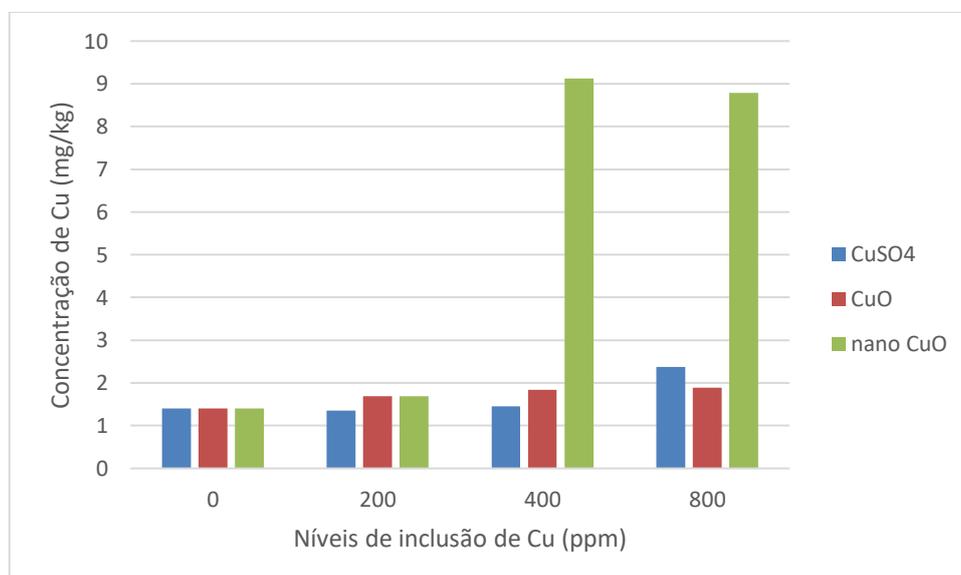


Figura 12: Concentração de cobre (mg/kg) nas tíbias de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis do mineral.

4.5 Biodisponibilidade de cobre

Na Tabela 16 é apresentada a biodisponibilidade do Cu determinada em função da sua concentração no fígado.

Tabela 16: Equação de regressão, coeficiente de determinação (r^2) e biodisponibilidade de cobre considerando a concentração do mineral no fígado.

	Equação de regressão	r^2	Biodisponibilidade relativa (%)
Concentração de cobre no fígado (mg/kg)			
CuSO ₄	Y= -0,886 + 0,0414x	0,90	100
CuO	Y= 4,530 + 0,0117x	0,76	28,3
Nano CuO	Y= 1,492 + 0,0154x	0,97	37,2

CuSO₄ – sulfato de cobre, CuO - óxido de cobre e Nano CuO – nano óxido de cobre.

Os resultados indicaram valores de biodisponibilidade relativa de Cu em relação ao padrão, CuSO₄, definido como 100% biodisponível.

A biodisponibilidade relativa foi de 37,2% para nano CuO, e 28,3% para CuO convencional, ou seja, o nano CuO se mostrou uma forma mais biodisponível de Cu do que o mineral na forma de CuO, que é a convencionalmente utilizada nas dietas.

A maior biodisponibilidade relativa observada vem ao encontro da concentração observada das diferentes fontes de Cu no fígado (Tabela 15). Conforme descrito anteriormente, o fígado é um dos principais locais de armazenamento de Cu no organismo. Na Tabela 15 ficou evidenciada a maior concentração de Cu no fígado, na forma de CuSO₄, principalmente quando elevadas concentrações do mineral foram adicionadas às dietas.

A biodisponibilidade de minerais traço para animais é definida como o grau em que os minerais ingeridos de uma fonte são absorvidos de forma que pode ser metabolizada pelo animal. No entanto, a baixa biodisponibilidade principalmente do nano CuO no presente estudo, provavelmente se deve ao baixo consumo das dietas.

A Figura 13 mostra a biodisponibilidade de Cu no fígado. É possível observar que, dentre as fontes utilizadas, o nano CuO apresentou maior biodisponibilidade em relação ao CuO.

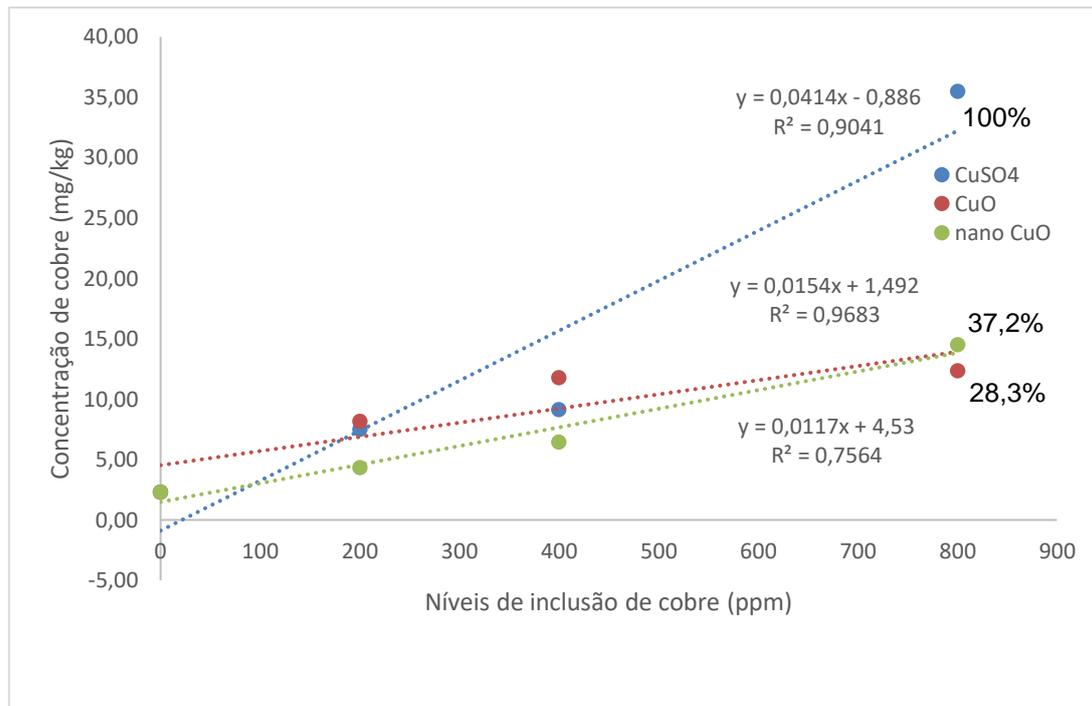


Figura 13: Biodisponibilidade relativa (%) de cobre no fígado de codornas de postura alimentadas com dietas semipurificadas contendo diferentes fontes e níveis do mineral.

5 CONCLUSÕES

A inclusão de 200 ppm de nano CuO na dieta de codornas de postura proporciona maior peso de carcaça quando comparado com os demais tratamentos.

A inclusão de nano CuO nos níveis de 200 e 400 ppm aumenta a hemoglobina e, no nível de 400 ppm, o hematócrito das aves.

O CuO na forma nano (< 50 nm) é mais biodisponível do que na sua forma convencional.

Mais estudos devem ser realizados com o intuito de verificar a eficácia do nano CuO como promotor de crescimento em aves.

6 REFERÊNCIAS

- ABPA. Relatório Anual. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, [s. l.], p. 80, 2021. Disponível em: <https://abpa-br.org/noticias/>
- ALBRECHT, M. A.; EVANS, C. W.; RASTON, C. L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 417–432, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b517131h>
- ALVES, E.L. Efeito dos níveis de cálcio em duas fontes sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciência agrotecnológica*, Lavras, v.26, n.6, p.1305-1312, nov./dez., 2002.
- ARAUJO, J. A., SILVA, J. H. V., AMÂNCIO, A. L. de L., Lima, C. B., OLIVEIRA, E. R. A. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinária Brasília**, 2 (3), 53-60, 2008.
- ASSIS, L. M. ZAVAREZE, E. da R. HERNÁNDEZ, C. P. SOARES, L. A. de S. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012005000004>
- BERTECHINI, A. G.; Nutrição de monogástricos. Lavras: UFLA, p. 1302, 2006.
- BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B. S.; APPLGATE, T. J. Influence of Dietary Zinc, Copper, and Manganese on the Intestinal Health of Broilers Under Eimeria Challenge. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 7, n. January, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00013>
- CIVARDI, C.; SCHUBERT, M.; FEY, A.; WICK, P.; SCWARZE, F. W. M. Micronized copper wood preservatives: Efficacy of ion, nano, and bulk copper against the brown rot fungus rhodonia placenta. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142578>
- DÍAZ, T.; TEODORO, A. L.; ROJAS, I. C. Opsina; CHITIVA, Andrés Felipe Pachón; GUZMAN, Jairo Andrés Pardo. Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão. **PubVet**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 279–286, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v9n6.279-286>
- FISHER, C.; LAURSEN-JONES, A.P.; HILL, K.J.; HARDY, W.S. The effect of copper sulphate on performance and the structure of the gizzard in broilers. **British Poultry Science** 14: 55-68, 1973.
- FUNK, M. A.; BAKER, D. H. Toxicity and tissue accumulation of copper in chicks fed casein and soy-based diets. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 69, n. 11, p. 4505–4511, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/1991.69114505x>
- GATTÁS, G.; BARBOSA, F. F. Cobre Na Nutrição De Aves E Suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 117–133, 2004.
- GONZALES-EGUIA, A.; FU, C. M.; LU, F. Y.; LIEN, T, F. Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum

traits of piglets. **Livestock Science**, [s. l.], v. 126, n. 1–3, p. 122–129, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.06.009>

GONZÁLEZ F.H.D.; SILVA S.C. Bioquímica Clínica dos Minerais. In: Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2.ed. Porto Alegre: **Editora da UFRGS**, pp.238-239, 2006.

HARDY R. W.; BARROWS F.T. Diet formulation and manufacturing. **Fish nutrition**. 3 Ed, pp. 505–600, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2019> Acesso em: 15 abr. 2021.

JENKINS K.S.; HIDIROGLOU M. Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. **J. Dairy. Sci.** 72, 150-156, 1989.

KHURANA, A; TEKULA, S; SAIFI, M. A.; VENKATESH, P.; GODUGU, C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 111, n. December 2018, p. 802–812, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.146>

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical Biology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 176–185, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>

KNAGA, S.; SIWEK, M.; TAVANIELLO, S.; MAIORANO, G.; WITKOWSKI, A.; JEZEWSKA-WITKOWSKA, G.; Bednarczyk, M.; ZIEBA, G. Identification of quantitative trait loci affecting production and biochemical traits in a unique Japanese quail resource population. **Poultry Science**, [s. l.], v. 97, n. 7, p. 2267–2277, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pey110>

LEE, I.-C., KO, J.-W., PARK, S.-H., LIM, J.-O., SHIN, I.-S., MOON, C., KIM, J.-C. Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats. **International Journal of Nanomedicine**, 11, 2883–2990, 2016.

LÖNNERDAL, B. Intestinal regulation of copper homeostasis: A developmental perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 846–850, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.3.846s>

LOVELL T. Nutrition and feeding of fish. Boston: **Kluwer Academic Publishers**, 267p, 1998.

MENDONÇA JR., C. X.; WATANABE, C.; MORI, A. V.; SANTOS, C. de O. F.; ALMEIDA, C. R. M. Efeitos de níveis de cobre suplementar na dieta sobre o desempenho produtivo, colesterol na gema e lípidos no plasma sanguíneo de poedeiras comerciais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 327–331, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-95961999000600009>

McDowel, L. R. **Copper and molybdenum - minerals in animal and human nutrition**. Academy Press Inc. San Diego - Califórnia, p. 178-204, 1992.

MIROSHNIKOV, S.A.; YAUSHEVA, E.V.; SIZOVA, E.A.; MIROSHNIKOVA, E.P. Comparative assessment of effect of copper Nano and microparticles in chicken. **Oriental Journal of Chemistry** 31, 2327–2336, 2015.

National Research Council - NRC. Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp Washington: DC. **National Academies Press**, 376p,2011.

OGNIK, K.; STEPNIOWSKA, A; CHOLEWINSKA, E.; KOZLOWSKI, K. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in their drinking water on the immune and antioxidant status of the blood. **Animal Science Journal**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 579–588, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.12956>

OLGUN, O.; YILDIZ, A.; ŞENTÜRK E.T. The Effect of Supplementation of Organic Copper to Commercial Quail Diets on Performance, Egg Quality and Haematological Parameters. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, 8(7): 1517-1521, 2020.

OLIVEIRA, S. C. M. de. Suplementação de diferentes fontes e níveis de cobre e seus efeitos para frangos de corte. [s. l.], 2016.

ORTOLANI, E.L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**, p.641-651. 2002.

PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, W. P. De; MUNIZ, J. C. L. Panorama Da Coturnicultura No Brasil. **Revista Eletrônica Nutritime**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 2041–2049, 2012.

PINTO, A. M. T.P.; BOEIRA, A. C. S.; LISBOA, M. T.; MEDINA, A. L.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A. Development of an analytical method for the determination of metals in chicken breast by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 2395–2403, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190151>

POUPOULIS, C.; JENSEN, L.S. Effect of high dietary copper on gizzard integrity of the chick. **Poultry Science** 55: 113-121, 1976.

RAJE, K.; OJHA, S.; MISHRA, A.; MUNDE, V. K.; CHANDRAKANTA, R.; CHAUDHARY, S. K. Impact of supplementation of mineral nano particles on growth performance and health status of animals: A review. ~ 1690 ~ **Journal of Entomology and Zoology Studies**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 1690–1694, 2018.

REIS, J. S. Características da carcaça de uma linhagem de codornas de corte. 88f **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2011.

REIS, L. F. S. D. **Codornizes, criação e exploração**. Lisboa: Agros, 10, p.222, 1980.

RICHARDS, J. D.; ZHAO, J.; HARRELL, R. J.; ATWELL, C. A.; DIBNER, J. Trace mineral nutrition in poultry and swine. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1527–1534, 2010. Disponível em:

<https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.07>

ROSA, D. E. & MATTIOLI, G. A. Metabolismo y deficiencia de Cu en bovinos. **Analecta veterinária**. La Plata, v. 22, p.7-16, 2002.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I.; DONZELE, J. L.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G.; SARAIVA, A.; TEIXEIRA, M. L.; RODRIGUES, P. B.; OLIVEIRA, R. F.; BARRETO, S. L. T.; BRITO, C. O. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. 4.ed. Viçosa, Editora UFV 488 p, 2017.

SAMANTA B.; GHOSH P. R.; BISWAS A.; DAS S. K. The Effects of Copper Supplementation on the Performance and Hematological Parameters of Broiler Chickens. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences** 24, 1001–1006, 2011.

SANTOS, É. C. dos, TEIXEIRA, A. S., FREITAS, R. T. F. de, RODRIGUES, P. B. DIAS, E. S., MURGAS, L. D. S. Uso de aditivos promotores de crescimento sobre o desempenho, características de carcaça e bactérias totais do intestino de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 223–231, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-70542005000100028>

SCOTT, A.; VADALASETTY, K. P.; CHWALIBOG, A.; SAWOSZ, E. Copper nanoparticles as an alternative feed additive in poultry diet: A review. **Nanotechnology Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 69–93, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2017-0159>

SCOTT, A.; VADALASETTY, K.; ŁUKASIEWICZ, M.; JAWORSKI, S.; WIERZBICKI, M.; CHWALIBOG, A.; SAWOSZ, E. Effect of different levels of copper nanoparticles and copper sulphate on performance, metabolism and blood biochemical profiles in broiler chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 102: 364-373, 2018b.

SHARMA, D.; KOCHAR, B.; BHARDWAJ, A.; RIYAT, M.; SHARMA, P. Effect of ingestion of copper bhasm on red cell indices, iron parameters and essential elements in chicks. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** 24, 245–249, 2009.

SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. Tabela para codornas japonesas e europeias. 2ª ed., **Ed. FUNEP**, Jaboticabal, SP, p. 84-87, 2009.

SILVA, R. G. Caracterização e utilização de minerais orgânicos na avicultura. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SILVA, S. N. da; ALVES, D. A.; GOMES, B. C. K.; LOPES, D. C. N.; ROLL, V. F. B.; XAVIER, E. G. Archivos de Zootecnia. **Archivos de Zootecnia**, [s. l.], v. 68, n. 264, p. 594–601, 2019.

SILVEIRA, A. P., OTUTUMI, L. K., DOURADO, M. R., PASCHOAL, E. C., AMARAL, P. F. G. P. do, MICHELIN, A. C., SOARES, A. A. JÚNIOR, J. P. COBRE E SEU USO NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus*) REVISÃO DE LITERATURA. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**

da UNIPAR, [s. l.], v. 20, n. 1, 2017. Disponível em:
<https://doi.org/10.25110/arqvet.v20i1.2017.6318>

SUTTLE, N. F. **Mineral Nutrition of Livestock, 4th Edition**. [S. l.: s. n.], 2010.

VAN KAMPEN, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 538–544, 1961. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(61\)90145-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(61)90145-0)

YANG, W. WANG, J. ZHU, X. GAO, Y. LIU, Z. ZHANG, L. CHEN, H. SHI, X. YANG, L. LIU, G. High lever dietary copper promote ghrelin gene expression in the fundic gland of growing pigs. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 150, n. 1–3, p. 154–157, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9477-7>

ZABOLI, K.; ALIARABI, H.; BAHARI, A. A.; ABBASALIPOURKABIR, R. Role of dietary nano-zinc oxide on growth performance and blood levels of mineral: A study on in Iranian Angora (Markhoz) goat kids. **Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 2013;2(1),19-26.**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 19–26, 2013.

ZEN, S.; IGUMA, M. D.; ORTELAN, C. B.; SANTOS, V. H. S. dos; FELLI, C. B. Evolução da avicultura no Brasil Mercado internacional. **Informativo Cepea**, [s. l.], p. 1–3, 2015. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br

ZHAO, C. Y.; TAN, S. X.; XIAO, X. Y.; QIU, X. S.; PAN, J. Q.; TANG, Z. X. Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 361–367, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0052-2>