

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Angélica Londero

**MICROMINERAIS ORGÂNICOS, CÁLCIO QUELATADO OU DE  
ALGA SOBRE O DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVO, INCUBAÇÃO  
E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM REPRODUTORES AVÍCOLAS**

**TESE DE DOUTORADO**

Santa Maria – RS  
2019

**Angélica Londero**

**MICROMINERAIS ORGÂNICOS, CÁLCIO QUELATADO OU DE ALGA SOBRE O  
DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVO, INCUBAÇÃO E QUALIDADE  
ESPERMÁTICA EM REPRODUTORES AVÍCOLAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Avicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pires Rosa

Santa Maria, RS  
2019

Londero, Angélica

MICROMINERAIS ORGÂNICOS, CÁLCIO QUELATADO OU DE ALGA  
SOBRE O DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVO, INCUBAÇÃO E  
QUALIDADE ESPERMÁTICA EM REPRODUTORES AVÍCOLAS /  
Angélica Londero.- 2019.

98 p.; 30 cm

Orientador: Alexandre Pires Rosa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Zootecnia, RS, 2019

1. Microminerais orgânicos 2. Cálcio aminoácido  
quelatado 3. Cálcio de alga Lithothamnium calcareum 4.  
Poedeiras Plymouth Rock White e machos Rhodes Island  
Red I. Pires Rosa, Alexandre II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

©2019

Todos os direitos autorais reservados a Angélica Londero. A reprodução de partes ou de todo o conteúdo desse trabalho só poderá ser realizado mediante citação da fonte.

E-mail: vetelondero@hotmail.com

---

**Angélica Londero**

**MICROMINERAIS ORGÂNICOS, CÁLCIO QUELATADO OU DE ALGA SOBRE O  
DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVO, INCUBAÇÃO E QUALIDADE  
ESPERMÁTICA EM REPRODUTORES AVÍCOLAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Avicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia**.

**Aprovado em 25 de Fevereiro de 2019:**

---

**Alexandre Pires Rosa, Dr.** (UFSM) - Videoconferência  
(Orientador)

---

**Catarina Stefanello, Dr** (UFSM)  
(Presidente)

---

**Fabiana Luiggi, Dr.** (YES) - Videoconferência

---

**Berilo de Souza Brum Junior, Dr.** (IFFar)

---

**Janio Morais Santurio, Dr.** (UFSM)

Santa Maria, RS  
2019

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela minha saúde, pela minha coragem e por ter me dado todas as oportunidades boas que a vida pode nos oferecer.

A minha família, meus pais em especial, que me proporcionaram tudo de melhor que podiam me dar, me bancaram nos meus momentos de escassez e me deram amor e apoio independente de qualquer atitude e decisão tomada. AMO VOCÊS!

Ao meu marido Douglas, por me proporcionar amor, felicidade, carinho e compreensão. Por ser um companheiro para todas as horas, por acreditar em mim e no meu potencial. Por ter me proporcionado ter esse “cargo” que tem tanto peso que é ser MÃE. TE AMO!

A minha filha Bibiana, me faltam palavras para descrever o que é ter você. Obrigada por me escolher como mãe. Obrigada por dar sentido a minha vida. Obrigada por vir no momento que eu não esperava receber tanta benção em minha vida. Obrigada pelo seu sorriso em cada manhã. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor. Mamãe AMA MUITO VOCÊ!

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Pires Rosa, por estar no meu lado durante tantos anos, por acreditar em mim e me proporcionar crescer e ser uma pessoa melhor.

Ao Laboratório de Avicultura, por ser este novo “lar” que os alunos encontram durante sua caminhada, por ser esta família que nos acolhe quando estamos longe de casa. A funcionária Bernadete Brites, por se dedicar a nos ajudar, por ser esta mãe nas horas difíceis. Aos colegas que dedicaram seu tempo para ajudar na realização deste trabalho. Aos que foram além de colegas, amigos da sala da pós que levarei para vida toda. Aos estagiários, sem eles simplesmente nada aconteceria. Mesmo cansados, com provas nunca se recusaram em me ajudar.

A UFSM, por me acolher por tantos anos. Daqui saio cheia de lembranças boas, cheia de orgulho por ter feito parte desta instituição de excelência.

A CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o período de realização desta Tese.

Aos animais, principalmente as aves, através de suas vidas agregamos nossos conhecimentos, conseguimos realizar a pesquisa e encontrar resultados para melhorar a produção animal.

Muito Obrigado!

## RESUMO

### MICROMINERAIS ORGÂNICOS, CÁLCIO QUELATADO OU DE ALGA SOBRE O DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVO, INCUBAÇÃO E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM MATRIZES DE POEDEIRAS

AUTOR: Angélica Londero  
ORIENTADOR: Alexandre Pires Rosa

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de microminerais orgânicos (MMO) adicionados a minerais inorgânicos e cálcio aminoácido quelatado ou cálcio de alga (*Lithothamnium calcareum*) sobre o desempenho, qualidade de ovos, incubação e qualidade espermática em reprodutores avícolas. Foram realizados dois estudos, descritos nos capítulos II e II. Em ambos os experimentos, as fêmeas foram inseminadas artificialmente uma vez por semana com sêmen de machos submetidos à mesma dieta e os dados coletados foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey. No capítulo II: SUPLEMENTAÇÃO DE MINERAIS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS SOBRE O DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVOS, INCUBAÇÃO E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE MATRIZES DE POEDEIRAS, foram utilizadas 144 fêmeas *White Plymouth Rock* e 36 machos *Red Rhodes Island* de 36 a 55 semanas de idade distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições de 6 fêmeas e 12 repetições de 1 macho cada. Os tratamentos avaliados foram: DB - dieta basal contendo apenas mineral inorgânico na dieta (10 mg Cu, 60 mg Fe, 70 mg Mn, 75 mg Zn e 0,3 mg Se por kg de dieta), DB+500gMMO - dieta basal + 500g de mineral orgânico por tonelada de dieta (2,5 mg Cu, 17,5 mg Fe, 20 mg Mn, 27,5 mg Zn e 0,08 mg Se por kg de ração) e BD+800gMMO - dieta basal + 800g de mineral orgânico por tonelada de ração (4 mg de Cu, 28 mg de Fe, 32 mg de Mn, 44 mg de Zn e 0,128 mg de Se por kg de ração). Nas semanas 43, 44, 45 e 49 as produções de ovos foi maior no tratamento DB+800gOMM que no BD. O índice de gema foi melhor nos ovos das galinhas alimentadas com o tratamento BD do que o BD+800gMMO. O vigor espermático nos machos alimentados com o tratamento BD+800gOMM foi maior que o BD. A fertilidade foi maior nos ovos das fêmeas alimentadas com o tratamento BD+500gMMO do que a DB. No capítulo II: SUPLEMENTAÇÃO DE MICRO MINERAIS ORGÂNICOS E CÁLCIO AMINOÁCIDOS QUELADO OU DE ALGA (*Lithothamnium calcareum*) SOBRE AS CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS E REPRODUTIVAS DE MATRIZES DE POEDEIRAS, foram utilizados 192 fêmeas *White Plymouth Rock* e 48 machos *Red Rhodes Island* de 36 a 55 semanas de idade distribuídos aleatoriamente em arranjo fatorial (2 × 2) totalizando 8 repetições de 6 fêmeas e 12 repetições de 1 macho cada. De uma dieta basal contendo minerais inorgânicos foram elaboradas 4 dietas contendo 2 níveis de minerais orgânicos: 500MMO - 500g de minerais orgânicos por tonelada de dieta (2,5 mg Cu, 17,5 mg Fe, 20 mg Mn, 27,5 mg Zn e 0,08 mg Se por kg de dieta) e 800MMO - 800g de minerais orgânicos por tonelada de dieta (4 mg Cu, 28 mg Fe, 32 mg Mn, 44 mg Zn e 0,128 mg Se por kg de ração) e 2 tipos de cálcio: cálcio aminoácido quelatado (CaCh) – 0,155 g/kg e cálcio de alga *Lithothamnium calcareum* (LCa) – 1,6 g/kg de dieta. A porcentagem de gema e casca de ovo, gravidade específica e espessura da casca foram maiores nos ovos de aves alimentadas com CaCh na dieta. Um aumento no albumem foi observado nos ovos das aves alimentadas com LCa. O volume de espermatozóides foi maior nos machos alimentados com 500MMO. Motilidade e vigor espermático foram maiores em machos alimentados com CaCh nas dietas. Os parâmetros de incubação não foram afetados pelos tratamentos. Em conclusão, a adição de minerais orgânicos na dieta trouxe efeitos positivos com o aumento da produção de ovos, fertilidade e vigor dos espermatozóides dos machos. O cálcio aminoácido quelato teve efeitos positivos na qualidade dos ovos, motilidade e vigor dos espermatozóides.

**Palavras – Chave:** Eclosão. Espermatozóides. Machos reprodutores. Produção de ovos.

## ABSTRACT

### ORGANIC MICRO MINERALS, CALCIUM CHELATED OR SEAWEED ON PERFORMANCE, EGG QUALITY, HATCHING AND SPERMATIC QUALITY OF LAYING BREEDER HENS

AUTHOR: Angélica Londero  
ADVISOR: Alexandre Pires Rosa

The objective of this study was evaluate the effect of the effects of the supplementation of organic micro minerals (OMM) added to inorganic minerals and calcium amino acid chelated or marine calcium calcium (*Lithothamnium calcareum*) on the performance, egg quality, incubation and sperm quality of poultry breeding. Two studies were performed, described in Chapters II and III. In both experiments, females were artificially inseminated once a week with semen from males submitted to the same diet and the data were submitted to ANOVA and Tukey's test. In chapter II: SUPPLEMENTATION OF ORGANIC MINERALS AND INORGANIC ON THE PERFORMANCE, EGG AND SPERM QUALITY AND, HATCHING CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS, there were used 144 White Plymouth Rock females and 36 Red Rhodes Island males at 36 to 55 weeks of age in the experimental design completely randomized, with 8 replicates with 6 hens and 12 replicates with 1 male each. The treatments evaluated were: DB - basal diet containing only inorganic mineral (10mg Cu, 60mg Fe, 70mg Mn, 75mg Zn and 0,3mg Se per kg of diet), BD + 500gOMM - basal diet plus 500g of organic mineral by ton of diet (2.5mg Cu, 17.5mg Fe, 20mg Mn, 27.5mg Zn and 0.08mg Se by kg of diet) and BD + 800gOMM - basal diet plus 800g of organic mineral per ton of diet (4mg Cu, 28mg Fe, 32mg Mn, 44mg Zn and 0.128mg Se per kg of diet). In the weeks 43, 44, 45 and 49 the eggs production was higher in treatment BD+800gOMM than BD. The yolk index was better in eggs from hens fed with treatment BD than BD+800gOMM. The sperm vigor in the males fed with treatment BD+800gOMM was higher than BD. The fertility was higher in eggs from hens fed with treatment BD+500gOMM than BD. In chapter III: SUPPLEMENTATION OF ORGANIC MICRO MINERALS AND CALCIUM OF AMINO ACID CHELATED OR MARINE CALCIUM (*Lithothamnium calcareum*) ON THE PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS, there were used 192 Plymouth Rock White females and 48 Rhodes Island Red males at 36 to 55 weeks of age in the randomly distributed in a factorial arrangement (2 × 2) totaling 8 replicates with 6 hens and 12 replicates with 1 male each. From a basal diet containing inorganic minerals were made 4 diets of 2 levels of organic trace minerals: 500OMM - 500g of the organic minerals by ton of diet (2.5 mg Cu, 17.5mg Fe, 20mg Mn, 27.5mg Zn and 0.08mg Se per kg of diet) and 800OMM - 800g of the organic minerals by ton of diet (4mg Cu, 28mg Fe, 32mg Mn, 44mg Zn and 0.128mg Se per kg of diet) and 2 types of calcium: calcium amino acid chelated (CaCh) – 0.155g/kg and calcium from *Lithothamnium calcareum* (LCa) algae – 1.6g/kg of diet. An increase in the yolk, eggshell, specific gravity and shell thickness were observed in eggs from hens fed with Cah. An increase in the albumen was observed in eggs from hens fed LCa. Sperm volume was higher in males fed with 500OMM. Motility and sperm vigor were improved in males fed with CaCh on diets. Incubation parameters were not affected by treatments. In conclusion, the addition of organic minerals in the diet brought positive effects with increased egg production, fertility and vigor of sperm from males. The calcium amino acid chelated has positive effects on quality of egg, motility and sperm vigor.

**Keywords:** Hatching. Spermatozoa. Breeder males. Egg production.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

#### **SUPPLEMENTATION OF ORGANIC AND INORGANIC MINERALS ON THE PERFORMANCE, EGG AND SPERM QUALITY AND, HATCHING CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS**

Tabela 1 - Composition of the diet and nutritional levels used .....	54
Tabela 2 - Egg production of hens submitted to the different treatments .....	55
Tabela 3 - Parameters on eggs quality from hens from 36 to 55 weeks of age.....	56
Tabela 4- Sperm quality of males analyzed during the experimental period (36 to 55 weeks of age).....	57
Tabela 5- Reproductive responses (%) evaluated during the experimental period by laying breeders hens from 36 to 55 weeks of age.....	58

### CAPÍTULO III

#### **SUPPLEMENTATION OF ORGANIC MICRO MINERALS AND CALCIUM AMINO ACID CHELATED OR MARINE CALCIUM (*Lithothamnium calcareu*) ON THE PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS**

Tabela 1 - Composition of the diet and nutritional levels used .....	84
Tabela 2 - Reproductive performance of hens submitted to the different treatments.....	85
Tabela 3 - Eggs quality from hens from 36 to 55 weeks of age .....	86
Tabela 4- Sperm quality evaluated during the experimental period by males of laying breeders hens from 36 to 55 weeks of age .....	87
Tabela 5- Reproductive responses (%) evaluated during the experimental period by laying breeders hens from 36 to 55 weeks of age.....	88



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1	IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NA NUTRIÇÃO .....	12
2.2	MINERAIS INORGÂNICOS .....	13
2.3	MINERAIS ORGÂNICOS OU QUELATADOS .....	15
2.4	MINERAIS ORGÂNICOS NA AVICULTURA .....	18
<b>2.4.1</b>	<b>Selênio (Se).....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Ferro (Fe).....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Cobre (Cu).....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Zinco (Zn).....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Manganês (Mn).....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Cálcio (Ca).....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Cálcio de alga.....</b>	<b>24</b>
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	27
3.1	HIPÓTESES.....	27
3.2	OBJETIVOS .....	27
<b>3.2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
4	CAPÍTULO II - SUPLEMENTAÇÃO DE MINERAIS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS SOBRE O DESEMPENHO, QUALIDADE DE OVOS, INCUBAÇÃO E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE MATRIZES DE POEDEIRAS.....	29
5	CAPÍTULO III - SUPPLEMENTATION OF ORGANIC MICRO MINERALS AND CALCIUM OF AMINO ACID CHELATED OR MARINE CALCIUM ( <i>Lithothamnium calcareum</i> ) ON THE PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS .....	59
6	DISCUSSÃO .....	89
7	CONCLUSÕES .....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

## 1 INTRODUÇÃO

Buscando a mais alta produtividade, nos programas nutricionais de aves, as dietas são balanceadas através de um ajuste entre a oferta de nutrientes dos ingredientes e as exigências nutricionais. Uma das mais importantes limitações nutricionais para as aves é a deficiência de minerais, uma vez que as matérias primas (milho e farelo de soja), utilizadas na fabricação das dietas, geralmente, não atendem completamente as exigências desses animais. Um aporte inadequado de minerais pode comprometer o desempenho das aves, qualidade da casca dos ovos e desempenho da progênie (SECHINATO et al., 2006).

De maneira geral, os minerais participam de funções variadas no organismo, estando divididos em duas categorias: macro e microminerais. Os macros elementos como cálcio e fósforo constituem a base da formação esquelética, enquanto que sódio, cloro e potássio, estão distribuídos em maiores concentrações nos tecidos moles, controlando o equilíbrio ácido-básico orgânico (BERTECHINI, 2006). Os micros elementos ou minerais traços como manganês (Mn), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), iodo (I) e selênio (Se) estão presentes em menores quantidades nas dietas de aves e por isso são chamados de microminerais, mas são igualmente essenciais para os animais e participam principalmente como agentes catalíticos em todas as reações do metabolismo (ARAÚJO, et al., 2008).

A maioria das fontes minerais utilizadas em dietas para aves são derivadas de compostos inorgânicos. Contudo, pesquisas com fontes minerais orgânicas surgiram no mercado com a perspectiva de serem mais facilmente absorvidas pelas aves (ZAMANI et al., 2005). Fontes orgânicas ou quelatos metálicos têm sido utilizadas com o objetivo de potencializar a biodisponibilidade de micro minerais, ligando minerais a moléculas orgânicas, permitindo a formação de estruturas com estabilidade única (AAFCO, 2005). Tais estruturas orgânicas são estáveis no trato digestivo e, preferencialmente absorvidas porque são protegidas da formação de complexos com outros componentes da dieta (AMMERMAN, 1998). Na forma orgânica, os minerais são absorvidos pelos carreadores intestinais de aminoácidos e peptídeos e não por transportadores intestinais clássicos de minerais. Isto evita a competição entre minerais pelos mesmos mecanismos de absorção (MABE, 2001).

Os microminerais são essenciais nas dietas das aves porque participam dos processos bioquímicos necessários para o crescimento e manutenção do desenvolvimento normal, incluindo formação de ossos, cascas de ovos, desenvolvimento embrionário aviário (RICHARDS, 1997) e qualidade do sêmen (BARBER et al., 2005). Paik (2001) avaliou as fontes orgânicas de Zn, Cu e Mn em dietas de poedeiras e observou melhora na gravidade

específica e porcentagem de ovos em poedeiras alimentadas com minerais orgânicos. Shan et al. (2017) avaliaram o efeito de minerais inorgânicos e orgânicos (Zn, Mn, Cu, Fe e Se) em dietas de machos de matrizes de corte e observaram um aumento significativo nos parâmetros de qualidade de sêmen, como volume e densidade, naqueles alimentados com minerais orgânicos de 31 a 35 semanas.

Geralmente, as fontes de cálcio utilizadas na alimentação animal são oriundas de rochas, como o calcário e o fosfato bicálcico, pois, são mais abundantes e de menor custo (MELO e MOURA, 2009). O conhecimento de novas alternativas que não sejam derivadas de rochas, que possam apresentar maior biodisponibilidade e que possam ser substituídas ou usadas em associação na dieta é essencial na busca por menores custos na ração, fontes renováveis e maior desempenho das aves. Assim, o cálcio aminoácido quelatado e o cálcio de algas vêm sendo estudados como alternativas promissoras.

A solubilidade das fontes de cálcio é um fator indicativo na qualidade, já que apresenta alta correlação com a biodisponibilidade e absorção intestinal (MELO e MOURA, 2009). Nesse sentido, fontes quelatadas ou orgânicas, como é o caso do cálcio aminoácido quelatado, têm sido utilizadas devido a sua maior biodisponibilidade. Além deste, o uso de cálcio de algas esta sendo pesquisado por apresentar vantagens pela alta disponibilidade dos nutrientes adsorvidos nas paredes celulares, facilitando sua assimilação aos animais e melhorando a absorção de cálcio e alta porosidade, o que leva ao aumento da área superficial específica (ASSOUMANI, 1997).

Os estudos relacionados ao efeito da utilização de minerais inorgânicos e orgânicos e cálcio em dietas de reprodutores avícolas são inconsistentes e controversos sendo que, no caso de variáveis de qualidade espermática são poucas as informações encontradas. Os objetivos deste estudo foram, portanto, avaliar o uso *on top* de microminerais orgânicos aminoácidos quelatados (cobre, ferro, manganês e zinco) e um metal proteinato na forma de selênio levedura em adição aos minerais inorgânicos e o uso de cálcio aminoácido quelatado ou cálcio de alga (*Lithothamnium calcareum*), em dietas de reprodutores de poedeiras, machos e fêmeas, sobre o desempenho zootécnico, qualidade de ovos, parâmetros de incubação e qualidade espermática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 IMPORTÂNCIA DOS MINERAIS NA NUTRIÇÃO

O termo mineral refere-se a elementos químicos inorgânicos, encontrados em todos os animais e plantas, em proporções variáveis, sendo participantes ativos de várias enzimas e constituintes estruturais de órgãos e tecidos (TEIXEIRA, 2001).

Os minerais são classificados academicamente em macro minerais e microminerais ou elementos traços. Esta classificação está relacionada com as concentrações dos elementos nos tecidos, que de certa forma, indicam as suas necessidades orgânicas (BERTECHINI, 2006), Segundo Bondi, (1987) macro minerais, tais como: cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre apresentam necessidades no organismo superiores a 70mg/kg de peso vivo do animal, sendo expressos em porcentagem. Já os microminerais, como: zinco, iodo, ferro, cobalto, cobre, selênio e manganês apresentam necessidades inferiores pelo organismo animal e são mais difíceis de serem avaliados através de análise devido as suas baixas concentrações nos tecidos.

A maioria dos macro e microminerais e as suas funções biológicas começaram a ser estudadas nas primeiras décadas do século XX. Os primeiros estudos sobre fontes de minerais para rações datam da década de 50, em que se iniciou a suplementação mineral para resolver problemas ósseos e de desempenho das aves. A importância da suplementação mineral aumentou nos últimos anos devido, principalmente, ao melhoramento genético, à alta produção de ovos e à intensificação do sistema de produção avícola (BERTECHINI, 2006). Com isso, a suplementação mineral tornou-se uma prática necessária para atender às exigências das aves, garantindo seu desenvolvimento e melhorando a produtividade (ARAÚJO et al., 2008; NYS et al., 2003).

Outro fator que contribui para a utilização da suplementação mineral é o fato de que as principais matérias-primas utilizadas na fabricação das dietas (milho e farelo de soja) não atendem às exigências dos animais. O conteúdo mineral destas matérias-primas também é variável por ser dependente de fatores como solo, clima, espécie explorada e sua maturidade (ARAÚJO et al., 2008).

Os minerais estão presentes em inúmeros processos bioquímicos, sua função principal e de agir como catalizadores nos sistemas enzimáticos e hormonais. São essenciais ao crescimento, desenvolvimento, reprodução, produção, formação óssea, empenamento e apetite. Também estão presentes nos órgãos, tecidos do corpo e são constituintes de fluidos na

forma de eletrólitos. Boa parte dos microminerais encontra-se envolvida de forma direta ou indireta nessas funções (MACARI e LUQUETTI, 2002).

No que diz respeito à dieta, deve-se considerar a importância dos minerais, principalmente aqueles necessários para a produção espermática e desenvolvimento testicular, em especial a importância dos microminerais como cobre, cromo, manganês, iodo, selênio, zinco e ferro, cuja suplementação leva ao aumento do volume do ejaculado e redução dos efeitos estressantes aos quais os animais são submetidos (MAHAN et al., 2002). Além disso, vários estudos demonstram que uma séria deficiência de um mineral provoca más formações e mortalidade embrionária (MACARI e MENDES, 2005).

As fontes minerais utilizadas nas rações de poedeiras são oriundas de compostos inorgânicos ou orgânicos. Estes compostos são, comumente, utilizados na sua forma natural ou através de misturas minerais (premix), a fim de suplementar os minerais deficientes nos ingredientes. A escolha de um suplemento ou fonte de mineral a ser utilizada em uma dieta depende, principalmente, das formas químicas em que os elementos são combinados, do custo por unidade dos elementos requeridos e da garantia de ausência de substâncias tóxicas para os animais (ARAUJO et al., 2008).

## 2.2 MINERAIS INORGÂNICOS

O fornecimento de microminerais em rações para aves é normalmente feito com fontes inorgânicas (óxidos, sulfatos, cloretos, carbonatos e fosfatos) de origem geológica ou industrial. As moléculas se dissociam liberando íons metálicos, como  $Zn^{++}$ ,  $Mn^{++}$  e outros. Estes minerais são geralmente ionizados no estômago e absorvidos no intestino delgado, mais especificamente no duodeno, onde o pH ácido determina a solubilidade. Após a absorção, são ligados às proteínas e incorporados pela membrana das células da mucosa intestinal (ASHMEAD, 1993a). O transporte para o interior das células ocorre por um mecanismo de difusão passiva ou também pelo transporte ativo. Estando na forma iônica os minerais podem se complexar com outros componentes da dieta, dificultando a absorção ou tornando-os indisponíveis aos animais (ARAUJO et al., 2008). Nessas condições podem ocorrer perdas pela reação com compostos, como colóides insolúveis, ou no processo de competição pelos sítios de absorção entre os elementos minerais, com as interações antagônicas que inibem a absorção (HERRICK, 1993).

A taxa de absorção dos minerais na forma de sais é normalmente baixa, levando a super suplementação para obter níveis adequados de absorção. Neste sentido, uma grande

parte do mineral é excretada no ambiente. Dois problemas podem ser referenciados neste caso. O primeiro é que as reservas dos minerais são finitas e podem se esgotar rapidamente, como é o caso das fontes de Se e Zn, principalmente. O outro se refere à contaminação ambiental. Os lençóis freáticos recebem grandes quantidades, principalmente dos microminerais, tornando essas águas subterrâneas impróprias para o consumo humano e animal (SAKOMURA et al., 2014).

A quantidade final de nutrientes emitidos no ambiente depende da eficiência de utilização de nutrientes pelos animais e da quantidade de nutrientes nas dietas. O excesso de nutrientes nas dietas associado à em baixa taxa de aproveitamento pelo animal, provoca poluição ambiental, causada pelo excesso de excreção (LEESON, 2003). A excreção de microminerais já é preocupante em algumas regiões brasileiras, onde existe maior concentração de aves e suínos, podendo ocorrer a contaminação potencial do solo e do lençol freático (BRITO, 2005).

Excrementos de aves contêm níveis significativos de N, Ca, P, Cu, Mn e Zn, que contribuem para a poluição ambiental, particularmente da água fontes (PATERSON, 2002). Segundo Ferket et al., (2002), a quantidade de nutrientes emitidos pelos animais de produção para o ambiente pode ser modulada por várias estratégias nutricionais diferentes, mas a sua aplicação prática é dependente de custos e limitações biológicas. Em geral, a excreção de nutrientes pode ser reduzida evitando a superalimentação de nutrientes específicos ou usando manipulações nutricionais para aumentar a utilização de nutrientes no animal. A perda para o meio ambiente pode ser evitada fabricando e manuseando a ração de forma peletizada, minimizando o desperdício e melhorando o avanço / ganho. Outras estratégias para minimizar as perdas de nutrientes incluem: 1) o desenvolvimento de programas de alimentação específicos para o sexo e a estirpe do animal; 2) aumentar o número de fases de alimentação para melhor atender aos requisitos relacionados à idade do animal; 3) formulação de dietas para incluir as quantidades mínimas de nutrientes necessárias para satisfazer as metas de produção; 4) atender aos requisitos de aminoácidos do animal; 5) usar suplementos de aminoácidos sintéticos para alimentar a redução da emissão de N; 6) utilizar ingredientes da ração com alta digestibilidade e biodisponibilidade de nutrientes; e 7) formulação de dietas baseadas na disponibilidade de nutrientes em vez do teor total de nutrientes. A digestibilidade dos nutrientes dos alimentos depende das condições de processamento, características genéticas dos grãos e sementes oleaginosas e da presença de antagonistas nutricionais em alimentos específicos utilizados na dieta. Finalmente, um fator de custo para o controle ou descarte de nutrientes deve ser considerado na formulação de rações para otimizar as várias

estratégias nutricionais discutidas acima. Independentemente das limitações biológicas e econômicas, reduções significativas na emissão de nutrientes de não ruminantes podem ser alcançadas por estratégias nutricionais apropriadas (Ferket et al., 2002).

Quando os microminerais Fe, Cu, Mn, Zn, I e Se, são adicionados a dieta próximos às concentrações requeridas, as concentrações excretadas são menores e não apresentam preocupação ambiental. Alguns minerais como Cu e Zn estão incluídos na dieta em concentrações bem acima das necessidades da ave por possuírem propriedades como bacteriostáticos, bactericidas ou antifúngicos, ou ambos, (Pesti e Bakalli, 1996). Os aspectos positivos do excesso de suplementação de Zn e Cu não parece terem efeitos ambientais diretos, mas são potencialmente fitotóxicos (Alva et al., 2000) e diminuem a fitase e retenção de P (Banks et al., 2004). O risco ambiental desses metais pesados é em grande parte dependente da capacidade do solo de adsorver e dessorver esses elementos e o potencial de lixiviação ou perda de solo para a água pela erosão (Powers e Angel, 2008).

Nos últimos anos, têm sido aplicados, na prática, níveis muito altos de microminerais, o que vem sendo atribuído a margens de segurança. As recomendações do NRC (1994) para a maioria dos microminerais é negligenciada, tendo como desculpa o grande avanço genético das aves industriais modernas. Neste sentido, também se considera que as fontes não possuem boa disponibilidade para serem utilizadas como fontes de minerais para as dietas das aves. Existe tendência de redução dos microminerais na forma de sais e aumento do uso de fontes orgânicas para incrementar as taxas de absorção e redução dos níveis de suplementação dietética (SAKOMURA et al., 2014).

A escolha entre a utilização de minerais orgânicos ou minerais na forma de sais na nutrição das aves respalda-se na avaliação econômica. Sabe-se que os minerais quelatados possuem maior preço de aquisição no mercado, resultando em maior custo com a dieta em relação às fontes minerais usadas tradicionalmente. Porém, os minerais orgânicos se apresentam mais biodisponíveis, o que leva a crer que a exigência nutricional das aves pode ser atendida com menor quantidade de minerais na dieta, além de possibilitar maior produção, elevando, também, a receita obtida com o sistema (SOUSA et al., 2016).

### 2.3 MINERAIS ORGÂNICOS OU QUELATADOS

A maioria dos minerais orgânicos é classificada como complexos, quelatos ou proteínatos. A "*Association of American Feed Control Officials*" – AAFCO (2000) definiu os seguintes tipos básicos de microminerais orgânicos: Complexo de aminoácidos específicos de

metal, resultante da complexação de um sal de metal solúvel com um aminoácido específico; Complexo de aminoácidos metálicos, resultante da complexação de um sal de metal solúvel com aminoácidos; Quelato de aminoácidos metálicos, resultante da reação de um íon metálico a partir de um sal solúvel com aminoácidos em uma relação molar de 1 mol do metal a 1 - 3 (preferencialmente 2) moles de aminoácidos, que formam ligações coordenadas (peso molecular do quelato hidrolisado deve exceder 800 Daltons); Metal proteínato, resultante da quelação de um sal solúvel com aminoácidos e / ou proteína parcialmente solubilizada; Mineral complexado com polissacarídeo, resultante da complexação de um sal solúvel com uma solução de polissacarídeos declarados como parte integrante de um complexo específico.

Quelatos são misturas de elementos minerais ligados a algum tipo de carreador, tais como aminoácido, polissacarídeo ou proteínas, em uma estrutura cíclica ou em anel, na qual um átomo de metal di ou multivalente é preso através de duas ou mais ligações covalentes formando um complexo coordenado (SANTOS, 1998). Um complexo de metal é composto por um íon metálico central e os seus ligantes. O termo complexo pode ser utilizado para descrever produtos formados pela reação de um íon metálico com uma molécula ou íon que contenha um átomo que possua um único par de elétrons. Nos complexos, os ligantes ligam-se ao átomo metálico central por apenas um ponto, ou seja, uma única ligação. O outro tipo de mineral orgânico existente são os quelatos ou quelatos de metal, que se formam quando um cátion metálico liga-se a uma substância que possui dois ou mais grupos doadores de elétrons, formando uma ou mais estruturas em anel heterocíclico (RUTZ e MURPHY, 2009). Geralmente, os quelatos são quimicamente mais estáveis que os complexos nos quais o elemento mineral está preso por uma única ligação química (SANTOS, 1998).

O mecanismo pelo qual o agente quelante melhora a utilização do mineral depende da capacidade do ligante “sequestrar” o mineral, ou a sua maior habilidade em competir com outros ligantes no trato gastrintestinal, formando complexos solúveis com o mineral (KIEFER, 2005).

De acordo com Richards e Dibner (2005), a vantagem dos minerais orgânicos é conferir estabilidade ao complexo no trato gastrintestinal, assim, evitando a perda de mineral para antagonistas. Os minerais orgânicos devem resistir à dissociação no Inglúvio, proventrículo e moela, permitindo assim que o mineral seja oferecido ao epitélio absorptivo no intestino delgado. Sendo assim, as moléculas devem ser solubilizadas no lúmen intestinal, possibilitando que os metais ionizados possam ser transportados pelas proteínas carreadoras através da membrana celular dos enterócitos.



Quando um mineral é ingerido existe mais do que um mecanismo de transporte disponível para levá-lo do lúmen intestinal ao sangue. O sistema usado depende da forma que o mineral assume quando se apresenta à membrana celular da mucosa. Depois da ingestão o sal mineral é ionizado no pH ácido do estômago. Em pH médio para mais alto há numerosas reações químicas que podem precipitar o cátion metálico e, portanto, interferir em sua absorção. Se nenhuma delas ocorrer, o cátion livre é ligado a uma proteína transportadora localizada nas células da mucosa e transportado por difusão passiva ou por transporte ativo para dentro da célula. Enquanto a assimilação pode ocorrer em todo intestino delgado, é no pH relativamente baixo do duodeno, que um mineral mantém o maior grau de solubilidade e, ao mesmo tempo, o mais alto teor de absorção. A melhor absorção dos minerais orgânicos é devido à menor possibilidade de interações durante a digestão. Isto ocorre porque os minerais orgânicos são quimicamente inertes. Além disso, a presença de metal na sua estrutura torna-o resistente à ação das peptidases, que poderiam quebrar as ligações internas dos peptídeos, destruindo os quelatos (SANTOS, 1998).

Em aminoácidos quelatados, o elemento mineral metálico na molécula é quimicamente inerte devido à forma de ligação. Esta ligação é estável, não sofrendo dissociação das moléculas quando atingem o estômago (SPEARS, 1996). No jejuno o aminoácido do mineral quelatado age como agente transportador, permitindo a passagem do mineral através da parede intestinal para a corrente sanguínea. A separação do aminoácido quelante ocorre no local onde o elemento mineral metálico será utilizado (ASHMEAD, 1993b).

As substâncias capazes de exercer ação quelatante são numerosas, sendo representadas por ácidos inorgânicos bifásicos, ácidos orgânicos dicarboxílicos, diaminas, aminoácidos e peptídeos, etc.(MALETTTO, 1984). Do ponto de vista nutricional, apenas quelatos formados com aminoácidos ou dipeptídeos são interessantes. Não obstante, apenas quelatos com peso molecular total abaixo de 1500 são capazes de penetrar a membrana intestinal sem exigir hidrólise adicional no lume. Este aspecto é interessante, pois se estes quelatos não são hidrolisados, são capazes de contrabandear um mineral através do intestino, como parte de uma molécula de dipeptídeo (CRISTY, 1984).

O processo de quelatação envolve a ligação da porção amino livre do aminoácido com o elemento mineral di ou trivalente. Assim como ocorrem ligações entre as proteínas e outros nutrientes em algumas dietas submetidas a altas temperaturas, os quelatos podem ser obtidos por exposição de elementos minerais e aminoácidos a temperatura e vapor adequados. Outra forma de quelatação possível seria através de microrganismos, mais comumente fungos e

leveduras (SAAD, 2015). Segundo Lyons (1993) alguns microrganismos podem acumular minerais, tornando-os mais disponíveis. Este autor cita que o selênio encontrado em algumas leveduras se apresenta sob a forma de selênio - cisteína ou selênio - metionina, com alto grau de biodisponibilidade. Os principais minerais quelatados são: zinco, ferro, cobre, magnésio, manganês, cromo, selênio e cobalto.

Ammerman et al. (1995) definiram a biodisponibilidade de um nutriente como sendo a fração do nutriente ingerido que é absorvido, ficando disponível a ser utilizados pelo metabolismo do animal. (SANTOS, 1998). Desta forma, fatores físico-químicos que reduzem a absorção de minerais do lúmen intestinal influenciam a biodisponibilidade mineral (DREOSTI, 1993).

Existem muitos fatores que influenciam a biodisponibilidade dos minerais, especialmente dos microminerais, tais como: nível de consumo do mineral, forma química, digestibilidade da dieta, tamanho da partícula, interações com outros minerais e nutrientes, agentes quelantes, inibidores, estado fisiológico do animal, qualidade da água, condições de processamento, idade e espécie animal (MILES e HENRY, 2000). Em geral, a biodisponibilidade dos minerais na forma orgânica é dependente de três condições básicas na estrutura do composto, que são a forma de ligação com o metal, o peso molecular e a constante de estabilidade do quelato (SANTOS, 1998).

## 2.4 MINERAIS ORGÂNICOS NA AVICULTURA

Tradicionalmente, os nutricionistas têm buscado atender as exigências minerais das aves, a partir da suplementação com as formas inorgânicas (ARAÚJO et al., 2008). De acordo com Rossi et al. (2007) há um aumento do interesse em utilizar minerais orgânicos, porque muitos trabalhos têm demonstrado uma melhora significativa no ganho de peso das aves, nos dados reprodutivos, nos índices sanitários dos plantéis e sem dúvida na redução dos preços, fator este determinante para a utilização de qualquer insumo na alimentação animal

Segundo Pappas et al. (2006) os minerais orgânicos, apresentam maior biodisponibilidade quando incluídos em dietas, atendendo melhor os sistemas bioquímicos das células do animal, melhorando a resposta imune, gerenciando o estresse oxidativo e desenvolvimento de tecidos e ossos. Dessa forma, os microminerais como Zn, Mn e Se, quando ligados à aminoácidos, permitem melhora na viabilidade e qualidade dos pintinhos.

Favero et al. (2013) observaram que ovos oriundos de matrizes alimentadas com minerais orgânicos em adição aos minerais inorgânicos ou *on top* apresentaram maior peso e

espessura de casca e menores taxas de mortalidade embrionária em relação aqueles de matrizes alimentadas apenas com minerais inorgânicos. Também, Stefanello et al (2014) observaram melhores características estruturais e de qualidade de casca em ovos de poedeiras quando adicionado microminerais na forma orgânica na dieta.

Xavier et al. (2004) observaram melhorias nos índices de desempenho de poedeiras semi-pesadas no segundo ciclo de produção, e concluíram que existem benefícios na inclusão de selênio, zinco e manganês sob a forma de complexo orgânico nesta fase. Entretanto, Albuquerque (2004) avaliou o efeito da suplementação dietética de fontes orgânicas de zinco, cobre, manganês, selênio, ferro e iodo, concluindo que a suplementação desses microminerais, na forma isolada ou combinada, não afetaram o desempenho de poedeiras no primeiro ciclo produtivo. Testando aves em segundo ciclo de produção, Scatolini (2007) também não observou influência da suplementação de manganês, zinco, selênio, cobre e ferro, comparando formas inorgânicas e orgânicas de cada mineral testados individualmente e/ou associados, sobre o peso dos ovos, percentagem de postura e consumo de ração.

#### 2.4.1 Selênio (Se)

O selênio tem grande importância em diversas funções vitais no organismo, tendo participação na síntese de prostaglandinas e no metabolismo de ácidos graxos essenciais, ativação dos hormônios tireoideanos e, como destaque, tem papel essencial na obtenção de uma resposta imune adequada, é um importante agente oxidante, agindo através da neutralização dos radicais livres (SAAD, 2009). O selênio interage com a vitamina E na célula, sendo que esta atua como antioxidante, mantendo a integridade das membranas celulares, enquanto o Se atua como componente da glutathione peroxidase, destruindo peróxidos a nível citoplasmático, recuperando as membranas das células e capilares. (MACARI E MENDES, 2005).

O Se é encontrado no ambiente em duas formas químicas: orgânica e inorgânica. A inorgânica é encontrada na forma de selenito, selenato, seleneto e na forma metálica, sendo potencialmente tóxico quando utilizado de forma inadequada (SURAI, 2000). A substituição do selenito de sódio da dieta por Se orgânico (na forma predominante de selenometionina) aumenta tanto a absorção de Se quanto sua atividade biológica, maximizando os benefícios dos baixos níveis de inclusão permitidos na dieta. O selenito de sódio é absorvido como os outros minerais, de maneira passiva, sendo que a absorção é mais eficiente no íleo. A selenometionina é absorvida como aminoácido, entrando nos enterócitos por transporte ativo,

em um processo similar ao que ocorre com a metionina, em todos os seguimentos do intestino delgado. O Se absorvido na forma inorgânica será pouco retido nos tecidos, e grande parte será excretada na urina. Já na forma orgânica (seleniometionina) pode ser armazenado no organismo, ocupando o lugar da metionina na síntese proteica, ficando armazenada nos músculos e outros tecidos (SURAI, 2002).

A suplementação do Se usando microrganismos recebeu muita atenção no início dos anos 2000. O produto obtido pelo enriquecimento da levedura (*Sacharomyces cerevisiae*) com selênio (Levedura selenizada) vem ganhando notoriedade entre as indústrias do setor de produção animal. Sabe-se que os microrganismos, especialmente as leveduras, em certas condições, ao produzir uma biomassa, acumulam Se na forma orgânica, principalmente, a selenometionina, que é a melhor forma de fonte de selênio para os organismos. O selênio orgânico de origem na levedura é a forma mais econômica de se produzir essa forma deste nutriente (MELO et al., 2015).

El-Mallah et al., (2011) concluíram que a suplementação de Se levedura (0; 0,25 e 0,50%) melhora os resultados do desempenho, qualidade do ovo e alguns parâmetros sanguíneos em poedeiras Hi- sex Brown. Pan et al. (2010) trabalhando com poedeiras comerciais de ovos marrons, observaram que a adição de selenometionina (0; 0,1; 0,2 e 0,3ppm Se) melhorou o peso da ave, conversão alimentar, produção de ovos, peso do ovo, coloração da gema e consistência do albúmen (Unidade Haugh).

O desenvolvimento do embrião até a eclosão é considerado um período em que ocorre estresse oxidativo. Portanto, uma melhora nas defesas antioxidantes durante o desenvolvimento embrionário pode ser vista a partir do uso de Se da dieta da matriz, o qual pode ser transferido para o óvulo e conseqüentemente ao embrião em desenvolvimento garantindo um aumento na eclodibilidade. Ainda, a substituição de selenito de sódio na dieta de aves por Se orgânico, pode ajudar a atender o requisito de Se e aumentar a fertilidade e eclodibilidade (Surai, 2006).

Xavier et al. (2004) observaram melhora na qualidade dos ovos de poedeiras semi pesadas no segundo ciclo de produção e concluíram que existem benefícios na inclusão de selênio, zinco e manganês sob a forma de complexo orgânico nesta fase. Correia et al. (2000), avaliaram a suplementação de selênio orgânico na alimentação de poedeiras e não observaram diferenças significativas para unidades Haugh, percentagens de gema e albúmen e altura do albúmen. Edens (2002) demonstrou que o uso de níveis elevados de Se orgânico em dietas de galos melhorou a qualidade do esperma quando comparado a dietas contendo Se inorgânico.

#### 2.4.2 Ferro (Fe)

O Fe presente no organismo animal se encontra na forma de hemoglobina (57%), com a função de transportar o oxigênio até as células e regular a respiração celular. Também pode ser encontrado ligado às proteínas (apo-ferritina) ou associado a enzimas envolvidas na oxidação celular, além de estar presente na mioglobina (7%), necessária para o funcionamento dos músculos. A carência de ferro faz com que as novas hemácias produzidas apresentem menor concentração de hemoglobina com gradativa diminuição no tamanho e menor formação de eritrócitos (MAIORKA E MACARI, 2002).

Segundo Underwood (1999), a absorção de ferro nos monogástricos é afetada pela idade, status de ferro no organismo, condições do trato intestinal (sítios de absorção), quantidade e forma química do ferro ingerido e quantidade e proporção de outros minerais e compostos na dieta, os quais podem interagir com o ferro. Os metais divalentes que afetam a absorção de ferro na dieta são o cobre, manganês, cobalto, cádmio, os quais podem competir pelo sítio de absorção do ferro.

Galinhas poedeiras possuem uma maior necessidade de Fe na dieta, pois cada ovo possui cerca de 1,5mg de Fe, o que representa 25% das reservas disponíveis no fígado (CAO, 1996). Paik (2001) observou incremento na quantidade de Fe na gema do ovo de aves que receberam complexo de Fe-Metionina quando comparadas com as que receberam Fe na forma inorgânica. Skrivan et al. (2005) utilizaram suplemento mineral inorgânico com Zn, Fe e Cu isolados e/ou associados na dieta de poedeiras e observaram que a suplementação da dieta basal com Fe aumentou 6,3 % a concentração de Fe na gema.

#### 2.4.3 Cobre (Cu)

O cobre é um elemento essencial para a reprodução, o crescimento, o desenvolvimento do tecido conjuntivo e a pigmentação da pele. É um componente de proteínas sanguíneas como a eritrocupreína, encontrada nos eritrócitos, exercendo função em muitos sistemas enzimáticos e, também, é essencial para a formação dos ossos, sendo ativador da lisil oxidase, enzima que participa da biossíntese de colágeno. O Cu somente é superado pelo zinco no número de enzimas ativadas (LEESON E SUMMERS, 2001; SUTTLE, 2010).

O cobre possui como principal função metabólica a hematopoiese. Compõe diversas enzimas com funções oxidativas e atua favorecendo a absorção intestinal de ferro, bem como,

a mobilização do mesmo dos tecidos para o plasma, estimulando assim, a síntese de hemoglobina (NYS et al., 2003).

Nys et al. (2003) enfatizaram que o cobre também participa da mineralização dos ossos e sua principal função é a defesa do organismo contra o estresse oxidativo. A carência de cobre determina a produção de ovos com má formação da casca e maior incidência de ovos sem casca, embora as causas ainda não sejam conhecidas (GUO et al., 2001). Dietas com deficiência deste mineral são responsáveis por ossos frágeis e cartilagens espessas, assim como, ovos com cascas frágeis pela má formação da membrana da casca (LEESON E SUMMERS, 2001).

Mabe et al. (2003) suplementaram dieta a base de milho e farelo de soja com minerais (Zn, Mn e Cu) na forma inorgânica e orgânica e observaram que, independente da fonte, a suplementação de 60, 60 e 10 mg/kg de zinco, manganês e cobre, respectivamente, comparada com o tratamento sem suplementação, aumentou a concentração de Mn e Zn na gema do ovo, não havendo diferença na concentração de cobre. Ainda, a suplementação dos minerais, tanto na forma inorgânica ou orgânica, apresentou melhora na resistência das cascas dos ovos.

Aghaei et al (2010) observaram uma correlação positiva entre as concentrações de cobre e zinco do plasma seminal e percentual de motilidade progressiva dos espermatozoides.

#### 2.4.4 Zinco (Zn)

O zinco apresenta funções importantes no organismo de poedeiras como a fixação do cálcio sob a forma de carbonato de cálcio nos ossos e ovos, e a ativação de sistemas enzimáticos (PARK et al., 2004). Como constituinte de metaloenzimas, desempenha função importante na qualidade da casca, pois está diretamente relacionado com a atividade da enzima anidrase carbônica que controla a transferência de íons bicarbonato do sangue para a glândula da casca (MABE et al., 2003), sendo essencial para a formação da casca do ovo.

Lundeen (2001) observou melhora da qualidade da casca com dietas suplementadas com Mn e Zn quelatados, comparadas com dietas suplementadas com a forma inorgânica. Paik (2001) avaliou fontes de zinco, cobre e manganês orgânico em poedeiras e observou que a gravidade específica e percentagem de casca foram maiores nos tratamentos que receberam minerais orgânicos e que a associação de zinco e manganês orgânico melhorou a resistência da casca. Segundo o autor, houve influência do zinco na síntese da enzima anidrase carbônica.

Baixos níveis de zinco são necessários para a matriz obter uma eclodibilidade normal. Porém, uma deficiência de zinco resulta em redução da eclodibilidade, aumento da

mortalidade embrionária e mau desenvolvimento ósseo e de penas. Ainda, a suplementação de zinco melhora a imunidade da progênie (MACARI E MENDES, 2005).

Sahin e Tasdemir (2017) avaliaram os efeitos da adição de Zn na forma orgânica e inorgânica (60 mg/kg) em dietas de poedeira Barred Rock cruzadas com machos Red Rhode Island e não encontraram diferença significativa no número de ovos férteis, eclosão, eclodibilidade dos ovos e mortalidade embrionária. Peso e qualidade de pintinhos de grupos alimentados com Zn orgânico foram maiores em comparação outros grupos de inorgânicos (ZnO, ZnSO<sub>4</sub>).

#### 2.4.5 Manganês (Mn)

O manganês faz parte da molécula de mucopolissacarídeos, que é um dos componentes da matriz orgânica da casca. Uma deficiência de Mn compromete a formação da camada mamilar da casca e produz casca com maior incidência de áreas translúcidas (MACARI E MENDES, 2005). Além disso, o Mn é essencial para o desenvolvimento normal dos ossos, manutenção do funcionamento do processo reprodutivo em machos e fêmeas e responsável pela ativação de várias enzimas (UNDERWOOD, 1981). Segundo Bansal e Bilaspuri (2008) o Mn age como antioxidante nos espermatozóides, reduzindo o estresse oxidativo melhorando a motilidade e a viabilidade do espermatozóide *in vitro*.

De acordo com Leeson e Summers (2001), a absorção de Mn no trato intestinal é muito baixa e sua biodisponibilidade nos principais alimentos também é baixa. No organismo das aves, o osso é a fonte mais rica em Mn, com cerca de 3 a 4µg/g de Mn no tecido, seguido do fígado com 2µg/g de Mn. Além da eficiência de absorção do Mn ser baixa, outros minerais como cálcio, fósforo e ferro podem reduzir a sua solubilidade e inibir a sua absorção.

Scatolini (2007) avaliou suplemento mineral dietético composto por manganês, zinco, selênio, ferro e cobre nas formas inorgânicas e orgânicas, e manganês, zinco e selênio testados individualmente e/ou associados entre si, em ovos armazenados por dias em temperatura ambiente. O autor observou efeito dos minerais orgânicos na dieta das aves, na média do período experimental, sobre a manutenção do peso de ovos, sendo que ovos do tratamento com associação de manganês/zinco orgânicos perderam menos peso que ovos do tratamento com zinco/selênio orgânicos, não diferindo dos demais. Em relação às unidades Haugh, os ovos das aves alimentadas com manganês orgânico expressaram o pior resultado, diferindo apenas dos ovos das aves que receberam a associação de manganês/selênio orgânicos na dieta. Não foi observada diferença para índice gema.

#### 2.4.6 Cálcio (Ca)

Entre os nutrientes mais importantes para as aves, o cálcio é o mineral mais ativo, sendo indispensável para uma série de funções metabólicas, principalmente no desenvolvimento da ave. De acordo com Goff (2006), o cálcio extracelular é essencial para a formação dos tecidos esqueléticos, transmissão de impulsos nervosos, coagulação sanguínea, além de ser componente da casca do ovo. Já o cálcio intracelular está envolvido em uma ampla gama de enzimas e funciona como importante segundo mensageiro, transportando informação da superfície da célula para o seu interior. O cálcio é responsável por 56% do plasma seminal e da atividade motora que estimula os espermatozoides das aves (Lertchunhakiat et al, 2016).

Quando a ingestão é suficiente ou excessiva, o cálcio é rapidamente depositado nos ossos. Porém, quando em concentração insuficiente, o cálcio dos ossos é mobilizado, aumentando sua concentração sanguínea (SIMÕES, 2005). Esse mecanismo fisiológico é, particularmente, importante para as aves em postura devido à elevada exigência em cálcio para formação da casca durante toda a vida produtiva (MAZZUCO, 2006). Baixos níveis de cálcio podem interromper a produção de ovos sendo um componente essencial para formação da casca do ovo (BELL E WEAVER JR., 2002).

Os níveis de Ca na dieta de matrizes afetam o desenvolvimento embrionário, principalmente por meio da qualidade da casca, que resulta em um aumento na mortalidade durante na primeira semana, aumento de contaminação, mau desenvolvimento ósseo e aumento da mortalidade no final do período de incubação (MACARI E MENDES, 2005).

Dietas com altos níveis de Ca são necessárias para aves em fase de produção de ovos. Plantéis de machos que recebem a mesma dieta da fêmea podem ser prejudicados pois altos níveis de cálcio, fornecidos no período reprodutivo, podem desencadear problemas renais (VALLE, 1999), bem como podem impedir a absorção de alguns minerais, como manganês, zinco e magnésio, afetando dessa forma o desempenho dos galos (WALDROUP, 1996).

Contudo, Rutz et al. (1999) analisando o desempenho reprodutivo de galos *Leghorn* submetidos a diferentes níveis de Ca dietético concluíram que o desempenho reprodutivo dos galos *Leghorn* não é afetado pelo nível até 3,5% de Ca, valor normalmente utilizado para as fêmeas.

#### 2.4.7 Cálcio de alga



Na alimentação animal são utilizadas diversas fontes de cálcio, sendo uma delas o cálcio proveniente das algas marinhas calcáreas. Sabe-se que as algas calcáreas retêm índices de elementos minerais do meio marinho, além de apreciável quantidade de substâncias nutritivas. O *Lithothamnium calcareum* pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das Corallineacea, é uma alga de aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e magnésio (MELO e MOURA, 2009).

As coralináceas são por natureza, vegetais fotossintéticos e precisam da luz para sua sobrevivência e desenvolvimento. Esta necessidade tem duas conseqüências essenciais: somente podem permanecer vivas, na superfície do fundo marinho e na crosta mais externa. A película viva, superficial, da crosta algálica, é reconhecida pela cor rosa avermelhada dos talos. A parte interna morre e perde a coloração. Outra conseqüência desta necessidade de luz se traduz pela faixa batimétrica de ocorrência dos fundos de *maerl* (nome dado na Bretanha, para um sedimento marinho constituído por algas vermelhas calcárias), relacionados com a transparência das águas. Isto resulta que os bancos de *maerl* naturais só apresentam o mesmo aspecto nas condições ideais de seu ambiente.

A renovação das algas marinhas *Lithothamnium* é permanente, contanto que haja incidência de luz natural, se tornando uma fonte de macro e microminerais renovável. O produto pode ser aplicado no estado natural ou após secagem e moagem. As principais características que potencializam a atuação deste produto são atribuídas à maior disponibilidade dos micronutrientes que se encontram adsorvidas nas paredes celulares, sendo assim facilmente assimiláveis pelas plantas e animais e à elevada porosidade das algas (>40%) que propicia maior superfície específica de atuação (MELO e MOURA, 2009).

As formas livres como os rodolitos, nódulos e seus fragmentos são viáveis para exploração comercial, sendo depósitos sedimentares não consolidados que podem ser retirados por dragagem. O crescimento lento das algas calcárias inviabiliza seu cultivo, sendo necessário manter bancos intactos dessas algas para a preservação da espécie (DIAS, 2000).

O calcário produzido pela extração da alga *Lithothamnium* é muitas vezes denominado como calcário biogênico ou biodentrítico marinho e pode ser usado na correção e fertilização do solo e nutrição animal e humana. A formação do calcário biogênico ocorre pela precipitação da calcite que é conseqüência das atividades dos seres vivos. Isso pode acontecer com a redução da tensão de CO<sub>2</sub> em razão da atividade fotossintética de algas marinhas e do fitoplâncton, fator que cria condição para que ocorra a precipitação da calcite (GOETZ, 2008).

De modo geral, no Brasil, as ocorrências mais contínuas encontram-se numa região compreendida entre a plataforma média e a externa, muitas vezes em profundidades maiores que 50 m, impedindo a exploração por métodos tradicionais de dragagem que atingem geralmente a profundidade máxima de 30 m. A plataforma continental brasileira representa, a nível global, a maior extensão coberta por sedimentos carbonáticos. Estes depósitos, no entanto, ainda não foram explorados industrialmente. A França apesar da pequena extensão relativa de sua plataforma continental é o principal produtor de granulados litoclásticos e bioclásticos marinhos (DIAS, 2000).

A exploração durante muito tempo se fez de forma artesanal, sem produzir maiores impactos ao ambiente, porém nos últimos trinta anos na Bretanha houve uma exploração industrial intensiva dos fundos de algas. Isto produziu, em amplas áreas, o desaparecimento da parte viva, superficial, dos bancos. Sua hipotética recuperação só poderia ser feita muito lentamente (vários milênios) a partir dos resíduos vivos que restaram. O lento crescimento das algas calcárias não permite que seja feita sua cultura, nem mesmo a tentativa de se fazer o repovoamento em longo prazo. É então muito importante que sejam preservados bancos ainda intactos destas algas (DIAS, 2000).

Nos países europeus, França, Irlanda e Inglaterra, assim como no Japão, sua utilização na alimentação animal vem sendo praticada há mais de 200 anos como suplemento mineral. No Brasil, a utilização da *Lithothamnium* se restringia somente a agricultura, e nos últimos anos vem sendo utilizada como suplemento em rações para animais, despertando o interesse de pesquisas em instituições públicas e privadas (MELO; MOURA, 2009).

Pelícia et al. (2007) avaliaram a suplementação de cálcio marinho *Lithothamnium* na dieta de poedeiras e concluíram que é possível a inclusão de cálcio marinho na dieta de poedeiras em até 45% de substituição do calcário calcítico, sem que ocorram prejuízos ao desempenho e a qualidade dos ovos.

Carlos et al. (2011) avaliaram uso da alga *Lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio (calcário calcítico) nas rações de frangos de corte e concluíram que a utilização da alga *Lithothamnium calcareum* (independente da forma de colheita) pode ser recomendada para as rações de frangos de corte, sem prejudicar o desempenho zootécnico.

### **3 HIPÓTESES E OBJETIVOS**

#### **3.1 HIPÓTESES**

A adição de microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos para matrizes de poedeiras poderá melhorar os parâmetros zootécnicos em machos e fêmeas.

A adição de microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos poderá melhorar a qualidade de ovos e os índices de incubação, em matrizes de poedeiras.

A adição de microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos poderá melhorar a qualidade espermática de reprodutores avícolas.

A adição de cálcio e microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos para matrizes de poedeiras poderão melhorar os parâmetros zootécnicos em machos e fêmeas.

A adição de cálcio e microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos poderão melhorar a qualidade de ovos e os índices de incubação, em matrizes de poedeiras.

A adição de cálcio e microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos poderão melhorar a qualidade espermática de reprodutores avícolas.

#### **3.2 OBJETIVOS**

##### **3.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da adição de microminerais orgânicos, cálcio quelatado ou cálcio de alga (*Lithothamnium calcareum*) sobre características de desempenho e reprodutivas, como qualidade e incubação de ovos e qualidade espermática de matrizes de poedeiras.

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da adição de microminerais orgânicos a uma dieta basal formulada com microminerais inorgânicos sobre o desempenho de matrizes de poedeiras, qualidade e incubação de ovos e qualidade espermática de machos e fêmeas (Capítulo II).

- Avaliar os efeitos da adição de dois níveis de microminerais orgânicos e dois tipos de cálcio orgânico sobre o desempenho de fêmeas e machos avícolas, qualidade e incubação de ovos e qualidade espermática (Capítulo III).

#### **4. CAPÍTULO II**

### **SUPPLEMENTATION OF ORGANIC AND INORGANIC MINERALS ON THE PERFORMANCE, EGG AND SPERM QUALITY AND, HATCHING CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS**

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas para publicação no Periódico **Animal Feed Science and Technology**.

**Supplementation of organic and inorganic minerals on the performance, egg and sperm quality and, hatching characteristics of laying breeder hens**

A. Londero<sup>a,\*</sup>, A. P. Rosa<sup>a</sup>, F.G. Luiggi<sup>b</sup>, M. O. Fernandes<sup>a</sup>, A. Guterres<sup>a</sup>, J. Moura<sup>a</sup>, N. H. Pedroso<sup>a</sup>, N. Santos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Poultry Science Laboratory, Department of Animal Science, Federal University of Santa*

*Maria, RS, Brazil;*

<sup>b</sup> *Yes Sinergy of the Brazil, SP, Brazil*

Abbreviations: BD, basal diet; OMM, organic micro minerals; BW, body weight; YI, yolk index; EM, embryonic mortality.

\*Corresponding author. Tel.: +55 55 32208269; Fax: +55 32208269

E-mail address: vetelondero@hotmail.com

## ABSTRACT

This experiment was carried out to evaluate the effects of diet supplemented with organic micro minerals on performance, egg quality, sperm quality and hatching characteristics of laying breeder hens. A total of 144 White Plymouth Rock females and 36 Red Rhodes Island males at 36 to 55 weeks of age were used. The experimental design was completely randomized. Hens were distributed in 8 replicates with 6 females each and to males 12 replicates with 1 male per treatment. Birds were fed a basal diet (BD) containing only inorganic micro minerals (10mg Cu, 60mg Fe, 70mg Mn, 75mg Zn and 0.3 mg Se per kg of diet); a BD+500g/ton of a organic micro minerals (OMM) product (2.5 mg Cu, 17.5mg Fe, 20mg Mn, 27.5mg Zn and 0.080mg Se per kg of diet) and BD+800g/ton of OMM (4mg Cu, 28mg Fe, 32mg Mn, 44mg Zn and 0.128mg Se per kg of ration). Hens were artificially inseminated once a At 43, 44, 45 and 49 wks, egg production was higher in treatment BD+800gOMM than BD ( $p<0.05$ ). The body weight, feed intake and feed conversion of females and the parameters of eggs quality were not affected by different diets ( $p>0.05$ ). Only the yolk index was higher in eggs from hens fed with BD than BD+800gOMM ( $p=0.0092$ ). The sperm vigor in males fed with BD+800gOMM diet was higher than the BD diet ( $p=0.0262$ ). The others parameters evaluated on sperm quality were not affected by diets. Fertility was higher in eggs from hens fed BD+500gOMM compared to BD diet ( $p=0.0247$ ). In conclusion, the addition of organic minerals (800g/ton) in the diet resulted positive effects with increased egg production by laying hens in addition, the vigor of spermatozoa and the fertility (500g/ton) of eggs were increased.

**Keywords:** breeder, egg production, hatching, trace mineral, spermatozoa.

## 1. Introduction

Improving poultry production through nutrition should be obtained from the maximum performance achieved poultry males and females. The efficacy of the use of micro elements is an important issue in modern poultry nutrition because the micro minerals are essential for normal growth and many metabolic processes in living organisms, as they are catalysts or constituents of the enzymatic systems in most of body cells (Swiątkiewicz et al., 2014). The micro minerals are essential in poultry and have been resulted to the biochemical processes required for the maintenance of normal growth and development, including bone and eggshell formation, egg structure and development of the avian embryo (Richards, 1997) and semen quality (Barber et al., 2005).

Most mineral sources used in diets for breeder hens are derived from inorganic compounds such as oxides, sulfates, carbonates, and phosphates. Organic micro mineral sources may be an alternative to inorganic sources. Organic trace minerals do not dissociation in the acidic gastric pH, remaining electrically neutral and protected from chemical reactions with other molecules in the intestinal lumen, which optimizes their absorption and increases their bioavailability relative to inorganic sources (Swiątkiewicz et al., 2014). Chelated or complexed minerals have non-metallic ligands, and therefore organic (Vieira, 2008), they are compounds containing a central metal atom (acceptor of electrons) together with ligands (proteins, amino acids, carbohydrates, or lipids) which contain at least one ligand atom (O, N or S) with a free electron pair (Swinkels et al., 1994).

The most commonly used organic minerals include zinc, manganese, selenium, copper and iron. Zinc is a component of the carbonic anhydrase enzyme, which is crucial for



supplying the carbonate ions during eggshell formation (Robinson and King, 1963). A zinc deficiency in the breeder diet results in decreased hatchability, increased embryonic mortality (Kienholz et al., 1961) and sperm egg penetration (Amen and Al-Daraji, 2011). Manganese is the metal activator of enzymes that are involved in the synthesis of mucopolysaccharides and glycoproteins that contribute to the formation of the organic matrix of the shell. Copper plays the role of cofactor of the lysyl-oxidase enzyme that is important in the formation of collagen cross links present in the egg shell membrane (Leeson and Summers, 2001). Iron is a constituent of hemoglobin and myoglobin involved in oxidation, reduction and transport of electrons, indispensable to the vital processes of the organism (Andrews, 2002). Selenium acts in the antioxidant system being a component of selenoproteins and acts indirectly or directly avoiding oxidative stress (Moreira et al., 2001). Selenium has been related to be one of the most important elements in reproduction. A diet deficient in selenium may decrease sperm count, decrease motility and fertilization capacity (Surai, 2000).

Micro minerals such as Zinc (Zn), Copper (Cu), Iron (Fe), Manganese (Mn), and Selenium (Se) have a function either as catalytic or structural cofactors in metal-containing enzymes and proteins that are contained in the cells of the embryo and its extraembryonic membranes. These enzymes and proteins are located in the cells of the embryo and its extraembryonic membranes. It is crucial to the survival of the embryo that the requisite amount of each essential micro mineral must be available at the appropriate time during its growth and development within the egg (Richards, 1997).

The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation of chelated amino acids (copper, iron, manganese and zinc) and a proteinate metal (selenium) in diets of laying hens, males and females, formulated with inorganic minerals on the performance, egg quality, incubation parameters and sperm quality.

## 2. Material and methods

The present study was carried out in the Poultry Science Laboratory-LAVIC at the Federal University of Santa Maria (UFSM). All procedures used in this study were previously submitted and approved by the Ethics Committee of UFSM. In a total of 144 White Plymouth Rock laying breeder hens and 36 Red Rhodes Island breeders at 36 to 55 weeks of age were used. Hens and males were distributed to individual cages 0.33x0.45x0.40m and 0.33x0.60x0.60m, respectively. Hens were standardized by weight and egg production before starting the experiment. Males were standardized by body weight and phenotypic characteristics. During the experimental period the hens were artificially inseminated once a week (0.05mL semen) (Rosa et al., 1995). The semen was collected from Red Rhodes Island males fed to the same diet as females. Mash feeds and water were supplied *ad libitum*. Birds were fed with diet every day around 8 a.m.. The hens received was a 16L:8D cycle lighting daily from 36 to 55 wks.

### 2.1. Treatments

The experimental design was completely randomized with 3 treatments, having 6 hens and 8 replicates and 1 male and 12 replicates each. The sources of organic micro minerals (OMM) were: Cu, Fe, Mg and Zn chelated to amino acid and, a metal proteinate in the form of selenium (Se) yeast. Breeder hens were fed maize-soybean meal of basal diet up to 35 wk of age. At 36 weeks, hens and males were distributed to 3 experimental diets: a basal diet (BD) was containing only inorganic mineral sources (10mg Cu, 60mg Fe, 70mg Mn, 75mg Zn and 0.3mg Se per kg of diet), as described in Table 1. A diet BD where 500g of organic

mineral per ton of diet (BD+500gOMM) were added (2.5 mg Cu, 17.5mg Fe, 20mg Mn, 27.5mg Zn and 0.08mg Se by kg of diet), and a diet BD where 800g of organic mineral per ton of diet (BD+800gOMM) were added (4mg Cu, 28mg Fe, 32mg Mn, 44mg Zn and 0.128mg Se by kg of diet). The basal diet, composed of all ingredient and inorganic minerals, was mixed in a horizontal mixer and then the experimental diets were obtained in another horizontal mixer, with the addition of the appropriate amounts of the organic minerals in different amounts. For each diet beat, the mixers were cleaned to prevent errors in the amounts of ingredients.

## *2.2. Experimental design and statistical analysis*

The experimental design was completely randomized, with three treatments. To hens were used 8 replicates with 6 hens each and to breeders 12 replicates with 1 male each. All the data were subject to analysis of variance. When it was observed significant differences at 5% in the variance average it was applied Tukey test for comparison among treatments. Statistical procedures were performed by using the SAS software (2016).

## *2.3. Hens performance and eggs quality*

Eggs were collected and recorded 4 times per day. The egg production by hen housed was calculated weekly. Daily feed intake (g/hen per d), feed conversion (kg of feed/dozen eggs and kg of feed/kg of eggs) and body weight (BW) was calculated at 28-d intervals.

Egg weight, yolk weight, albumen weight, eggshell weight and specify gravity were determinates weekly, totalizing 20 analyzes in the total experimental period. In total, 24 eggs/treatment (8 replicates of 3 eggs each one) were used to realize these analyses. Egg

weight, yolk weight and albumen weight were determinate through a precision scale (0.001g). Intact eggs identified were submitted to specific gravity assessment using the method of egg immersion in saline solution. Seven solutions, with densities between 1.070 and 1.100g/cm<sup>3</sup>, with graded variation of 0.05 between each solution, were prepared. Specific gravities were determined using a densitometer and using Archimede's principle as described by Peebles and McDaniel (2004). Subsequent to the completion of the specific weight test, a sample of 3 eggs per experimental unit was used for the determination of the albumen height. Measurements in millimeters (mm) were related to the weight of the egg, thereby determining the Haugh unit:  $100 * \log (H - 1.7 W^{0.37} + 7.6)$ , H = where albumen height (mm) and W = egg weight (g). Yolk quality was assessed by measuring yolk height (YH) and yolk width (YW), and yolk index (YI), was calculated as the ration between those parameters as  $YI = YH/YW$ . The 3 yolks and the 3 albumin samples were mixed separately to measure the pH using a digital bench top pH meter.

The same eggs used to realize the previous analisis were used to mensure the shell thickness and eggshell breaking strength. However, shell this analisis were determinate every 28 days (once time by period, totaling 5 analyzes in the total experimental period). The eggshell was weighed after being dried in ambient temperature by 72 hours (Rodriguez-Navarro et al., 2002). The eggshells of three eggs per experimental unit were used to measure the shell thickness with the Electronic Outside Micrometer 0.001mm at three equatorial points on each egg (Lin et al., 2004). The strength was obtained using a texturometer TA.XT2 Texture Analyzer with Cyln Stainless 5-mm probe (Texture Technologies Corp. and Stable Micro Systems Ltd., Hamilton, MA).

#### *2.4. Males performance and sperm quality*

Daily feed intake (g/male per d) and body weight (BW) were calculated every period. Semen was collected biweekly by the dorsal-abdominal massage method, in graduated falcon tubes kept in a water bath at 37°C. After the collection, the volume of the ejaculate was verified and later the parameters of motility, vigor and pH. Motility (percentage of moving spermatozoa - rectilinear and progressive) and vigor (type of motility) were determined (Celeghini et al., 2001). For this analysis, 5µL of semen were deposited on a warm slide and observed in light microscopy, with a magnification of 200x. The pH value of the fresh semen was measured by using test strips (MColorpHast™; Merck Millipore, Billerica, MA, USA). For the analysis of concentration and sperm morphology were added 5µL of semen in 5ml of formalin: citrate solution. In order to determine the spermatic concentration, the semen was diluted in a ratio of 1: 1000, to perform later the count of the sperm cell in a hemocytometer (Neubauer Camera) with a result expressed in number of cells per mm<sup>3</sup> of semen according to the technique described by Brillard e McDaniel (1985). The result was transformed to number of cells per ml of semen. A total of 100 spermatozoa were counted under the oil immersion on the phase contrast microscope (magnification of 1000x) and classified as either normal or abnormal (categorized into abnormality of head, intermediate piece and tail), and the total percent of normal or abnormal spermatozoa was calculated.

### *2.5. Incubation parameters*

To evaluate hatchability, hatchability of fertile, fertility, embryonic mortality, pipped eggs, quality and weight of chick, eggs were incubated every week (total 20 incubations). Only clean and without visible abnormalities eggs were considered suitable for incubation. All eggs daily collected were classified and separated to incubation per experimental unit. Those eggs that were considered suitable for incubation were stored for a maximum period of

7 days in controlled temperature room (18 – 20°C and 75 - 80% RH (relative humidity)). The incubation was carried out in a commercial multi-stage incubator (Casp, Amparo, SP, Brazil) at 37.5°C and 60% RH. At 18 days, the eggs were transferred to the hatcher with 36.5°C and 65% relative humidity. The hatching rate was determined in relation to the total incubated eggs. Fertility refers to the percentage of incubated eggs that are fertile while hatchability of fertility is the percentage of fertile eggs that hatch. Chicks were taken out of the hatcher, weighed and classified into first and second quality chicks. Chicks were considered second quality when they possessed bad umbilical scarring, beak abnormalities, leg weakness or excessively wet downy feathers. To evaluate the hatching rate of fertile eggs, fertility and embryonic mortality, the nonhatched eggs were submitted to embryo diagnostics. In this evaluation, eggs were classified, through macroscopic visual examination as infertile or as: - Embryonic mortality at the first 48 hours of incubation (EM1); Embryonic mortality occurring between 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day of incubation (EM2), Embryonic mortality occurring between 8<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of incubation (EM3); Embryonic mortality occurring between 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of incubation (EM4); and pipped eggs – those that have broke the shell but not emerged at the time of removal of chicks from the hatcher and the embryos still alive.

### **3. Results**

#### *3.1. Hens performance and eggs quality*

The egg production is shown in Table 2. Egg production was higher in BD+800gOMM than BD in the weeks 43, 44, 45 and 49 ( $p=0.0275$ ,  $p=0.0065$ ,  $p=0.0112$  and  $p=0.0285$ , respectively) and in the other weeks there was a tendency to increase production of BD 800gOMM in comparison to DB. This result can also be seen in the mean of the total

period, where BD + 800gOMM (79.72%) presented higher egg production than BD (75.68%). The BW and feed intake were not affected by the inclusion of organic micro minerals on diet ( $p>0.05$ ; data not shown). The feed conversion kg/kg (BD, 2.59; BD+500gOMM, 2.45 and BD+800gOMM, 2.51) and kg/dz (BD, 1.86; BD+500gOMM, 1.74 and BD+800gOMM, 1.76) were not affected by de different diets ( $p>0.05$ ; data not shown). Egg weight ( $p=0.2863$ ), yolk weight ( $p=0.9634$ ), albumen weight ( $p=0.1692$ ), eggshell weight ( $p=0.3337$ ), specific gravity ( $p=0.3731$ ), Haugh unit ( $P=0.9581$ ), yolk' pH ( $P=0.6171$ ), albumen' pH ( $p=0.6989$ ), eggshell thickness ( $p=0.5150$ ) and shell strength ( $p=0.7979$ ) were not affected by the treatments (Table 3). The yolk index increased in eggs ( $p=0.0092$ ) from hens fed with BD than in eggs from hens fed with BD+800gOMM (Table 3).

### *3.2. Males performance and sperm quality*

The supplementation of organic minerals did not affected the BW and feed intake of males ( $p>0.05$ ; data not shown). The sperm quality of males is shown in Table 4. Volume ( $p=0.1054$ ), motility ( $p=0.4608$ ), concentration ( $p=0.7550$ ), total abnormal spermatozoa ( $p=0.4650$ ), abnormality of head ( $p=0.4650$ ), abnormality of intermediate piece ( $p=0.6421$ ) and abnormality of tail ( $p=0.3174$ ) were not affected by the organic micro mineral on the diet. The seminal pH values ( $p=0.6402$ ) ranged from 7.0 to 8.0, without differences among treatments. No effect of organic minerals supplementation was observed for seminal pH. The sperm vigor was higher ( $p=0.0262$ ) in males fed BD+800gOMM than in males fed BD.

### *3.3. Incubation parameters*

Hatchability ( $p=0.3527$ ), hatchability of fertile eggs ( $p=0.0750$ ), total embryonic mortality ( $p=0.7347$ ) as EM1 ( $P=0.8002$ ), EM2 ( $P=0.3548$ ), EM3 ( $p=0.3548$ ) and EM4 ( $p=0.5959$ ) were not affected by organic minerals supplementation. Also, the eggs pipped ( $p=0.4929$ ), second quality chick ( $p=0.6450$ ) and chick weight ( $p=0.2866$ ) were not affected by treatments. The fertility was higher ( $p=0.0130$ ) on BD+500gOMM and BD+800gOMM than BD. (Table 5).

## 4. Discussion

### 4.1. Hens parameters and eggs quality

Different supplementations of micro minerals did not result in a significant effect on performance parameters such as BW, feed intake, feed conversion and egg weight ( $p>0.05$ ). The egg production is shown in table 2. Egg production was higher in treatment BD+800gOMM than BD in the weeks 43, 44, 45 and 49. In the other evaluated weeks there is a tendency for an increase in egg production when the hens' diet was supplemented with OMM. In this way, the results of this study are consistent in parts with those obtained by Carvalho et al. (2015) that evaluated the effect of the inclusion of organic Cu, Mg and Zn (chelated with amino acid and partially hydrolyzed proteins) in the diet of layers and the egg production, represented by egg mass, were not influenced by the treatments, even at the lowest inclusion level of the organic trace mineral source. As Yenice et al. (2015) found no difference in the effects of dietary organic (chelated) or inorganic Mn, Zn, Cu and Cr supplementation on the performance (body weight, feed intake, feed conversion, egg weight, and egg production) of laying breeder hens. Based on the results of this study and the authors



mentioned above, the use of micro minerals can be used in the diet of hens without affecting performance parameters.

The use of organic micro mineral in animal diets has been increasing because they appear to have greater bioavailability compared with inorganic micro mineral (Cao et al., 2002). The increased bioavailability of organic minerals might be due to the action of some components in absorption process. Another function of the organic minerals is the formation of stable complexes, which decrease the possibility of forming precipitated salts with compounds, such as phytic acid or insoluble fiber. Thereby, organic micro minerals have become more available due to its greater solubility, and absorption is facilitated by the organic binder components (Kirchgessner and Grassmann 1970). Organic micro minerals present good chemical stability, higher biological potency and delay the antagonism among different minerals (Spears, 1996). In this study, there was an increase in egg production with the use of organic micro minerals, which may be related to its positive characteristics described above. The other performance parameters were not affected, which could be expected since the basal diet used in all treatments was already balanced to meet the needs of the hens.

The eggs quality, weight of yolk, albumen and eggshell, pH of yolk and albumen and specify gravity there were no effect of supplementation of organic minerals ( $P>0.05$ ). This effect has also been observed by Stefanello et al. (2014) who evaluated the quality of eggs on Hy-Line W36 laying hens between 47 to 62 wk of age fed diets supplemented with an organic source (proteinates) of micro minerals (Mn, Zn, and Cu) and no was observed effect of micro minerals on the specify gravity. Also, Saldanha et al. (2009) evaluated effect of organic mineral supplementation (Zn, Fe, Mn, Cu, I, and Se) on the egg quality of semi-heavy layers (83 weeks of age) and did not find significantly influenced by the treatments on the yolk and albumen percentage. However, this same author, founded significantly influenced egg specific gravity and eggshell percentage, with the 80% organic micro mineral level. Paik (2001)

evaluated organic Zn, Cu, and Mn sources in layer diets, and observed higher specific gravity and eggshell percentage in the eggs of layers fed organic micro minerals, and the association between organic Zn and Mn improved eggshell strength. According to author Zn influenced the synthesis of the enzyme carbonic anhydrase, which is essential for eggshell formation. In this study, this effect was not observed and can be justified by the fact that the hens received a basal diet composed with sufficient quantities of micro minerals for their needs.

According Garcia et al. (2010) the alkaline pH negatively influences the vitelline membrane. Also, albumen alkaline ions can be exchanged with yolk H<sup>+</sup> ions, leading to protein denaturation, increasing yolk viscosity. According this study, OMM do not cause effects on pH of yolk and album and can be used in poultry diets. In the literature, the researches done with breeder of laying hens are scarce, which makes it difficult to compare results.

Source of organic micro minerals used individually or associated did not influence considering the average obtained during the entire experimental period, on Haugh units (Saldanha et al. 2009, Yenice et al. (2015) or yolk index (Saldanha et al. 2009). However, in this study, Haugh unit was not affected by the addition of organic minerals in the diet, but the yolk index was higher in DB than BD+800gOMM. As egg deterioration progresses, the yolk index score becomes lower because the fiber structure of the vitelline membrane loosens and the membrane strength decreases over time (Fromm, 1967). In this study, the yolk index of eggs from hens fed with BD (only inorganic minerals) showed higher yolk index than eggs from hens fed with BD+800gOMM, that is, the yolks had better membrane fiber structure. Nevertheless, the yolk indexes of all the treatments analyzed are within what is considered suitable for eggs of laying hens, which would be between 0.3 and 0.5 (Yannakopoulos, 1986).

The shell thickness and eggshell strength there were no effect of supplementation of organic minerals ( $P>0.05$ ). These data are in agreement with Mabe et al. (2003) that evaluated

the the Zn, Cu, and Mn dietary supplementation in laying hens and did not affect the eggshell quality: percentage eggshell, eggshell index, however, this author observed improved breaking strength and fracture toughness which differs from the result found in this study. Swiatkiewicz and Koreleski (2008) evaluated the addition of Zn and Mn from inorganic and organic sources for layers between 35 and 70 wks of age and did not observe changes in percentage and shell thickness of the eggs.

The effects observed by researches on the mechanical properties of the eggshell, independent of eggshell mass, suggest that micro elements may directly interact with the calcium carbonate formation and the resulting texture of the eggshell. In this respect, one possibility is that the presence of micro elements alters the initial phase of eggshell formation (Mabe et al., 2003). Bain (1990), for example, at the relationship between fracture toughness and the ultrastructural organization of the eggshell and suggested that micro element supplementation promotes early fusion during the initial stages of shell formation and hence improves the mechanical strength of the egg irrespective of its thickness. This analysis can justify the fact of not having been found results in eggshell mass and thickness in this study.

#### *4.2. Males performance and sperm quality*

The present study demonstrated that the volume of spermatozoa of males did not present difference in the treatments. However, Shan et al. (2017) evaluated the effect of an inorganic and organic micro mineral (Zn, Mn, Cu, Fe and Se) premix on the semen quality of male broiler breeders and concluded that there was a significant increase in semen parameters in organic mineral group such as semen volume and semen density from 31 to 35 weeks. The organic minerals (Cu, Zn, Mn and Se) were used by Mahan et al. (2002) added to the diets to the evaluated the fertility on boar and the results demonstrated that number of doses per

ejaculate increased from 10.9 to 23.4. Therefore, Barber et al. (2005) suggested in your research on broiler breeder that micro minerals (Se, Mn, and Zn) act at the reproductive tissue level during spermatogenesis to improve semen quality.

According Surai et al. (1998) the Se supplementation affects the antioxidant defenses of poultry breeding male's semen. Edens (2002) showed that, when cockerels were fed on a basal diet containing 0.28 ppm Se without additional dietary supplementation of this micro element, the percentage of normal spermatozoa was only 57.9% and two major abnormalities seen were bent midpiece (18.7%) and corkscrew head (15.4%). However, when organic Se was included in the cockerel's diet in the same amount, semen quality was further improved and those abnormalities decreased down to 0.7 and 0.2% and the percentage of normal spermatozoa increased up to 98.7%. Edens and Sefton (2009) reported that roosters fed with organic selenium had significantly lower percentages of dead spermatozoa, spermatozoa with midpiece abnormalities, corkscrew head abnormalities and other abnormalities (mostly detached heads at the neck- midpiece interface) compared with semen samples evaluated from roosters that had been fed selenite. According to the authors, these researches demonstrated that the inclusion of selenium in poultry diets enhances sperm numbers, and using an organic source reduces production of defective sperm, thereby having a positive effect on the fertilizing potential of the male. In this study, sperm concentration and sperm abnormalities were the same for both organic (on top) and inorganic mineral sources. Nevertheless, this research is in agreement with that was above described by the authors. Although no effect was found on these variables, the spermatid vigor was higher for males fed BD+800gOMM than BD. Moreover, the fertility in the incubated eggs was increased by the use of organic minerals (as discussed below). Renema (2004) has demonstrated that breeder hens fed with organic Se showed a higher number of sperm holes at the site of fertilization in the perivitelline membrane, as compared to hens fed inorganic Se. He attributed this effect to changes in the

oviduct environment, such as reduction of free radicals within the sperm host glands, due to improvement in glutathione peroxidase (GSH-Px) activity (Surai, 2000).

Others micro minerals that have relevance on the spermatic quality are Mn, Cu and Zn. Mn is a potent stimulator of sperm motility through the stimulation of adenylate cyclase activity (Lapointe et al., 1996). Copper appears to be involved in spermatozoa motility and it may also act at the pituitary receptors which control the release of luteinizing hormone (LH). In the seminal fluid, the level of copper appears to fall in cases of azoospermia and to increase in oligo- and asthenozoospermia (Skandhan, 1992). According Amen and Al-Daraji (2011) the zinc is important for the cell division and the production of healthy sperm. It is the most critical micro mineral for male sexual function. It is needed for testosterone metabolism, testicle growth, sperm production, motility and count. These authors evaluated the effect of dietary supplementation with different level of Zn on broiler breeder chicken and found improvement in the sperm egg penetration. In this research the motility and number of abnormal of spermatozoa not were affected by use of minerals. However, Shan et al. (2017) found significant increase in semen motility and number of normal sperm of male broiler breeders fed with organic micro mineral premix than males fed with inorganic mineral premix from 31 to 35 weeks.

#### *4.3. Incubation parameters*

Hatchability and hatchability of fertile eggs were not affected by treatments. The fertility shown to be higher in breeders hens fed with OMM compared to hens fed only BD. These results are compatible with the findings of Rutz et al. (2003), who reported that the supplementation of organic Mn and Zn (30 and 30 mg/kg) to broiler breeder hen diets increased the fertility according to the high level (100mg/kg) of their inorganic forms.

However, Yanice et al., (2015) evaluated the effect of organic and inorganic Mn, Zn, Cu and Cr mixture (chelated on the methionine) supplementation and did not found lead to the significant difference between groups in terms of fertilized eggs and hatching rates. Studies performed by Favero et al. (2013) evaluating the reproductive performance of breeder hens fed diets supplemented with Zn, Mg and Cu from inorganic and amino acid-complexed sources observe improved of hatchability of fertile eggs and not showed effect on hatchability and fertility. This same author reported a reduction in early embryo mortality in eggs laid by hens fed with inorganic and organic minerals on top diet compared with the control diet. However, in this study was not found effect of treatments on the total embryo mortality (EM1, EM2, EM3 and EM4) as well as, pipped eggs. In this context, the different sources of minerals used in the present study and described by Favero at al. (2013) may have been the explanation for the difference of the results found. The increase in egg fertility can be attributed to a better utilization of the minerals involved in the fertilization, such as Zn, Mn, Cu and Se.

According Sun et al., (2012), organic mineral supplementation in the diets protects breeders from lipid peroxidation, increased egg nutrition retention, and benefits the growth of subsequent broiler progeny. In this study, the supplementation of OMM on diets to hens apparently did not influence the quality of chicks born. The second quality chick (unhealthy navels, culls and physical abnormalities) and chick weight (high-quality chicks) of were not affected by treatments.

Zn, Mn, and Cu play important roles in embryo development as well as hatchability (Kidd, 2003), and a positive relationship has been shown between egg Zn content and hatchability. It is the most critical micro mineral for male sexual function. It is needed for testosterone metabolism, testicle growth, sperm production, motility, count, reducing excess estrogen in male reproductive tissue (Amen and Al-Daraji, 2011). Zn is located primarily in

the Leydig cells, the late type B spermatogonia, and the spermatids (Croxford et al., 2011). Se also has positive effects on hatchability (Surai, 2006). The supplementation of laying hen diets with organic selenium improves hatchability of fertile eggs (Hanafy et al., 2009), fertility and hatchability % (Osman et al., 2010). As described above, there is positive action of the minerals in the reproductive process of the breeder hens which can be confirmed in this study by the increase in the fertility of the eggs although no effect on hatching has been found.

## **5. Conclusions**

In conclusion in the present study, the supplementation of Mn, Zn, Fe, Cu and Se can be used for breeder laying hens without affect the main performance variables and the egg quality. There is a positive effect with tendency to increase egg production of birds fed with organic micro minerals throughout the experimental period. The fertility of incubated eggs increase with the use of OMM. In males, the use of OMM is indicated by an increase in spermatic vigor, without altering the other seminal parameters evaluated.

## **References**

- Amen, M.H.M.; Al-Daraji H.J. 2011. Effect of dietary supplementation with different level of zinc on sperm egg penetration and fertility traits of broiler breeder chicken. *Pak J Nutr.* 10: 1083-1088.
- Andrews NC. 2002. Metal transporters and disease. *Current opinion in chemical biology.* 6(2):181-186.

- Barber, S.J. Parker, H.M. McDaniel C. D. 2005. Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. *Poult. Sci.* 84:100–105
- Bain, M.M. 1990. Eggshell strength: a mechanical/ultrastructural evaluation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow, 266p.
- Brillard, J.P., McDaniel, G.R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poult.Sci.*, v.64, p.155-158, 1985.
- Cao J., Henry P.R., Davis S.R., Cousins R.J., Miles R.D., Little R.C. and Ammerman C.B. 2002. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101:161–170.
- Carvalho L.S.S., Rosa D.R.V., Litz F.H., Fagundes N.S., Fernandes E.A. 2015. Effect of the inclusion of organic copper, manganese, and zinc in the diet of layers on mineral excretion, egg production, and eggshell quality. *Braz. J. Poult. Sci.* 087-092
- Celeghini, E.C.C., Albuquerque, R., Arruda, R.P., Lima, C.G. 2001. Avaliação das características seminais de galos selecionados para a reprodução pelo desenvolvimento de crista. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 38, n.4, p.177-183.
- Croxford, T.P., McCormick, N.H. and Kelleher, S.L. 2011. moderate zinc deficiency reduces testicular zip6 and zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. *J. Nutr.* 141(3): 359–365.
- Edens, F.W. and Sefton, A.E. 2009. Sel-Plex® improves spermatozoa morphology in broiler breeder males. *Int. J. Poult. Sci.* 8 (9): 853-861
- Edens, F.W. 2002. Practical applications for selenomethionine: broiler breeder reproduction. In: *Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of 18th Alltech's Annual Symposium*, Edited by Lyons, T.P. and Jacques, K.A., Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 29-42.



- Favero, A., Vieira, S.L., Angel, C.R., Bess, F., Cemin, H.S. and Ward, T.L. 2013. Reproductive performance of Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *J. Appl. Poultry Res.* 22: 80-91.
- Fernandes, J.I.M., Murakami, A.E., Sakamoto, M.I., Souza, L.M.G., Malaguido, A. and Martins, E.N. 2008. Effects of organic mineral dietary supplementation on production performance and egg quality of white layers. *Braz. J. Poultry Sci.* v.10. n.1. p.59 – 65.
- Fromm, D. 1967. some physical and chemical changes in the vitelline membrane of the hen's egg during storage. *J. Food Sci.* v. 32 (1), p. 52-56.
- Garcia, E.R. de M., Olandi, C.C.O., Oliveira, C.A.L., Cruz, F.K. 2010. Quality of eggs of lay hens stored at different temperature and storage conditions. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 11(2):505-518.
- Hanafy, M.H., El-Sheikh, A.M.H. and Abdalla, E.A. 2009. The effect of organic selenium supplementation on productive and physiological performance in a local strain of chicken. The effect of organic selenium (Sel-Plex™) on productive, reproductive and physiological traits of bandarah local strain. *Egypt Poultr. Sci.* 29: 1061-1084.
- Kidd, M.T., Anthony, N.B., Johnson, Z. and Lee, S.R. 1992. Effect of zinc methionine supplementation on the performance of mature broiler breeders. *J. Appl. Poultry Res.* 1:207–211.
- Kienholz, E.W., Turk, D.E., Sunde, M.L and Hoekstra, W.G. 1961. Effects of zinc deficiency in the diets of hens. *J. Nutr.* 75:211–221
- Kirchgessner, M and Grassmann, E. 1970. The dynamics of copper absorption. In: MILLS CF (Ed), *Trace Elements Metabolism in Animals*. Edinburgh: Academic Press, p. 277-287.

- Lapointe, S., Ahmad, I. and Buhr, M.M. 1996. Modulation of post thaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. *J. Dairy Sci.* 12: 2163–2169.
- Yenice, E., Mizrak C., Gültekin M., Atik Z., Tunca M. 2015. Effects of dietary organic or inorganic manganese, zinc, copper and chrome supplementation on the performance, egg quality and hatching characteristics of laying breeder hens. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 63-68.
- Leeson, S., and Summers, J. D. 2001. *Nutrition of the Chicken*. 4th ed. University Books, Guelph, ON, Canada.
- Lin, H., Mertens, K., Kemps, B., Govaerts, T, De Ketelaere, B., De Baerdemaeker, J., Decuypere, E., Buyse, J. 2004. New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane. *Braz. Poult. Sci.* 45 (4), 476-482.
- Mabe IC, Rapp, M, Bain, M, Nys, Y. 2003. Supplementation of a cornsoybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poult. Sci.* 82(12):1903-1913.
- Mahan, D., Zawadzki, J. and Guerrero, R. 2002. Mineral metabolism and boar fertility: observations from Latin American to Europe. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed Industries: Preceedings of Altech's 18<sup>th</sup> Annual Symposium* (T. P. Lyons and K. A. Jacques (Eds)). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 411-418.
- MAPA Normative Instruction No. 62 of August 26, 2003. Official analytical methods for microbiological analysis for control of animal products and water, ministry of agriculture, Livestock and Supply.

- Moreira, J., Santos, C.D., Abreu, C.M.P., Bertechini, A.G., Oliveira, D.F., Cardoso, M.G. 2001. Efeito de fonte e níveis de selênio na atividade enzimática da glutathiona peroxidase e no desempenho de frangos de corte. *Cienc. Agrotec.* v.25, p.664-666.
- Osman, A.M.R., Wahed, H.M.A., and Ragab, M.S. 2010. Effect of supplementing laying hens diets with organic selenium on egg production, egg quality, fertility and hatchability. *Egypt. Poult. Sci.*, 30: 893-915.
- Paik I. 2001. Application of chelated minerals in animal production. *J. Anim. Sci.* 14:191-198.
- Renema, R.A. 2004. Reproductive responses to Sel- Plex® organic selenium in male and female broiler breeders: impact on production traits and hatchability. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium* (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, UK, pp 81-91.
- Richards MP. 1997. Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poult. Sci.* 76:152–164.
- Robinson, D.S., and N.R. King. 1963. Carbonic anhydrase and formation of the hen's egg shell. *Nature.* 199:497–498.
- Rosa, A.P. et al. 1995. Influência de intervalos da inseminação artificial e do estresse do manejo da inseminação na produção e fertilidade de fêmeas avícolas. *Cienc. Rural*, v.25, n.3, p.443-447.
- Rodriguez-Navarro, A., Kalin, O., Nys, Y., Garcia-Ruiz, JM. 2002. Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *Br. Poult. Sci.* 43(3), 395-403.
- Rutz, F, Pan, E.A, Xavier, G.B, Anciuati, M.A. 2003. *Nutritional Biotechnology in the feed and food Industries. Proceedings of Alltech's 19 th Annual Symposium*, Lynons T. P. and Jacques, K. A. eds. Nottingham Universty Press, Nottingham, UK, 147-161.

- Shan, T.I., Dai, P.I., Zhu, P., Chen L., Wu W., Li Y., Li C. 2017. Effect of an Organic Trace Mineral Premix on the Semen Quality, Testicular Morphology and Gene Expression Related to Testosterone Synthesis of Male Broiler Breeders. *Braz. J. Poultry Sci.* v.19, n.3. p. 481-488.
- Şahin, T., Tasdemir A. N. 2017. The effects of organic and inorganic zinc supplemented in breeder hens' rations on hatching traits and chick quality. *Vet Hekim Der Derg* 88(1): 3-12
- Saldanha, E.S.P.B., Garcia, E.A., Pizzolante, C.C., Faittarone, A.B.G., Sechinato, A., Molino, A.B., Laganá, C. 2009. Effect of organic mineral supplementation on the egg quality of semi-heavy layers in their second cycle of lay. *Braz. J. Poultry Sci.* v.11, n.4, p.215 – 222.
- SAS Institute. 2016. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Skandhan, KP. 1992. Review on copper in male reproduction and contraception. *Revue française de gynécologie et d'obstétrique.* 87:594-598.
- Spears, JW. 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *J. Anim. Sci. Technol.* 58:151-163.
- Surai, P. F., Sparks, N. H.C. and Speake, B. K. 2006. The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. Avian Science Research Centre, SAC
- Surai, P.F. 2000. Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *Br. Poult. Sci.* 41:235-243.
- Surai, P.F., Kostjuk, I.A., Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R.C., Ionov, I.A. and Kutz, E. 1998. Effect of vitamin E and selenium of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes and liver. *Biological Trace Element Research* 64: 119-132.

- Świątkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., Jozefiak, D. 2014. The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. *Worlds Poult Sci J.* 70:475-486.
- Swiatkiewicz, S., and Koreleski, J. 2008. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. *Vet. Med.* 53:555–563.
- Swinkels, J.W.G.M., Kornegay, E.T. and Verstegen, M.W.A. 1994. Biology of zinc and biological value of dietary zinc complexes and chelates. *Nutr Res Rev.* 7: 129-149.
- Stefanello, C., Santos, T.C., Murakami, A.E., Martins, E.N., Carneiro, T.C. 2014. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. *Poult. Sci.* 93 :104–113.
- Sun, Q., Guo, Y., Ma, S., Yuan, J., AN, S. and Li, J. 2012. Dietary mineral sources altered lipid and antioxidant profiles in broiler breeders and posthatch growth of their offsprings. *Biol. Trace Elem. Res.* 145: 318-324.
- Vieira, S.L. 2008. Chelated Minerals for Poultry. *Braz. J.Poultry Sci.* v.10. n.2. p. 73 – 79.
- Yannakopoulos, A.L., Tservenigousi, A.S. 1986. Quality characteristics of quail eggs. *Br. Poult. Sci.*, 27, 171–176.

**Table 1**

Composition of the basal diet and nutritional levels used.

Ingredients	BD	BD+500gOMM	BD+800gOMM
Corn (g/kg)	650.22	650.22	650.22
Soybean meal (460 g/kg protein) (g/kg)	241.73	241.73	241.73
Soybean oil (g/kg)	1.49	1.49	1.49
Dicalcium phosphate (180 g/kg P; 210 g/kg Ca) (g/kg)	10.66	10.66	10.66
Limestone (380 g/kg Ca) (g/kg)	81.88	81.88	81.88
Salt (g/kg)	4.00	4.00	4.00
Vitamin and inorganic mineral premix <sup>1</sup> (g/kg)	10.0	10.0	10.0
Organic minerals <sup>2</sup>			
Copper amino acid chelated (mg/kg)	-	2.5	4
Manganese amino acid chelated (mg/kg)	-	20	32
Zinc amino acid chelated (mg/kg)	-	27.5	44
Iron amino acid chelated (mg/kg)	-	17.5	28
Selenium yeast (mg/kg)	-	0.08	0.128
Iodine (mg/kg) <sup>3</sup>	-	0.6	0.96
Calculated Nutritional Composition (g/kg)			
Crude Protein	17.00	17.00	17.00
Metabolizable energy (kcal/kg)	2768	2768	2768
Calcium	35.0	35.0	35.0
Available Phosphorus	3.0	3.0	3.0
Nutritional composition analysed (g/kg)			
Crude protein	16.58	15.49	15.60
Gross energy (kcal/kg)	3893	3958	3884
Ash	14.38	13.29	15.69
Calcium	33.5	33.4	33.3
Total P	5.1	5.1	5.1

<sup>1</sup> Mineral and vitamin premix: levels per kg of diet (DSM Nutritional Products Ltd.): vitamin A 1500 UI; vitamin D3 4500 UI; vitamin E 80 UI; vitamin K3 5mg; vitamin B1 3.5mg; vitamin B2 12mg; vitamin B6 6mg; vitamin B12 40mcg; niacin 60mg; pantothenic acid 20mg; biotin 0.4mg; folic acid 3mg; iron 60mg; copper 10mg; zinc 75mg; manganese 70mg; ascorbic acid 0.15mg; selenium 0.3mg; iodine 10mg; methionine 1.04g; phytase 600 FYT/g; cobalt 1mg; enramycin 5mg; lysine 0.15g; Protease 11250 Prot/kg

<sup>2</sup> Yes Sinergy Brazil (Yes Minerals 360 – Poultry)

<sup>3</sup> Inorganic iodine (Yes Minerals 360 – Poultry)

**Table 2**Egg production of laying hens fed diets with organic micro minerals<sup>1</sup>

Age (wk)	Treatments			SEM*	P-Value
	BD	BD+500gOMM	BD+800gOMM		
36	75.59	74.13	77.38	6.15	0.1370
37	75.00	77.38	75.85	4.28	0.5418
38	82.73	83.63	87.50	5.49	0.2072
39	82.14	80.35	86.60	6.39	0.1565
40	80.19	81.94	83.03	8.65	0.8043
41	78.87	80.65	85.41	7.06	0.1838
42	80.65	83.92	80.65	8.71	0.6910
43	76.48 <sup>b</sup>	77.21 <sup>ab</sup>	83.63 <sup>a</sup>	5.30	0.0275
44	77.21 <sup>b</sup>	77.67 <sup>b</sup>	84.69 <sup>a</sup>	4.34	0.0065
45	71.72 <sup>b</sup>	75.89 <sup>ab</sup>	84.01 <sup>a</sup>	7.12	0.0112
46	77.21	77.38	78.57	7.78	0.9321
47	74.40	76.48	75.26	9.49	0.9077
48	75.59	75.59	82.27	8.62	0.2254
49	72.02 <sup>b</sup>	77.97 <sup>ab</sup>	82.14 <sup>a</sup>	6.98	0.0285
50	73.47	77.38	76.19	8.12	0.6449
51	72.91	74.70	77.97	4.85	0.1317
52	72.79	77.67	77.68	6.84	0.3104
53	77.21	74.10	73.51	7.01	0.5653
54	71.27	73.80	73.80	7.79	0.7581
55	66.96	72.91	72.91	8.91	0.3245
<b>Average (36-55 wk)</b>	75.68	77.41	79.72	4.33	0.1976

<sup>a-b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

<sup>1</sup> Data represent means from 8 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 8

**Table 3**Parameters on eggs quality from hens from 36 to 55 weeks of age<sup>1</sup>

Variables	Treatments			SEM*	P Values
	BD	BD+500gOMM	BD+800gOMM		
Egg weight (g)	59.95	59.22	58.67	1.57	0.2863
Yolk weight (g)	16.69	16.72	16.66	0.47	0.9634
Albumen weigh (g)	38.03	37.24	36.94	1.13	0.1692
Eggshell weight (g)	5.22	5.24	5.10	0.20	0.3337
Specific gravity (g/cm <sup>3</sup> )	1083.9	1084.8	1083.7	1.49	0.3731
Haugh unit	95.01	94.92	94.84	1.19	0.9581
Yolk index	0.44 <sup>a</sup>	0.44 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.93	0.0092
pH of yolk	5.92	5.94	5.93	0.03	0.6171
pH of albumen	8.34	8.30	8.31	0.09	0.6989
Eggshell thickness (mm)	0.373	0.377	0.371	10.40	0.5150
Shell strength (N)	35.79	35.07	34.78	3.08	0.7979

<sup>a-b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

<sup>1</sup> Data represent means from 8 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 8



**Table 4**Sperm quality of males during the experimental period (36 to 55 weeks of age) <sup>1</sup>

Variables	Treatments			SEM*	P Values
	BD	BD+500gOMM	BD+800gOMM		
Volume (mL)	1.21	0.96	0.98	0.30	0.1054
Motility (%)	89.30	89.13	90.90	3.79	0.4608
Vigor <sup>2</sup>	3.91 <sup>b</sup>	4.16 <sup>ab</sup>	4.21 <sup>a</sup>	0.27	0.0262
pH	7.98	7.98	7.95	0.07	0.6402
Concentration <sup>3</sup>	3.89	3.74	3.69	0.67	0.7550
TAS (%)	4.97	4.24	5.08	1.79	0.4650
AH (%)	2.21	1.98	2.38	0.84	0.5212
AIP (%)	2.35	2.08	2.41	0.89	0.6421
AT (%)	0.31	0.30	0.21	0.18	0.3174

<sup>a - b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

<sup>1</sup> Data represent means from 12 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 12

<sup>2</sup> Sperm vigor (1-5 scores)

<sup>3</sup> Sperm concentration (number of cells x 10<sup>9</sup> mL of semen)

TAS = Total abnormal spermatozoa, AH = abnormality of head, AIP = Abnormality of intermediate piece, AT = Abnormality of tail

**Table 5**

Reproductive responses (%) evaluated during the experimental period by laying breeders hens from 36 to 55 weeks of age<sup>1</sup>

Variables	Treatments			SEM*	P Values
	BD	BD+500gOMM	BD+800gOMM		
Hatchability	84.47	85.15	87.72	4.63	0.3527
Hatchability of fertile eggs	92.64	89.94	92.73	2.61	0.0750
Fertility	90.98 <sup>b</sup>	95.08 <sup>a</sup>	95.54 <sup>a</sup>	2.99	0.0130
Total Embryonic mortality	5.62	6.53	6.02	2.30	0.7347
EM1 <sup>2</sup>	1.54	1.56	1.83	0.98	0.8002
EM2 <sup>3</sup>	1.06	1.39	0.84	0.75	0.3548
EM3 <sup>4</sup>	1.12	1.24	0.84	0.65	0.4723
EM4 <sup>5</sup>	1.89	2.33	2.49	1.21	0.5959
Pipped	1.27	1.63	1.06	0.95	0.4929
Second quality chick	1.60	1.27	1.74	1.01	0.6450
Chick weight (g)	41.46	41.55	40.79	1.00	0.2866

<sup>a - b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different (P≤0.05)

<sup>1</sup>Data represent means from 8 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 8, Weekly incubations, in total: 20

<sup>2</sup>EM1 = embryonic mortality at the first 48 h of incubation.

<sup>3</sup>EM2 = embryonic mortality occurring between d 3 and 7 of incubation.

<sup>4</sup>EM3 = embryonic mortality occurring between d 8 and 14 of incubation.

<sup>5</sup>EM4 = embryonic mortality occurring between d 15 and 21 of incubation.

## 5. CAPÍTULO III

### **SUPPLEMENTATION OF ORGANIC MICRO MINERALS AND CALCIUM AMINO ACID CHELATED OR SEAWEED (*LITHOTHAMNIUM CALCAREU*) ON THE PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF LAYING BREEDER HENS**

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas para publicação no Periódico **Animal Feed Science and Technology**.

**Supplementation of organic micro minerals and calcium amino acid chelated or seaweed (*Lithothamnium calcareu*) on the productive and reproductive characteristics of laying breeder hens**

A. Londero<sup>a,\*</sup>, A. P. Rosa<sup>a</sup>, F.G. Luiggi<sup>b</sup>, D. P. Rosa<sup>a</sup>, A. Ertmamm<sup>a</sup>, A. B. Mariani<sup>a</sup>, J. de Camargo<sup>a</sup>, M. Pittaluga<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Poultry Science Laboratory, Department of Animal Sciences, Federal University of Santa*

*Maria, RS, Brazil;*

<sup>b</sup>*Yes Sinergy of the Brazil, SP, Brazil*

Abbreviations: OMM, organic micro minerals; LCa, *Lithothamnium calcareum*; CaCh, calcium chelated; BW, body weight; YI, yolk index; EM, embryonic mortality.

\*Corresponding author. Tel.: +55 55 32208269; Fax: +55 32208269

E-mail address: vetelondero@hotmail.com

## ABSTRACT

This experiment was carried out to evaluate the effects of diet supplementation with organic micro minerals (OMM) added to inorganic minerals and calcium amino acid chelated or seaweed calcium (*Lithothamnium calcareum*) on performance, egg quality, sperm quality and hatching characteristics of laying breeder hens. A total of 192 White Plymouth Rock hens and 48 Red Rhodes Island males were used in the randomly distributed in a factorial arrangement ( $2 \times 2$ ) totaling 8 replicates with 6 hens each and 12 replicates with 1 male each, from 36 to 55 wks of age. From a complete basal diet (composed with inorganic minerals) were made 4 diets with 2 levels of supplementation of organic micro minerals: 500g of organic mineral product by ton of diet (2.5mg Cu, 17.5mg Fe, 20mg Mn, 27.5mg Zn and 0.08mg Se per kg of diet) (500OMM) and 800g of organic mineral product by ton of diet (4mg Cu, 28mg Fe, 32mg Mn, 44mg Zn and 0.128mg Se per kg of diet) (800OMM) and 2 types of calcium: calcium amino acid chelated (CaCh) – 0.155g/kg of diet and calcium from *Lithothamnium calcareum* (LCa) algae – 1.6g/kg of diet. Hens were artificially inseminated once a week with semen from males fed with same treatment. Egg production, feed conversion and egg weight were not affected by diets used. An increase in the yolk, eggshell, specific gravity and shell thickness were observed in eggs from hens fed with CaCh on diets ( $p=0.0397$ ,  $p=0.0059$ ,  $p=0.0092$ ,  $p=0.0339$ ). An increase in the albumen was observed in eggs from hens fed with LCa on diets ( $P=0.0027$ ). Concentration and abnormal spermatozoa were not affected by diets used. Sperm volume was higher in males fed with 500OMM on diets ( $p=0.0445$ ). Motility ( $p=0.0044$ ) and sperm vigor ( $p=0.0046$ ) were improved in males fed with CaCh on diets. Incubation parameters were not affected by treatments. In conclusion, the different levels of OMM did not affect the production and reproduction parameters on hens, except the seminal volume. The Ca chelated has positive effects on egg quality and sperm.

**Keywords:** breeder males, egg production, hatching, spermatozoa, trace mineral.

## 1. Introduction

Minerals are nutrients involved in a high number of metabolic pathways, and it is largely accepted that many of their functions are still not well understood (Vieira, 2008). In poultry nutrition, the minerals are typically classified as macro or micro minerals. The classification of the essential minerals into major elements and trace elements depends upon their concentration in the animal or amounts required for them. Macro elements are expressed as a percentage of feeds or tissues, and are mostly involved in structural functions. Microelements, or trace minerals, are more difficult to be assessed through analysis due to their very low concentrations in animal tissues and the limitations in equipment and techniques (Vieira, 2008). Normally, micro elements are present in the animal body in a concentration not greater than 50 mg/kg and are required at less than 100 mg/kg diet (McDonald et al., 2011). The macro-minerals include calcium (Ca), phosphorus (P), chlorine (Cl), magnesium (Mg), potassium (K), and sodium (Na). The micro minerals include copper (Cu), iodine (I), iron (Fe), manganese (Mn), selenium (Se), and zinc (Zn) (McDonald et al., 2011).

Micro minerals are essential for hens by performing various functions therefore; there is an increasing interest in studying factors that improve absorption and metabolization of these micro elements. Organic sources or metal chelates have been used with the aim of enhancing micro mineral bioavailability by binding minerals to organic molecules, allowing the formation of structures with unique characteristics and high bioavailability (AAFCO, 1997). Organic minerals comprise metal ions chemically linked to an organic molecule, thereby forming chemical structures with unique stability (AAFCO, 2005). Organic structures are stable in the digestive tract and are preferentially absorbed because they are protected

from forming complexes with other diets components (Ammerman, 1998). The most commonly used organically-complexed minerals include zinc, manganese, selenium, copper and iron.

Micro minerals are essential to the diets of poultry because they participate in the biochemical processes required for normal growth and development, including bone and eggshell formation and development of the avian embryo (Richards, 1997). Favero et al. (2013) evaluating organic amino acid complexes with Zn, Mn and Cu found improved hatchability of fertile eggs. Soni et al. (2014) reported no effect of organic minerals on egg production; however, Rajendran et al. (2012) observed an improvement in laying percentage of hens that received chelated minerals. Barber et al. (2005) suggested in your research on broiler breeder that micro minerals (Se, Mn and Zn) act at the reproductive tissue level during spermatogenesis to improve semen quality.

Organic minerals can occur in several forms including amino acid complex, amino chelate, mineral proteinate, and a mineral polysaccharide complex (Spears, 1996). They are more stable and are more protected biochemically from the adverse reactions with other dietary nutrients, which could reduce their rate of absorption. In addition of the normal ion absorption mechanisms in the intestines, chelated minerals are also absorbed through the same path ways as the organic molecules with which they are complexed, thereby avoiding competition among minerals for the same carrier, and making them more readily transportable and absorbable for subsequent utilization by the body (Clydesdale, 1998).

Laying hens have a high demand for Ca, especially during peak of egg production when Ca output is greatest. Calcium metabolism is also is high in the later stages of egg production, when hens have a decrease in Ca absorption efficiency (al-Batshan et al., 1994). The dietary Ca source for laying hens in production phase is typically limestone or oyster

shell. However, much has been reported on the use of organic micro minerals in poultry nutrition (Grimes et al 2004).

Due to the high calcium requirements of commercial layers and of layer and broiler breeders, the knowledge on calcium sources that can replace or be used in association with calcitic limestone or oyster shell is essential in order to improve or to maintain performance and eggshell quality with the use of renewable calcium sources (Pelícia et. al, 2007). The searches for new alternatives that are not derived from rocks, of greater bioavailability, are extremely importance to maximize performance animal and minimize costs. The *Lithothamnium calcareum* belongs to the group of red algae or rhodophytes, the family of Corallineacea are calcareous algae in appearance, because it absorbs the calcium carbonate and magnesium (Melo and Moura, 2009). The seaweed calcareous flour (*Lithothamnium calcareum*) could be used as an alternative source of calcium.

The objective of this study was to evaluate two levels of organic micro minerals in addition to inorganic minerals and calcium amino acid chelated or calcium from seaweed (*Lithothamnium calcareum*) in diets of laying breeder hens, male and female, on the performance, egg quality, incubation parameters and sperm quality.

## **2. Material and methods**

The present study was carried out in the Poultry Science Laboratory - LAVIC at the Federal University of Santa Maria (UFSM). This study was based on compliance with the Welfare Standards and was approved by the Ethics Committee of UFSM. A total of 192 White Plymouth Rock females were standardized by weight and egg production and 48 Red Rhodes Island males were standardized by body weight and phenotypic characteristics. The trial was conducted from 36 to 55 weeks of age divided in experimental periods to 28 days.



The females and males were distributed to individual cages 0.33x0.45x0.40m and 0.33x0.60x0.60m, respectively. During the experimental period the females were artificially inseminated once a week (0.05ml of semen/dose) (Rosa et al. 1995). Artificial insemination was performed between males and females fed with the same treatment. Feed and water was providing for *ad libitum* consumption, and a photoperiod was gradually increased up to 16 hours remaining at this level until the end of experiment.

### *2.1 Treatments*

Hens were fed the same basal diet (corn and soybean meal) up to 35 wks of age. At 36 weeks of age, the basal diet was supplemented with micro minerals in the organic source. The micro elements used: Cu, Fe, Mg and Zn chelated to amino acid and, a metal proteinate in the form of selenium (Se) yeast were added to basal diet (Table 1) content inorganic mineral (10mg Cu, 60mg Fe, 70mg Mn, 75mg Zn and 0.3mg Se per kg of diet). Females and males were distributed in the  $2 \times 2$  factorial arrangement: 2 levels of organic micro minerals (supplemented to inorganic dietary minerals): 500g of the micro minerals by ton of diet (2.5mg Cu, 17.5mg Fe, 20mg Mn, 27.5mg Zn and 0.08mg Se per kg of diet) (5000MM) or 800g of the micro minerals/ton of diet (4mg Cu, 28mg Fe, 32mg Mn, 44mg Zn and 0.128mg Se per kg of diet) (8000MM) and 2 source of calcium: the Calcium Amino Acid Chelated (CaCh) – 0.155g/kg of diet or Calcium from *Lithothamnium calcareum* (LCa) algae – 1.6g/kg of diet.

### *2.2. Experimental design and statistical analysis*

The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement with 2 levels of organic micro minerals: 5000MM or 8000MM and 2 source of calcium (calcium amino acid chelated and Calcium from *Lithothamnium calcareum* alga) in 4 treatments with 8 replicates with 6 hens each in the female's trial and 12 replicates with 1 male each for male's trial. All data were subjected to analysis of variance (ANOVA) to evaluate the effect of levels to organic micro minerals, calcium and their interaction. When it was observed significant differences at 5% in the variance average it was applied Tukey test for comparison among treatments. Statistical procedures were performed by using the SAS software (2016).

### *2.3. Hens performance and eggs quality*

At the end of each 28 day period the body weight (BW), feed intake (g/hen per day), feed conversion (kg of feed/dozen eggs and kg of feed/kg of eggs) were measured. Eggs were collected and recorded 4 times per day and the egg production by housed hens was calculated weekly.

Egg weight, yolk weight, albumen weight, eggshell weight, specify gravity, Haugh unit, yolk index and pHs were determinates weekly, totalizing 20 analyzes in the total experimental period. A total of 24 eggs/treatment (8 replicates of 3 eggs each one) were used in the specify day of each experimental week using to realized this analyzes. Egg weight, yolk weight and albumen weight were measured with precision scale (0.001g). The egg specify gravity was determined throughout the immersion of the eggs in saline solutions with densities of 1070; 1075; 1080; 1085; 1090; 1095 and 1100g/cm<sup>3</sup> using Archimede's principle as described by Peebles and McDaniel (2004). After this analysis, a sample of 3 eggs per experimental unit were used for the determination of the albumen height. Measurements in millimeters (mm) were related to the weight of the egg, thereby determining the Haugh unit:

$100 * \log (H - 1.7 W^{0.37} + 7.6)$ , H = where albumen height (mm) and W = egg weight (g). To calculate the yolk index (YI) the height (mm) and yolk diameter at two points were measured with the aid of a digital caliper to calculate the YI: height of the yolk over the average yolk diameter. The 3 yolks and the 3 albumin samples were mixed separately to measure the pHs using a digital bench top pH meter.

The eggshell was weighed after being washed and dried in ambient temperature by 72 hours (Rodriguez-Navarro et al., 2002). Shell thickness and resistance force of the shell were determinate every 28 days (totaling 5 analyzes in the total experimental period). Shell thickness was measured with the Electronic Outside Micrometer 0.001 mm at three equatorial points on three intact eggs per experimental (Lin et al., 2004). The strength, kilogram-force, was obtained using a texturometer TA.XT2 Texture Analyzer with a delrin probe with a 5-mm diameter (Texture Technologies Corp. and Stable Micro Systems Ltd., Hamilton, MA).

#### *2.4. Males performance and sperm quality*

Daily feed intake (g/male per d) and body weight were calculated every period. Semen was collected biweekly by the dorsal-abdominal massage method (Rosa, 1995), in graduated Falcon tubes kept in a water bath at 37°C. After the collection, the volume of the ejaculate was verified and later the parameters of motility, vigor and pH. Motility (percentage of moving spermatozoa - rectilinear and progressive) and vigor (type of motility) were determined. For this analysis, 5µL of semen were deposited on a warm slide and observed in light microscopy, with a magnification of 200x. The pH value of the fresh semen was measured by using a colour-scaled pH meter (MColorpHast™; Merck Millipore, Billerica, MA, USA). For the analysis of concentration and sperm morphology were added 5µL of semen in 5mL of formalin: citrate solution. In order to determine the spermatic concentration,

the semen was diluted in a ratio of 1: 1000, to perform the count of the sperm cell in a hemocytometer (Neubauer Camera) with a result expressed in number of cells per mm<sup>3</sup> of semen according to the technique described by Brillard and McDaniel (1985). The result was transformed to number of cells per ml of semen. A total of 100 spermatozoa were counted under the oil immersion on the phase contrast microscope (magnification of 1000x) and classified as either normal or abnormal (categorized into abnormality of head, intermediate piece and tail), and the total percent of normal or abnormal spermatozoa was calculated.

### *2.5. Incubation parameters*

To evaluate hatchability, hatchability of fertile, fertility, embryonic mortality, pipped eggs, quality and weight of chick, eggs were incubated every week (total 20 incubations). Only clean and without visible abnormalities eggs were considered suitable for incubation. All eggs daily collected were classified and separated to incubation per experimental unit. Those eggs that were considered suitable for incubation were stored for a maximum period of 7 days in a controlled temperature room (18 to 20°C and 75 to 80% RH). The incubation was carried out in a commercial multi-stage incubator (Casp, Amparo, SP, Brazil) at 37.5°C and 60% RH. At 18 days, the eggs were transferred to the hatcher with 36.5 °C and 65% relative humidity. The hatching rate was determined in relation to the total incubated eggs. Fertility refers to the percentage of incubated eggs that are fertile while hatchability of fertility is the percentage of fertile eggs that hatch. Chicks were taken out of the hatcher, weighed and classified into first and second quality chicks. Chicks were considered second quality when they possessed bad umbilical scarring, beak abnormalities, leg weakness or excessively wet downy feathers. To evaluate the hatching rate of fertile eggs, fertility and embryonic mortality, the nonhatched eggs were submitted to embryo diagnostics. In this evaluation, eggs

were classified, through macroscopic visual examination as infertile or as: Embryonic mortality at the first 48 hours of incubation (EM1); Embryonic mortality occurring between 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day of incubation (EM2), Embryonic mortality occurring between 8<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of incubation (EM3); Embryonic mortality occurring between 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of incubation (EM4); and pipped eggs – those that have broke the shell however not emerged at the time of removal of chicks from the hatcher and the embryos still alive.

### **3. Results**

#### *3.1. Hens performance and eggs quality*

Body weight and feed intake were not affected by different treatments ( $P>0.05$ ; data not shown). Egg production, feed conversion and egg weight were not affected ( $P>0.05$ ) by level of OMM supplementation or sources of Calcium on the breeder hens' diets during the total experimental period (Table 2). An increase in the yolk ( $P=0.0397$ ), eggshell ( $P=0.0059$ ), specific gravity ( $P=0.0339$ ) and shell thickness ( $P=0.0092$ ) were observed in hens fed with CaCh on diets (Table 3). The diets did not affect the shell strength ( $P>0.05$ ; data not shown). The percentage of albumen was higher in hens fed with LCa ( $P=0.0027$ ). Haugh unit and yolk index were not affected by the treatments. The diets did not affect the albumen pH and yolk ( $P>0.05$ ; data not shown).

#### *3.2. Males performance and sperm quality*

No significant interaction was observed between the OMM supplementation and source of Calcium ( $P>0,05$ ). The different levels of OMM supplementation or source of

calcium did not affected the body weight and feed intake of males ( $P>0.05$ ; data not shown). The sperm quality of males is shown in Table 4. Sperm volume was higher in males fed with 500OMM ( $P=0.0445$ ). Motility ( $P=0.0044$ ) and sperm vigor ( $P=0.0046$ ) were improved in males fed with CaCh on diets. Concentration, total abnormal spermatozoa, abnormality of head, abnormality of intermediate piece, abnormality of tail and spermatic pH ( $P>0.05$ ; data not shown) were not affected by diets used.

### *3.3. Incubation parameters*

Egg incubation results are described in Table 5. Hatchability, hatchability of fertile eggs, fertility, total embryonic mortality, second quality chick and chick weight were not affected by the level of OMM supplementation or source of calcium. Eggs pipped, EM1, EM2, EM3, EM4 were also not influenced by diets ( $P>0.05$ ; data not shown).

## **4. Discussion**

### *4.1. Hens performance and eggs quality*

There was no effect of levels of supplementation of micro minerals or source of calcium on the egg production, body weight, feed intake, feed conversion, and egg weight. This finding are similar the study of Stefanello et al. (2014) that supplemented diets of laying hens with organic micro minerals (Mn, Zn, and Cu) and did not observed effect of micro minerals on the rate of posture, feed intake, feed conversion (kg/dz and kg/kg). Several other previous studies did not report the effects of organic micro minerals on egg production (Carvalho et al., 2015), feed intake, and feed conversion (Fernandes et al., 2008; Yenice et al.,

2015). Pelícia et al. (2007) evaluated the supplementation of marine calcium on diet of laying hens and did not found effect on the egg production, egg weight, egg mass, feed intake, feed conversion ratio per dozen eggs and per kg eggs. Grimes et al. (2004) evaluated the use of chelated calcium proteinate dietary supplement on the reproductive performance of large white turkey breeder hens and not found effect on egg production, body weight and egg weight.

According Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2005) the organic minerals are metallic ions chemically bond to an organic molecule, forming structures with unique characteristics of stability and having high mineral bio-availability. In the organic form, minerals are absorbed by intestinal carriers of amino-acids and peptides and not by classical intestinal transporters. This prevents the competition among minerals by the same absorption mechanism. Thus, not only bio-availability becomes superior but also minerals in organic form are readily transported to the tissues, where they are kept stored for a longer time compared to inorganic minerals (Lopes et al., 2018). These metals complexes may improve egg production and decrease mortality and stress, as well as reduce the excretion of potentially contaminant minerals in environment, as they are absorbed and retained in the poultry body (Fernandes et al., 2008). Despite this, in this study and in other studies previously cited, this positive effect was not seen in the performance parameters of poultry breeders. This result can be justified by the fact that the hens received a basal diet composed with sufficient quantities of micro minerals for their needs, which hindered the positive effect of organic minerals.

The yolk (%), eggshell (%), specific gravity and shell thickness were higher in eggs from hens fed with CaCh on diets and the shell strength did not affect by diets. Calcium is one of the key nutrients required for production and optimal eggshell quality of laying hens (Ahmed et al., 2013). The results of this study indicate that chelated calcium becomes more

available to the hen's eggshell formation needs. Disagreeing with the results obtained in this study, Grimes et al. (2004) not observed effect on specific gravity and shell thickness when evaluated the use of chelated calcium proteinate dietary supplement on turkey breeder hens. Moreover, Carvalho et al (2015) evaluated the inclusion of organic minerals (Cu, Mg and Zn) in the diet of layers and not found on the specific gravity of eggs. Yenice et al. (2015) observed the effects of dietary organic or inorganic Mn, Zn, Cu, and Cr supplementation on the laying breeder hens and not observed effect on eggshell rate and eggshell thickness. This author observed that addition of the micro mineral mixture in the organic form positively affected Ca bioavailability of laying hens at late phase. It is estimated that the organic form (methionine chelate) decreased the amount of free micro mineral ions in the small intestine and Ca was prevented from forming insoluble compounds with these minerals, thereby increasing the absorption of Ca.

In this study, the albumen (%) was higher in hens fed with algae LCa. This result may be related to the greater solubility of calcium from *Lithothamnium calcareum*, observed fact by Melo et al. (2006), where they evaluated the *in vitro* solubility of various sources of calcium and observed that the calcareous algal flour *Lithothamnium calcareum* presented higher values of solubility than the other sources studied. According to Assoumani (1997) use of algae calcium (*Lithothamnion calcareum*) has advantages by the high availability of the nutrients that are adsorbed on cell walls, facilitating their assimilation to animals and improving the absorption of calcium and high porosity, which leads to an increase in specific surface area. On the other hand, Pelícia et al. (2007) did not observe effect of supplementation of marine calcium *Lithothamnium* on diet of laying hens on albumen (%), yolk (%) and eggshell thickness.

Haugh unit, yolk index, albumen pH and yolk were not affected by the levels of supplementation of micro minerals or source of calcium. In this way, the results of this study



are similar with those obtained by Saldanha et al. (2009) that evaluated the effects of dietary mineral supplement sources and levels on egg quality of layers. They observed no effect on Haugh unit and yolk index. Fernandes et al. (2008) evaluated the Haugh unit and not found influence by any supplementation level of organic micro minerals (Zn, Mn and Se) on this parameter as compared to birds fed exclusively inorganic sources.

Pelícia et al. (2007) evaluating the 0, 15, 30, 45, and 60 % of calcitic limestone replacement by marine calcium source (*Lithothamnium calcareum*) in commercial layer diets not found difference on Haugh units. This finding are similar the results of this study.

#### 4.2. Males performance and sperm quality

The different levels of OMM supplementation or source of calcium did not affect the body weight and feed intake of males. Sperm volume was higher in males fed with 500gOMM level of organic micro minerals. The results of this study are similar with those obtained by Shan et al. (2017) that evaluated the semen quality of male broiler breeders fed inorganic and organic micro mineral (Zn, Mn, Cu, Fe and Se) premix and observed that the body weight were not different between groups. However, this author found a significant increase in semen parameters in organic mineral group such as semen volume, density, motility, and number of normal sperm. Also, Murugesan et al. (2015) evaluated levels of organic Zn proteinate (0; 100 and 100mg/kg) and selenomethionine in yeast protein (0; 0.15 and 0.35mg/kg) and concluded that dietary with 100mg/kg Zn and 0.35mg/kg Se improved percent live sperm. Agreeing with the results of this study, Shanmugam et al. (2014) observed the organic zinc (100mg/kg Zn) and selenium (0.15 and 0.35mg/kg Se) supplementation in diets of layer breeders and did not found effect of the different level on the sperm volume.

In this study, when the algae calcium was compared with the organic calcium, the calcium from an organic source (calcium amino acid chelated) showed better sperm motility and vigor, suggesting a better use of this form of the mineral by males. This result can be justified by the greater stability during digestion, along with absorption and transport via peptide and amino acid routes, results in higher biological availability by the minerals on the organic form (Nys et al., 2004).

High levels of calcium, provided during the reproductive period, prevent the absorption of some minerals such as manganese, zinc and magnesium, thus affecting the performance of the roosters (Waldroup, 1996). However, Rutz et al. (1999) evaluated the Leghorn roosters fed with different levels of dietary Ca (0.35; 0.65; 3.15 and 3.5%) and concluded that the semen volume, sperm production and motility were not influenced by dietary treatments. These results indicate that roosters may be fed diets containing 3.5% calcium usually given to hens, without adversely affecting their reproductive performance. These results are in agreement with the findings in this study where the calcium level of the male diet used was the same as that of females and these levels did not compromise the action of the micro minerals and the reproductive parameters of males.

Research has been showed that the minerals can alter reproductive functions. Se is a crucial factor in maintaining appropriate antioxidant defenses during embryonic development and spermatogenesis (Surai, 2002). Zinc deficiency first impairs angiotensin converting enzyme (ACE) activity, and this in turn leads to depletion of testosterone and inhibition of spermatogenesis. Defects in spermatozoa are frequently observed when the males are submitted to zinc-deficient diet. Zinc is thought to help to extend the functional life span of the ejaculated spermatozoa (Bedwal and Bahuhuna, 1994). According to Skandhan (1992) Copper is involved in spermatozoa motility and it may also act at the pituitary receptors which control the release of luteinizing hormone (LH). In the seminal fluid, the level of

copper seems to fall in cases of azoospermia and to increase in oligo- and asthenozoospermia. Mn is a potent stimulator of sperm motility through the stimulation of adenylate cyclase activity (Lapointe et al. 1996). Bansal and Bilaspuri (2008) concluded that Mn was a useful antioxidant, reducing the oxidative stress in addition to improving sperm motility and viability under in vitro. Calcium accounts for 56% of the motility stimulating activity of fowl spermatozoa and also fowl seminal plasma (Lertchunhakiat et al, 2016). Despite the necessity and beneficial effects of these minerals on spermatid quality, in this study, the different levels of minerals on diets were not affected the concentration, total abnormal spermatozoa, abnormality of head, abnormality of intermediate piece, abnormality of tail and spermatid pH. However, Aghaei et al (2010) reported that there was positive correlation between copper and zinc concentrations of seminal plasma and progressive motility percent of spermatozoa.

#### *4.3. Incubation parameters*

The levels of organic micro minerals supplementation or sources of calcium showed no interactions and not affected the incubation parameters evaluated as hatchability, hatchability of fertile eggs and fertility. However, Yenice et al. (2015) compare the effects of organic or inorganic Mn, Zn, Cu and Cr mixture at two different levels and concluded that the dietary supplementation of organic minerals at high levels (80, 60, 5 and 0.15mg/kg, respectively) increased the hatchability of the fertilized eggs and hatchability compared to that of the other groups. El-Samee et al. (2012) evaluated the fertility and hatchability of laying quails fed diets supplemented with organic zinc or chromium yeast and observed that the high levels of organic zinc (6.0mg zinc/kg) or chromium yeast (1.2mg Cr/kg) diet tended to improve egg fertility, however, the hatchability was lower with the use of higher level of Zn. Nevertheless, Oliveira et al. (2015) observed the effects of *in ovo* injection of organic zinc,

manganese, and copper on the hatchability and concluded that the level 0.544, 0.260, and 0.030mg/ml of Zn, Mn, and Cu negatively affected the hatchability of fertile eggs.

The organic minerals (Se, Mn and Zn) can positively affect the reproductive efficiency through the cockerel nutrition. This is because gametes are very sensitive to oxidative damage, leading to poor fertility and fewer fertile eggs (Pickard, 2016). In studies with micro minerals, Favero et al. (2013) found improved hatchability of fertile eggs ( $P < 0.05$ ) and not showed effect on hatchability and fertility and, they observed a reduction in early embryo mortality in eggs laid by hens fed with inorganic and organic minerals on top diet of breeder hens compared with the control diet. In this study, the total embryonic mortality or embryonic mortality at different stages of incubation, M1, M2, M3 and M4 were not affecting by use levels of OMM supplementation or by the sources of Calcium. Grimes et al. (2004) evaluated the effect of a chelated calcium proteinate dietary supplement on turkey breeder hens and they was observed increased hatchability of fertile eggs produced late in hens fed the chelated Ca proteinate which was associated, with decreased late embryo mortality. Few studies are found with *Lithothamnium calcareu* in the diet of poultry breeders on the incubation parameters.

The second quality chick and chick weight were not affected by the level of minerals in chelated form or the supplementation of source of the Calcium. Therefore the lowest level of organic micro minerals can be used because it guarantees the quality of the chicks. In this way, the results of this study are consistent with those obtained by El-Samee et al. (2012) evaluated laying quails fed diets supplemented with two levels of organic zinc (3.0 or 6.0mg zinc/kg) or chromium yeast (0.6 or 1.2mg Cr/kg) and did not observed effect on hatching chick weight.

Kienholz et al. (1961) found that increasing dietary Calcium from 2.25 to 4.00% potentiated a zinc deficiency, resulting in severe abnormalities on chicks. However, in this study, the two source of calcium supplemented in the diet do not negatively affect the quality

and weight of the chicks. Therefore, we believe that the sources of calcium analyzed in this study are better absorbed by their shape and thus avoid competition with other minerals, which guarantees them maximum utilization.

In general, micro minerals function either as catalytic or structural cofactors in metal-containing enzymes and proteins that are contained in the cells of the embryo and its extra embryonic membranes. It is crucial to the survival of the embryo that the amount required of each essential micro mineral must be available at the appropriate time during its growth and development within the egg. However, excessive amounts of micro minerals, especially those that are acutely toxic, can be detrimental to the developing embryo (Richards, 1997). In this study, the different levels of micro minerals used and the source of calcium evaluated did not affect the embryonic development, pipped eggs and quality of chicks. Similarly, there were no differences in pipped eggs in the study realized by Grimes et al. (2004) evaluated the effect of a chelated calcium proteinate dietary supplement on turkey breeder hens.

## **5. Conclusions**

In conclusion in the present study, the use of the level of organic micro minerals (Zn, Mn, Fe, Cu and Se) supplementation or source of Calcium (organic and seaweed) did not affected the productive performance of females and the incubation parameters, being thus they can be included in the diets of poultry breeders without causing negative effects in these parameters. Yolk, eggshell, specific gravity and shell thickness was higher in hens fed with calcium amino acid quelated. The percentage of albumen was higher in hens fed with seaweed calcium. Sperm quality was better with the use of calcium amino acid quelated.

## **References**

- Aghaei, A., Tabatabaei, S., Nazari, M. 2010. The correlation between mineral concentration of seminal plasma and spermatozoa motility in roosters. *J. Anim. Vet. Adv.* 9 (10). 1476-1478.
- Al-Batshan , H. A. , S. E. Scheideler , B. L. Black , J. D. Garlich , and K. E. Anderson . 1994. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poul. Sci.* 73: 1590 – 1596
- Ahmed, N. M., K. A. Abdel Atti, K. M. Elamin, K. Y. Dafalla, H. E. E. Malik, and B. M. Dousa. 2013. Effect of dietary calcium sources on laying hens performance and egg quality. *J. Anim. Prod. Adv.* 3:226-231.
- Assoumani, M.B. 1997. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. *Agro-Food Ind. Hi Tec.* v.9/10, p.46-47.
- Association of American Feed Control Officials (2005) AAFCO Official publication. Atlanta, GA, pp 307–308
- American Association Feed Control Officials - AAFCO. Atlanta; 1997.
- Ammerman CB, Henry PR, Miles RD (1998) Supplemental organically-bound mineral compounds in livestock nutrition. In: Garnsworthy PC, Wiseman J (eds) *Recent advances in animal nutrition*. University Press, Nottingham, pp 67–97.
- Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S. 2008. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. *Anim. Reprod.* v.5, n.3/4, p.90-96.
- Barber, S. J. Parker, H. M. McDaniel C. D. 2005. Broiler Breeder Semen Quality as Affected by Trace Minerals In Vitro. *Poul. Sci.* 84:100–105
- Bedwal, R.S, Bahuhuna, A. 1994. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia.* 50:626-640.

- Brillard, J.P.; McDaniel, G.R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poul Sci.*, v.64, p.155-158, 1985.
- Carvalho, L.S.S., Rosa, D.R.V., Litz, F.H., Fagundes, N.S., Fernandes, E.A. 2015. Effect of the Inclusion of Organic Copper, Manganese, And Zinc in The Diet of Layers on Mineral Excretion, Egg Production, and Eggshell Quality. *Braz. J. Poultry Sci.* 087-092
- Clydesdale, F.M. Mineral interactions in foods. In: Bodwell, C.E., Erdman, Jr. J.W. *Nutrient interactions*. New York: Marcel Dekker, p.257-268. 1998.
- El-Samee, L.D.A., El-Wardany, I., Ali, N.G., Abo-El-Azab, O.M. 2012. Egg quality, fertility and hatchability of laying quails fed diets supplemented with organic zinc, chromium yeast or mannan oligosaccharides. *Int. J. Poult. Sci.* 11 (3): 221-224.
- Favero, A., Vieira, S.L., Angel, C.R., Bess, F., Cemin, H.S. and Ward, T.L. 2013. Reproductive performance of Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *J. Appl. Poult. Res.* 22: 80-91.
- Fernandes, J.I.M., Murakami, A.E., Sakamoto, M.I., Souza, L.M.G., Malaguido, A. and Martins, E.N. 2008. Effects of organic mineral dietary supplementation on production performance and egg quality of white layers. *Braz. J. Poultry Sci.* v.10. n.1. p.59 – 65.
- Grimes, J. L., Noll, S., Brannon, J., Godwin, J. L., Smith, J. C., and Rowland, R. D. 2004. Effect of a Chelated Calcium Proteinate Dietary Supplement on the Reproductive Performance of Large White Turkey Breeder Hens. *J. Appl. Poult. Res.* 13:639–649.
- Lapointe, S. Ahmad I. and Buhr, M. M. 1996. Modulation of post thaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. *J. Dairy Sci.* 12: 2163–2169.

- Lertchunhakiata, K., Saenphooma, P., Nopparatmaitreea, M., Chimthong, S. 2016. Effect of Eggshell as a Calcium Source of Breeder Cock Diet on Semen Quality. *Agric. Agric. Sci. Procedia*. 11:137 – 142.
- Lin, H.; Mertens, K., Kempers B, Govaerts T, De Ketelaere B, De Baerdemaeker J, Decuyper E, Buyse J. 2004. New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane. *Br. Poult. Sci.* 45 (4), 476-482.
- Lopes, M., Paroul, N., Barbosa, J., Valduga, E., Cansian, R. L., Toniazzo, G., Oliveira, D. 2018. Effect of Partial and Total Replacement of Inorganic by Organic Microminerals Sources on the Quality of Broiler Carcasses. *Braz. Arch. Biol. Technol.* vol. 60
- MAPA Normative Instruction No. 62 of August 26, 2003. Official Analytical Methods for Microbiological Analysis for Control of Animal Products and Water, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply
- Melo, T.V. and Moura, A. M. A. 2009. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. *Arch. Zootec.* 58 (R): 99-107.
- Melo, T.V., Ferreira, R.A. Oliveira, V.C. Carneiro, J.B.A. Moura, A.M.A. Silva, C.S. and Nery, V.L.H. 2008. Quality of egg of japanese quails utilizing seaweed flour and monoammonium phosphate. *Arch. Zootec.* 57 (219): 313-319.
- Melo, T.V., P.P. Mendonça, A.M.A. Moura, C.T. Lombardi, R.A. Ferreira e V.L.H. Nery. 2006. Solubilidad in vitro de algunas fuentes de cálcio utilizadas em alimentacion animal. *Arch. Zootec.* 55: 297-300.
- Nys, Y., J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz, and M. T. Hincke. 2004. Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. *CR Palevol.* 3:549–562.



- Pelícia, K., Garcia, E. A., Scherer, M. R.S., Móri, C., Dalanezi, J.A., Faitarone, A.B.G., Molino, A.B., Berto, D.A. 2007. Alternative Calcium Source Effects on Commercial Egg Production and Quality. *Braz. J. Poultry Sci.* v.9. n.2. p. 105 – 109.
- Pickard, J. T. 2016. Feeding and managing the modern broiler breeder. *International Hatchery Practice.* v. 30, n. 10
- Oliveira, T. F. B., Bertechini, A. G., Bricka, R. M., Kim, E. J., Gerard, P. D., Peebles, E. D. 2015. Effects of in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poult. Sci.* 94:2488–2494.
- Rajendran, D., Vasanthakumar, P., Selvaraju, G., Thomas, K.S., Premkumar, N. and Dineshkumar, D. 2012. Effect of organic chromium supplementation on performance of white leghorn chicken recovering from Newcastle disease. *Anim. Nutr. Feed. Techn.* 12: 247- 255.
- Richards MP. 1997. Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poult. Sci.*76:152 - 164.
- Rodriguez-Navarro A., Kalin O, Nys Y, Garcia-Ruiz JM. 2002. Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *Br. Poult.Sci.* 43(3), 395-403.
- Rosa, A.P. et al. 1995. Influência de intervalos da inseminação artificial e do estresse do manejo da inseminação na produção e fertilidade de fêmeas avícolas. *Cienc. Rural*, v.25, n.3, p.443-447.
- Rutz, F., Saul, I., Dionello, N. J.L.; Roll, V. F.B., Xavier, E. G. 1999. Desempenho reprodutivo de galos leghorn submetidos a diferentes níveis de cálcio dietético. *Rev. Bras. Agrocienc.* v.5 n. 2, 120-123.
- Saldanha E.S.P.B., Garcia E.A., Pizzolante C.C., Faitarone A.B.G., Sechinato A., Molino A.B., Laganá C. 2009. Effect of Organic Mineral Supplementation on The Egg Quality

of Semi-Heavy Layers in Their Second Cycle of Lay. *Braz. J. Poultry Sci.* v.11 / n.4 / 215 – 222.

SAS Institute. 2016. *SAS User's Guide: Statistics. Version 9.2 Review Edition.* SAS Institute Inc, Cary, NC.

Shanmugam, M., Prakash, B., Reddy, E.P.K., Panda, A K. 2014. Dietary organic zinc and selenium supplementation improves semen quality and fertility in layer breeders. *Indian J. Anim. Sci.* 85 (2): 202–204.

Shan, T.I., Dai P.I., Zhu P., Chen L., Wu W., Li Y., Li C. 2017. Effect of an Organic Trace Mineral Premix on the Semen Quality, Testicular Morphology and Gene Expression Related to Testosterone Synthesis of Male Broiler Breeders. *Braz. J. Poultry Sci.* v.19. n.3. p. 481-488.

Skandhan KP. 1992. Review on copper in male reproduction and contraception. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* 87:594-598.

Spears, J. W. 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Anim. Feed Sci. Tech.* 58:151–163.

Soni, N., Mishra, S.K., Swain, R.K., Das, A., Behura, N.C. and Sahoo, G. 2014. Effect of supplementation of organic zinc on the performance of broiler breeders. *Anim. Nutr. Feed Tech.* 14: 359-369.

Stefanello C., Santos T. C., Murakami A. E., Martins E. N., Carneiro T. C. 2014. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. *Poul. Sci.* 93 :104–113.

Surai, P. 2002. Selenium in poultry nutrition 2. Reproduction, egg and meat quality and practical applications. *Worlds Poult. Sci. J.* v. 58, p.431-450.

Waldroup, P.W. Bioassays remain necessary to estimate phosphorus, calcium bioavailability. *Feedstuffs, Minnetonka*, v.68, p.13-20, 1996.

Yenice, E., Mizrak C., Gültekin M., Atik Z., Tunca M. 2015. Effects of dietary organic or inorganic manganese, zinc, copper and chrome supplementation on the performance, egg quality and hatching characteristics of laying breeder hens. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 62, 63-68.

**Table 1**

Composition of the diet and nutritional levels used.

Ingredients (%)	500gOMM+	800gOMM+	500gOMM+	800gOMM
	CaCh	CaCh	LCa	+ Lca
Corn (g/kg)	650.22	650.22	650.22	650.22
Soybean meal (460 g/kg protein) (g/kg)	241.73	241.73	241.73	241.73
Soybean oil (g/kg)	1.49	1.49	1.49	1.49
Dicalcium Phosphate (180 g/kg P; 210 g/kg Ca) (g/kg)	10.66	10.66	10.66	10.66
Limestone (380 g/kg Ca) (g/kg)	81.88	81.88	81.88	81.88
Salt (g/kg)	4.00	4.00	4.00	4.00
Vitamin and inorganic mineral premix <sup>1</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
Organic minerals <sup>2</sup>				
Copper amino acid chelated (mg/kg)	2.5	4	2.5	4
Manganese amino acid chelated (mg/kg)	20	32	20	32
Zinc amino acid chelated (mg/kg)	27.5	44	27.5	44
Iron amino acid chelated (mg/kg)	17.5	28	17.5	28
Selenium yeast (mg/kg)	0.08	0.128	0.08	0.128
Iodine (mg/kg) <sup>3</sup>	0.6	0.96	0.6	0.96
Calcium amino acid quelated (g/kg)	0.155	0.155	-	-
Calcium <i>Lithothamnium calcareum</i> (g/kg)	-	-	1.6	1.6
Calculated Nutritional Composition (g/kg)				
Crude Protein	17.00	17.00	17.00	17.00
Metabolizable Energy (Kcal/kg)	2768.01	2768.01	2768.01	2768.01
Calcium	3.50	3.50	3.50	3.50
Available Phosphorus	0.30	0.30	0.30	0.30
Nutritional composition analyzed (g/kg)				
Crude protein	17.72	16.62	16.45	16.89
Gross energy (Kcal/kg)	3935.2	39.27.4	3852.6	3956.6
Mineral matter	13.62	13.74	14.44	13.01
Calcium	34.5	35.9	36.6	35.0
Total P	5.5	5.3	5.5	5.5

<sup>1</sup> - Mineral and Vitamin Premix: Levels per kg of diet: vitamin A 1500 UI; vitamin D3 4500 UI; vitamin E 80 UI; vitamin K3 5mg; vitamin B1 3.5mg; vitamin B2 12mg; vitamin B6 6mg; vitamin B12 40mcg; niacin 60mg; pantothenic acid 20mg; biotin 0.4mg; folic acid 3mg; iron 60mg; copper 10mg; zinc 75mg; manganese 70mg; ascorbic acid 0.15mg; selenium 0.3mg; iodine 10mg; methionine 1.04g; phytase 600 FYT/g; cobalt 1mg; enramycin 5mg; lysine 0.15g; Protease 11250 Prot/kg

<sup>2</sup> - Yes Sinergy of the Brazil (Yes Minerals 360 – Poultry)

<sup>3</sup> - Inorganic iodine (Yes Minerals 360 – Poultry)

**Table 2**  
 Reproductive performance of hens submitted to the different treatments<sup>1</sup>

Item	Egg production (%)	Feed conversion (kg/dz)	Feed conversion (kg/kg)	Egg weight (g)
Levels				
500OMM	77.36	1.75	2.43	59.90
800OMM	79.74	1.77	2.48	59.63
Calcium				
CaCh	78.55	1.75	2.45	59.51
LCa	78.55	1.77	2.46	60.11
Interaction				
500OMM x CaCh	78.82	1.69	2.38	59.46
500OMM x LCa	75.90	1.80	2.49	60.53
800OMM x CaCh	78.28	1.80	2.53	59.56
800OMM x LCa	81.20	1.73	2.43	59.70
Source of Variation	.....P Value,.....			
Levels of OMM	0.1306	0.6361	0.4939	0.3981
Source of Calcium	0.9987	0.7228	0.9343	0.1596
Levels x Calcium	0.0666	0.0743	0.1286	0.2784
<i>Average</i>	78.55	1.76	2.46	59.81
<i>SEM</i>	4.31	0.13	0.18	1.18

<sup>a - b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

<sup>1</sup> Data represent means from 8 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 8

**Table 3**  
Egg quality from hens from 36 to 55 weeks of age<sup>1</sup>

Item	Yolk (%)	Albumen (%)	Shell (%)	Thickness (mm)	Specific gravity (g/cm <sup>3</sup> )	Yolk Index	Haugh Unit
Levels							
500OMM	28.06	63.11	8.81	377.79	1084.2	0.440	95.14
800OMM	28.21	62.95	8.86	377.28	1084.9	0.440	94.90
Calcium							
CaCh	28.35 <sup>a</sup>	62.70 <sup>b</sup>	8.93 <sup>a</sup>	381.54 <sup>a</sup>	1085.0 <sup>a</sup>	0.440	94.99
LCa	27.92 <sup>b</sup>	63.35 <sup>a</sup>	8.74 <sup>b</sup>	373.51 <sup>b</sup>	1084.1 <sup>b</sup>	0.440	95.05
Interaction							
500OMM x CaCh	28.17	62.92	8.89	379.80	1084.7	0.441	95.04
500OMM x LCa	27.95	63.30	8.72	375.73	1083.7	0.440	95.25
800OMM x CaCh	28.54	62.49	8.96	383.28	1085.3	0.440	94.95
800OMM x LCa	27.88	63.41	8.76	371.29	1084.4	0.441	94.85
Source of Variation							
	P Value						
Levels of OMM	0.4696	0.4062	0.4115	0.8682	0.1404	0.9796	0.4867
Source of Calcium	0.0397	0.0027	0.0059	0.0092	0.0339	0.9870	0.8726
Levels x Calcium	0.2834	0.1813	0.8084	0.1786	0.8886	0.4614	0.6687
<i>Average</i>	28.14	63.03	8.83	377.52	1084.53	0.440	95.02
<i>SEM</i>	0.57	0.55	0.17	8.11	1.20	0.005	0.97

<sup>a - b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

<sup>1</sup> Data represent means from 8 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 8

**Table 4**Sperm quality evaluated during the experimental period by males of laying breeders hens from 36 to 55 weeks of age<sup>1</sup>

Item	Volume	Motility (%)	Vigor <sup>2</sup>	Concentration <sup>3</sup>	Abnormality head (%)	Abnormality intermediate piece (%)	Abnormality tail (%)	Total abnormal spermatozoa (%)
Levels								
500OMM	1.05 <sup>a</sup>	90.96	4.21	4.04	2.39	2.29	0.29	4.95
800OMM	0.87 <sup>b</sup>	91.22	4.26	3.70	1.95	1.98	0.23	4.17
Calcium								
CaCh	0.96	91.50 <sup>a</sup>	4.30 <sup>a</sup>	3.92	2.00	2.11	0.30	4.39
LCa	0.96	90.68 <sup>b</sup>	4.17 <sup>b</sup>	3.82	2.33	2.17	0.22	4.73
Interaction								
500OMM x CaCh	1.07	91.33	4.25	4.21	2.06	2.17	0.30	4.49
500OMM x LCa	1.02	90.60	4.16	3.86	2.71	2.41	0.28	5.41
800OMM x CaCh	0.85	91.68	4.35	3.62	1.95	2.05	0.30	4.30
800OMM x LCa	0.89	90.77	4.17	3.77	1.95	1.92	0.16	4.05
Source of Variation								
				P Value				
Levels of OMM	0.0445	0.3520	0.2346	0.0873	0.1870	0.2737	0.3939	0.1729
Source of Calcium	0.9396	0.0044	0.0046	0.6090	0.3188	0.8437	0.2743	0.5556
Levels x Calcium	0.6457	0.7426	0.3608	0.2048	0.3311	0.5169	0.3939	0.3034
<i>Average</i>	0.96	91.09	4.23	3.87	2.17	2.14	0.26	4.56
<i>SEM</i>	0.29	0.94	0.15	0.67	1.30	0.96	0.23	1.95

<sup>a-b</sup> Means within a row, not sharing a common superscript, are significantly different ( $P \leq 0.05$ )<sup>1</sup> Data represent means from 12 replicates (i.e., pens) per treatment. \*Pooled SEM, n = 12<sup>2</sup> Sperm vigor (1-5 scores)<sup>3</sup> Sperm concentration (number of cells x 10<sup>9</sup> ml of semen)





## 6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que a suplementação de micro minerais orgânicos é viável, podendo ser recomendada do ponto de vista zootécnico por melhorar alguns parâmetros produtivos das matrizes de poedeiras sem afetar o desempenho da ave. Um dos grandes resultados deste estudo foi visto no capítulo I, onde houve melhora na produção de ovos com o uso dos micros minerais orgânicos em todas as semanas avaliadas. A literatura ainda é controversa sobre algumas respostas, sendo que esses resultados estão em desacordo aos encontrados por Yanice et al., (2015) e Carvalho et al. (2015). O peso corporal, conversão alimentar e peso de ovos das aves não foi influenciada pelo uso e nível de micro minerais orgânicos em relação aos inorgânicos, como visto no capítulo I. Este resultado também foi encontrado no capítulo II, onde o nível do micro mineral orgânico também não afetou esta variável.

Outro ponto de grande relevância encontrado no presente estudo se refere a uma melhora na fertilidade dos ovos incubados quando as aves foram alimentadas com micro minerais orgânicos. Isso pode ser visto no capítulo I, quando comparamos o efeito de dietas para aves apenas com micro minerais inorgânicos em relação aquelas alimentadas com orgânicos. Porém, quando avaliamos dietas com diferentes níveis de micro minerais (5000MM ou 8000MM) no artigo II, não houve diferença estatística, ou seja, o aumento da suplementação, de 5000MM para 8000MM, não garante maior resultado.

Vigor espermático é definido como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozóides móveis, o que tem grande importância no momento da fertilização. No capítulo I, pode ser observada uma melhora neste parâmetro através do uso de micro minerais orgânicos na dieta de machos em relação aqueles alimentados apenas com micro minerais inorgânicos, não sendo observado efeito para esta variável pelos diferentes níveis de micro minerais utilizados (5000MM ou 8000MM). Este resultado também foi observado no artigo II, onde o nível de micro mineral orgânico não influenciou esta variável.

A qualidade dos ovos vista nos capítulos I e II não foi afetada pelo uso e nível de micro minerais orgânicos nas dietas das aves. Este resultado pode ser justificado pelo fato de que a dieta basal utilizada já estava balanceada de acordo com as necessidades das aves. Porém, quando o efeito tipo de cálcio foi avaliado no capítulo II, pode ser observado que o Ca na forma de quelato apresenta melhora na qualidade de casca em relação ao Ca oriundo da alga *Lithothamnium calcareum*.

Assim, com o decorrer deste estudo, pode-se perceber que para uma melhor avaliação de micro minerais em dietas de matrizes de poedeiras devemos utilizar metodologias diferenciadas. A suplementação de micro minerais orgânicos em uma dieta já balanceada nos dificulta encontrar os seus efeitos verdadeiros. Assim, pesquisas com uma metodologia de substituição dos minerais orgânicos por diferentes níveis de minerais inorgânicos podem ser mais esclarecedoras.

Diante do exposto, a utilização de micro minerais orgânicos em dietas de matrizes de poedeiras traz benefícios, tanto na produção quanto em alguns aspectos reprodutivos dos machos e das fêmeas. Apesar da literatura ainda ser controversa, os resultados encontrados neste estudo supõe que a utilização de micro minerais orgânicos pode ser utilizada sem resultar em qualquer prejuízo no desempenho das aves.

## 7 CONCLUSÕES

Micro minerais orgânicos podem ser utilizados na dieta de matrizes de postura sem causar prejuízos no desempenho de machos e fêmeas. Além disso, quando as dietas foram suplementadas com minerais orgânicos houve tendência na melhora dos índices de taxa de produção das fêmeas em todas semanas avaliadas.

A fertilidade dos ovos das aves alimentadas com micro minerais orgânicos apresenta melhora em relação aquelas alimentadas com micro minerais inorgânicos, sendo que o nível de micro mineral orgânico utilizado não afeta esta variável.

A qualidade dos ovos não é afetada pelo uso e nível de micro minerais orgânicos. Porém, a qualidade da casca dos ovos apresenta melhora quando cálcio aminoácido quelatado é utilizado na dieta.

A suplementação de minerais orgânicos assim como, cálcio aminoácido quelatado na dieta de machos resulta efeitos positivos no vigor espermático.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAEI, A., TABATABAEI, S., NAZARI, M. The correlation between mineral concentration of seminal plasma and spermatozoa motility in roosters. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. 9 (10). 1476-1478. 2010.
- ALBUQUERQUE, R. **Produção e qualidade da casca de ovos de galinhas poedeiras recebendo microminerais orgânicos em sua dieta**. 2004. Tese (Livre-Docência). Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.
- ALVA, A. K., HUANG, B., PARAMASIVAM, S. Soil pH affects copper fractionation and phytotoxicity. **Soil Science Society of America Journal**. 64:955–962. 2000.
- AMMERMAN CB, HENRY PR, MILES RD. **Supplemental organically-bound mineral compounds in livestock nutrition**. In: Garnsworthy PC, Wiseman J (eds) Recent advances in animal nutrition. University Press, Nottingham, pp 67–97. 1998.
- AMMERMAN, C. B., D. B. BAKER, A. J. LEWIS. **Bioavailability of Nutrients for Animals**. Academic Press, New York. 1995.
- Association of American feed control officials - AAFCO. Official Publication. Atlanta: 101p. 2000.
- Association of American Feed Control Officials. AAFCO. Official publication. Atlanta, GA, pp 307–308. 2005.
- ARAÚJO, J. A. et al. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.2, n. 3, p. 53-60, 2008.
- ASHMEAD HD. Factors which affect the intestinal absorption of minerals. In: Ashmead HD, editor. **The roles of amino acid quelates in animal nutrition**. Westwood: Noyes Publications; 1993a.
- ASHMEAD, H.D. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metals salts. In: ASHMEAD, H.D. (Ed.). **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey: Noyes, p.47-51. 1993b.
- ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. **Agro-Food-Industry Hi Tech**, v.9/10, p.46-47. 1997.
- Banks, K. M., Thompson, K. L., Jaynes, P., Applegate. T. A. 2004. The effect of copper on the efficacy of phytase, growth, and phosphorus retention in broiler chicks. **Poultry Science**. 83:1335–1341.
- BANSAL, A.K. AND BILASPURI, G.S. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. **Animal Reproduction**, v.5, n.3/4, p.90-96. 2008.
- BARBER, S. J. PARKER, H. M. MCDANIEL C. D. Broiler Breeder Semen Quality as Affected by Trace Minerals In Vitro. **Poultry Science** 84:100–105. 2005.

BELL, D.D.; WEAVER, W.D.JR. Vitamins, minerals and trace ingredients. **Commercial Chiken Meat and Egg Production**, p. 371-393, 2002.

BERTECHINI A.G. **Nutrição de monogástricos**. 1. ed. Lavras - MG: Ed. ufla, v. 1. 302 p. 2006.

BRITO, J.A.G.; BERTECHINI, A.G.; FASSANI, E.G. et al. Uso de microminerais sob a forma de complexo orgânico em rações para frangas de reposição no período de 7 a 12 semanas de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1342-1348, 2006.

BRITO, J.A.G. **Uso de microminerais sob a forma de complexo orgânico em rações para frangas na fase de recria**. 2005. 63f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2005.

BONDI, A. A. **Animal Nutrition**. 1. Ed. New York: wiley, 540 p. 1987.

CAO, J. et al. Effect of iron concentration age and length of iron feeding on feed intake, and tissue iron concentration of broiler chicks for use as a bioassay of supplemental iron sources. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, n. 4, p. 496-504, 1996.

CARLOS, A. C. et al. Uso da alga *lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 35, n. 4, p. 833-839, 2011.

CORREIA GMG, et al. Efeito do tempo de armazenamento sobre a qualidade de ovos de aves tratadas com selênio orgânico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29(5), p.1440-1445, 2000.

CRISTY, H. Fatores que interferem com a absorção intestinal de minerais e uma solução para o problema. In: Simpósio sobre Nutrição Mineral. 1, 1984, São Paulo, Anais. São Paulo: SNIDA, 1984. p.19-27.

DIAS, C.T.M. Granulados Bioclásticos - Algas Calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*, v.8, p.307-318, 2000.

DREOSTI, I. E. Recommended dietary intakes of iron, zinc and other inorganic nutrients and their chemical form and identity. **Nutrition** 9: 542-545, 1993.

EDENS, F.W. Practical applications for selenomethionine: broiler breeder reproduction. In: Annual Symposium, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham University Press, p. 29-42, 2002.

EL-MALLAH, et al. Improving performance and some metabolic response by using some antioxidants in laying diets during summer season. **Journal of American Science**, v. 7, n. 4, p. 217-224, 2011.

FAVERO, A., et al. Development of bone in chick embryos from Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 402-411, 2013.

- FERKET, P. R., VAN HEUGTEN, E., VAN KEMPEN, T. A. T., G ANGEL, R. Nutritional strategies to reduce environmental emissions from nonruminants, **Journal of Animal Science**, Volume 80, Issue E-suppl 2, Pages E168–E182, 2002.
- GOETZ, P. Phytothérapie de l'ostéoporose. **Phytothérapie**, v.6, p.33-38, 2008.
- GOFF, J.P. **Minerais**. DUKES - Fisiologia dos Animais Domésticos. Editado por REECE, W. O. Editora Guanabara Koogan, ed. 12, p. 532-555, 2006.
- GUO, R. et al. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1132-1141, 2001.
- HERRICK, J.B. Mineral in animal health. In: ASHMEAD, H.D. **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey: Noyes, cap. 1, p.3-9, 1993.
- KIEFER, C. Minerais quelatados na nutrição de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.3, p.206-220, 2005.
- LYONS, T. P. Improving bioavailability of trace minerals. *World Poultry*, Wellington, v. 10, n. 1, p. 20- 21, Mar. 1994.
- LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Nutrition of the chickens**. 4th ed. Guelph: University Books, 591 p. 2001.
- LEESON, S. A. New look at trace mineral nutrition of poultry: can we reduce the environmental burden of poultry manure. In: Annual Symposium on Biotechnology in the feed industry, 19., 2003, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Altech's, 2003. 1 CD-ROM.
- LERTCHUNHAKIATA, K, SAENPHOOMA, P., NOPPARATMAITREEA, M., CHIMTHONG, S. Effect of Eggshell as a Calcium Source of Breeder Cock Diet on Semen Quality. **Agriculture and Agricultural Science Procedia** 11:137 – 142. 2016.
- LUNDEEN T. Mineral proteinates may have positive effect on shell quality. **Feedstuffs**. 73(14):10- 15, 2001.
- LIN, H. et al. New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane. **British Poultry Science**. 45(4), 476-482, 2004.
- MABE, I. **Efeitos da suplementação dietética com quelatos de zinco e de manganês na produção de ovos e morfologia intestinal de galinhas poedeiras**. 94f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2001.
- MABE IC, et al. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. **Poultry Science**; 82(12):1903–1913, 2003.
- MACARI, M e MENDES, A. A. Manejo de matrizes, FACTA: **Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas, SP 2005.

MACARI, M., LUQUETTI, B. C. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI, M., FURLAN, R. L., GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: UNESP; FUNEP, p. 17-35, 2002.

MAHAN, D.; ZAWADZKI, J.; GUERREROR. Mineral metabolism and boar fertility: observations from Latin America to Europe. In: Biotechnology in the feed industry, 2002, Nottingham, UK. **Proceedings** of Alltech's 18th Annual Symposium, Nottingham, United Kingdom. p. 407-414. Disponível em: <http://en.engormix.com/pig-industry/articles/mineral-metabolism-boar-fertility-t33393.htm>. Acesso em: 13 de abril de 2017.

MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: UNESP; FUNEP, p. 167-173, 2002.

MALETTO, S. Absorção e interferência dos elementos minerais no organismo animal - micro elementos - Importância na sanidade. In: Simpósio sobre Nutrição Mineral. 1, 1984, São Paulo, Anais. São Paulo: SNIDA, 1984. p.9-18.

MAZZUCO, H. Integridade óssea em poedeiras comerciais: influência de dietas enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados e tipo de muda induzida. Concórdia: EMBRAPA, CNPSA; Circular Técnica, 47, 2006.

MELO, G. M. P. et al. Selênio Levedura. Boletim Técnico da Produção Animal. 2015.

MELO, T.V.; MOURA, A.M.A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. **Archivos de Zootecnia**, v.58, p.99-107, 2009.

MILES, R. D. e HENRY, P. R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira** 1(2): 73-93, jul./dez. 2000.

NYS, Y.; REVY, P.S.; JONDREVILLE, C. Zinc, cuivre et manganese en aviculture: role, disponibilitè et risque pour l'environnement. Journées de la recherche avicole, 5., 2003, Tours. **Annales...** Tours, 2003.

PAIK, I. Application of chelated minerals in animal production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.14, p.191-198, 2001.

PAPPAS, A.C. et al. Effects of supplementing broiler breeder diets with organoselenium compounds and polyunsaturated fatty acids on hatchability. **Poultry Science**, v.85, p.1584-1593. 2006.

PAN, E. A. et al. Desempenho de poedeiras semi pesadas arraçoadas com a suplementação de Selênio orgânico. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v. 16, n. 1-4, p. 83-89, 2010.

PARK, S.Y.; BIRKHOLOLD, S.G.; KUBENA, L.F. et al. Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction. **Biological Trace Element Research**, v.102, n.2, p.147-163, 2004.

PATERSON, PH. Hen house ammonia: Environmental consequences and dietary strategies. Multi-state poultry meeting; Pensilvânia. United State of America. p.12. 2002.

PELÍCIA, K. et al. Alternative Calcium Source Effects on Commercial Egg Production and Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.9. n.2. p. 105 – 109, 2007.

PESTI, G. M. e BAKALLI, E R.I. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. **Poultry Science**. 75:1086–1091, 1996.

POWERS, W. AND ANGEL, R. A Review of the Capacity for Nutritional Strategies to Address Environmental Challenges in Poultry Production, **Poultry Science**, Volume 87, Issue 10, Pages 1929–1938, 2008.

RICHARDS, J.; DIBNER, J. Organic trace minerals are not all equally effective. **World Poultry**, v.21, n.9, p.17-19, 2005.

RICHARDS MP. Trace mineral metabolism in the avian embryo. **Poultry Science** 76:152–164. 1997.

ROSSI, P., et al. Efeito dos minerais orgânicos sobre o desempenho reprodutivo de matrizes pesadas. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO (ENPOS), 9., 2007, Pelotas. **Anais Pelotas: Faculdade De Agrônoma Eliceu Maciel**, 2007.

RUTZ, F. MURPHY, R. M. Minerais orgânicos para aves e suínos. In: Congresso internacional sobre uso da levedura na alimentação animal CBNA 1., 2009, Campinas. **Anais... Pelotas: Universidade federal de Pelotas**, p. 21-36. 2009.

SAAD, M. B. **Efeito da suplementação de Selênio orgânico na resposta imunológica de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal do Paraná. 54p. 2009.

SAAD, F. M. O. B. Minerais Quelatados para Cães e Gatos. I Simpósio de Produção, Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 2005.

SAHIN, T. e TASDEMIR, A. N. The effects of organic and inorganic zinc supplemented in breeder hens' rations on hatching traits and chick quality. **Vet Hekim Der Derg** 88(1): 3-12, 2017.

SAKOMURA, N.K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. Nutrição de Não Ruminantes. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 678p. 2014.

SANTOS, R. A. **Minerais quelatados na nutrição Animal**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p. 28. 1998.

SCATOLINI, A.M. **Mn, Zn e Se associados a moléculas orgânicas na alimentação de galinhas poedeiras no segundo ciclo de produção**. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.



SECHINATO, A. S.; ALBUQUERQUE, R.; NAKADA, S. Efeito da suplementação dietética com micro minerais orgânicos na produção de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 159-166, 2006.

SHAN, T.I. et al. Effect of an Organic Trace Mineral Premix on the Semen Quality, Testicular Morphology and Gene Expression Related to Testosterone Synthesis of Male Broiler Breeders. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.19. n.3. p. 481-488. 2017.

SIMÕES, A. F. **Influência da atividade física no tratamento da osteoporose**. Disponível em: <<http://www.cdof.com.br/fisio5.htm>>. Acesso em: 02 maio. 2017.

SKRIVAN M, SKRIVANOVA V, MAROUNEK M. Effects of dietary zinc, iron, and copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil, and herbage. **Poultry Science**. v.84, p.1570–1575. 2005.

SPEARS, J.W. **Optimizing mineral levels and sources for farm animal**. In: KORNEGAY, E, T. Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment. New York: CRC Press, p.259-275. 1996.

SOUSA, A. M., et al. Resultados econômicos da utilização de minerais orgânicos e inorgânicos e duas granulometrias de calcário em dietas para poedeiras comerciais leves no 1º e 2º ciclos de produção, sobral, estado do ceará. *Informações Econômicas*, SP, v. 46, n. 1, jan./fev. 2016.

STEFANELLO, C., et al. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. **Poultry Science**. v.93, p. 104-113. 2014.

SURAI, P. F., SPARKS, N. H.C., SPEAKE, B. K. The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. **Proceedings** of the 12th European Poultry Conference, Verona, pp. 416–417

SURAI, P. F. **Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, 2002.

SURAI, P. F. Organic Selenium: benefits to animals and humans, a biochemist's view. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 16., 2000, Nottingham. **Anais...** Nottingham: University Press, UK, p. 205-260, 2000.

SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 4.ed. CABI International: Wallingford, 579p. 2010.

TEIXEIRA, A.C. **Alimentos e alimentação**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001

TORRES, A. P. **Alimentação das aves**. São Paulo: Edições Melhoramento, v. 1, 259 p. 1969.

UNDERWOOD, E.J. *The mineral nutrition of livestock*. 3ª Edition. Wallingford: CABI, 999. 614p.

UNDERWOOD, E. J. **The mineral nutrition of livestock**. 2nd. ed. London: Cammon Wealth Agricultural Bureaux, p.180. 1981.

WALDROUP, P.W. Bioassays remain necessary to estimate phosphorus, calcium bioavailability. **Feedstuffs**, Minnetonka, v.68, p.13-20, 1996.

VALLE, R. Mortalidade de matrizes em produção. In: SIMPÓSIO TÉCNICO SOBRE MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE, 2., 1999, Chapecó, SC. **Resumos...** Chapecó, SC: EMBRAPA Suínos e Aves, p.40. 1999.

VICENZI E. **Fadiga de gaiola e qualidade da casca do ovo**. Aspectos nutricionais. In: 6 Simpósio Técnico de Produção de Ovos, São Paulo, São Paulo, Brasil. p. 77-91. 1996.

XAVIER, G. B. et al. Performance of layers fed diets containing organic selenium, zinc and manganese, during a second cycle of production. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 20., 2004, Lexington. **Proceedings...** Lexington. p.19. 2004.

ZAMANI, A.; RAHMANI, H.R.; POURREZA, J. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese and zinc improves eggshell quality in laying hens. **Pakistan Journal of Biological Science**, v.8, n.9, p.1311-1317, 2005.