

METODO DE DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE MANGANÊS EM ALIMENTOS ORGÂNICOS

Flávio Bello Fialho, Jorge López e Claudio Bellaver
EMBRAPA-CNPSA BR 153, km 110
Vila Tamanduá -C.P. 21 89700-000- Concórdia, SC-BRASIL

RESUMO

O trabalho visou determinar o melhor método para estimar a biodisponibilidade do manganês (Mn), usando dois tecidos (tíbia e rins), duas maneiras de expressar o Mn do alimento (concentração ou total ingerido) e duas formas de expressar o Mn no tecido (concentração ou quantidade total). Foi usado, como fonte orgânica de Mn, o farelo de arroz integral (FAI), sendo o sulfato de Mn usado como fonte padrão do mineral. Utilizaram-se 700 pintos distribuídos ao acaso em boxes de 25 pintos (2 boxes/(sexo X tratamento)), em 7 tratamentos, sendo um sem Mn adicional e os demais com três níveis de adição de Mn (30, 60 e 90 ppm) de cada uma das fontes utilizadas (FAI ou sulfato de Mn). Os métodos foram comparados pelo coeficiente de determinação (R^2), teste F, e coeficiente de variação do modelo de regressão múltipla. A melhor maneira de estimar a disponibilidade do Mn foi usando a concentração de Mn na tíbia como variável de resposta e a concentração de Mn de cada uma das fontes na dieta como regressores.

PALAVRAS-CHAVE: Biodisponibilidade, farelo de arroz, frangos de corte, manganês, método de determinação, minerais.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the best method for estimation of the bioavailability of manganese (Mn), using two animal tissues (tibia and kidney) and two ways of expressing feed Mn and tissue Mn (concentration or total mass). Rice bran (RB) was used as the organic source of Mn, and Mn sulphate was used as the standard source of the mineral Mn. A total of 700 chicks were assigned randomly to boxes of 25 chicks (2 boxes/(sex X treatment)). There were 7 treatments, one of them without added Mn and the others with three levels of added Mn (30, 60, and 90 ppm) from each of the Mn sources (RB or Mn sulphate). The methods were compared by the coefficient of determination (R^2), the F-test and the coefficient of variation of the multiple regression models. The best way to estimate the availability of Mn was using tibia Mn concentration as response and diet Mn concentration as regressors.

KEYWORDS: Bioavailability, broilers, manganese, method of assay, minerals, rice bran.

Introdução

O manganês (Mn) é um elemento químico essencial para o organismo animal. Já na década de 30, ele demonstrou efeito na

prevenção da perose, doença caracterizada por anormalidades ósseas nas pernas de aves (Wilgus et al., 1936; Gallup e Norris, 1939).

O Mn normalmente é suplementado na dieta na forma inorgânica. Alguns alimentos usados em dietas para aves contêm quantidades consideráveis de Mn e a sua inclusão na dieta poderia reduzir a necessidade de suplementação mineral. Segundo Halpin e Baker (1986), o farelo de trigo e o farelo de arroz seriam boas fontes orgânicas de Mn, mas há poucas informações sobre a disponibilidade biológica do mesmo. Foi comprovado que, em situações de deficiência, pelo menos uma parte do Mn desses alimentos está disponível para frangos (Halpin e Baker, 1986).

Para medir e comparar a disponibilidade do Mn das diversas fontes orgânicas, deve-se padronizar a metodologia utilizada. Vários estudos foram desenvolvidos para determinar a disponibilidade de fontes inorgânicas ou formas complexadas de Mn (Black et al., 1984a; Henry et al., 1986, 1987, 1989; Wong-Valle et al., 1989). Entretanto, não foram encontrados trabalhos que medissem a disponibilidade do Mn de materiais orgânicos.

A concentração de Mn nos alimentos orgânicos é baixa, mesmo nos mais ricos em Mn, quando comparados com fontes minerais. Isso obriga ao uso de níveis baixos de suplementação em ensaios de disponibilidade, trazendo conseqüências indesejáveis em termos experimentais, como a redução da precisão das estimativas (Henry et al., 1986). Desta forma, é especialmente importante o uso de técnicas que reduzam o erro experimental, para melhor estimar os parâmetros do modelo. Uma das maneiras disso ser feito é pela escolha das variáveis que melhor expressem a relação entre o mineral ingerido e o mineral aproveitado pelo animal.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o melhor tecido (ósseo ou renal)

para medir a resposta de frangos ao Mn orgânico e a melhor maneira de expressar a relação entre Mn na dieta e Mn nos tecidos (concentração ou quantidade total), visando minimizar o erro experimental em ensaios de disponibilidade.

Material e Métodos

A fonte orgânica de Mn utilizada foi o farelo de arroz integral (FAI), com 360 ppm de Mn, que foi comparado com o sulfato de Mn ($MnSO_4$, "feed grade"), com 25.82 % de Mn pela análise. Foram usados 700 pintos de corte de um dia, sexados, alojados em boxes de 25 aves, num experimento em delineamento completamente casualizado, com sete tratamentos, dois sexos e duas repetições por sexo. Foram preparadas sete dietas, sendo uma sem FAI e $MnSO_4$, três com níveis crescentes de FAI (8.33, 16.67 e 25.00 %) e três com níveis crescentes de sulfato (116, 232 e 349 ppm), de modo a fornecer 30, 60 e 90 ppm de Mn na dieta, suplementado pelo FAI ou pelo sulfato. A composição das dietas usadas nas fases inicial (1 a 28 dias) e final (29 a 49 dias) é mostrada na Tabela 1. Foram medidos o consumo médio de dieta e o peso médio das aves do box ao final do experimento (49 dias), quando foram seleccionadas ao acaso quatro aves de cada box, que foram pesadas e abatidas, tendo sido coletados os rins e a tibia esquerda. O peso do osso seco e desengordurado e o teor de Mn no osso e nos rins (base de matéria seca) foram determinados conforme a técnica de rotina do Laboratório de Nutrição do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (Concórdia, SC, Brasil) descrita por Fialho (1991). A análise estatística foi feita utilizando-se o sistema SOC (Dezembro/89-Manual) de análise estatística (EMBRAPA, 1990).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (%)

Tratamento	1	2	3	4	5	6	7
Dieta inicial ¹							
Milho	58.56	49.33	40.09	30.85	58.54	58.52	58.49
Far. soja	36.44	35.60	34.77	33.93	36.44	36.45	36.45
FAI ²	-	8.33	16.67	25.00	-	-	-
Oleo soja	1.43	3.17	4.91	6.65	1.43	1.44	1.45
Far. ossos	2.04	2.00	1.95	1.91	2.04	2.04	2.04
Calcário	.63	.67	.70	.74	.63	.63	.63
Metionina	.149	.156	.164	.171	.149	.149	.149
Premix ³	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40
Sal	.35	.35	.35	.35	.35	.35	.35
MnSO ₄ (ppm)	—	—	—	—	116	232	349
Dieta final ⁴							
Milho	63.13	53.89	44.65	35.41	63.10	63.08	63.06
Far. soja	31.42	30.58	29.75	28.91	31.42	31.43	31.43
FAI ²	-	8.33	16.67	25.00	-	-	-
Oleo soja	2.10	3.84	5.58	7.32	2.11	2.11	2.12
Far. ossos	2.10	2.06	2.02	1.98	2.10	2.10	2.10
Calcário	.60	.64	.68	.71	.60	.60	.60
Metionina	.051	.058	.065	.073	.051	.051	.051
Premix ⁵	.25	.25	.25	.25	.25	.25	.25
Sal	.35	.35	.35	.35	.35	.35	.35
MnSO ₄ (ppm)	—	—	—	—	116	232	349

¹Formulada para conter 22 % proteína bruta, .5 % metionina, 1 % cálcio, .45 % fósforo disponível, 2900 kcal/kg energia metabolizável.

²Farelo de arroz integral

³Fornecendo, por kg de dieta: 10.000 UI vit.A; 2.000 UI vit.D; 20 UI vit.E; 3.3 mg vit.K; 3.0 mg vit.B₁; 6.0 mg vit.B₂; 3.0 mg vit.B₆; 0.015 mg vit.B₁₂; .15 mg biotina; 1.0 mg ác. fólico; 15.0 mg ác. pantotênico; 600 mg colina; 40 mg ác. nicotínico; 50 mg Zn; 60 mg Fe; 8 mg Cu; .5 mg I; .2 mg Se; 300 mg Etoxiqum; 300 mg coccidiostático; 750 mg vermífugo; 50 mg antibiótico.

⁴Formulada para conter 20 % proteína bruta, .38 % metionina, 1 % cálcio, .45 % fósforo disponível, 3000 kcal/kg energia metabolizável.

⁵Fornecendo, por kg de dieta: 8.000 UI vit.A, 1.800 UI vit.D; 15 UI vit.E; 3.3 mg vit.K; 2.0 mg vit.B₁; 5.0 mg vit.B₂; 2.0 mg vit.B₆; 0.015 mg vit.B₁₂; .1 mg biotina; 1.0 mg ác. fólico; 15.0 mg ác. pantotênico; 500 mg colina; 40 mg ác nicotínico; 50 mg Zn; 60 mg Fe; 8 mg Cu; .5 mg I; .2 mg Se; 300 mg Etoxiqum; 300 mg coccidiostático; 50 mg antibiótico.

Para a análise estatística do teor de Mn no osso e nos rins, usou-se o modelo de análise de variância:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + TS_{ij} + e_{ijk}$$

onde:

Y_{ijk} = variável de resposta

μ = média geral

T_i = efeito do tratamento

S_j = efeito do sexo

TS_{ij} = efeito da interação entre tratamento e sexo

e_{ijk} = erro aleatório

As médias entre tratamentos e entre sexos foram comparadas usando o teste de Tukey, com nível de significância ($P=0.05$).

O consumo de Mn proveniente do FAI (CMF, g) e o consumo de Mn proveniente do $MnSO_4$ (CMS, g) foram calculados para cada ave, em função da concentração na dieta de Mn proveniente do FAI (MF, ppm) ou do $MnSO_4$ (MS, ppm), do consumo médio de dieta por ave do box (CM, g), do peso final médio por ave do box (PM, g) e do peso da ave selecionada (PA, g), de acordo com as seguintes fórmulas, considerando-se que as aves dentro do mesmo box tiveram conversões alimentares semelhantes:

$$CMF = \frac{MF \times CM \times PA}{PM \times 1000000}$$

$$CMS = \frac{MS \times CM \times PA}{PM \times 1000000}$$

Os teores de Mn no osso e nos rins foram analisados por regressão linear múltipla, visando aplicar o método de "slope ratio", ou razão entre declividades, descrito por Finney (1978), para determinar a eficiência relativa do Mn orgânico. Para determinar qual o melhor modelo a ser usado na análise, foram feitas quatro regressões de Mn no osso sobre Mn ingerido de cada uma das fontes, considerando concentrações ou quantidades totais, conforme os modelos abaixo:

Modelos 1 e 3:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 MF + \beta_2 MS + s_i + e_{ij}$$

Modelos 2 e 4:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 CMF + \beta_2 CMS + S_i + e_{ij}$$

onde:

Y_{ij} = Concentração de Mn no osso (ppm; Modelos 1 e 2) ou quantidade total de Mn no osso (g; Modelos 3 e 4)

β_0 = intercepto

β_1, β_2 = coeficientes de regressão

MF = concentração na dieta de Mn proveniente do FAI (ppm)

CMF = consumo de Mn proveniente do FAI (g)

MS = concentração na dieta de Mn proveniente do $MnSO_4$ (ppm)

CMS = consumo de Mn proveniente do $MnSO_4$ (g)

S_i = efeito do sexo

e_{ij} = erro aleatório

Os modelos foram comparados entre si pelo coeficiente de determinação (R^2), teste F e coeficiente de variação.

Posteriormente, foi feita a análise de regressão múltipla de Mn nos rins, usando o Modelo 1, com a concentração de Mn nos rins como variável de resposta e a concentração de Mn de cada uma das fontes na dieta como regressores.

Resultados e Discussão

Os teores médios de Mn no osso e nos rins são mostrados na Tabela 2. O teor de Mn no osso aumentou com o aumento do nível de Mn suplementado, fornecido pelo FAI ou pelo sulfato de Mn.

O teor de Mn nos rins não foi linear, uma vez que os animais do Tratamento 4 apresentaram o menor nível de deposição de Mn nos rins, apesar deles terem recebido um suprimento maior de Mn proveniente do FAI. Considerou-se o teor de Mn nos rins como uma variável de resposta bem menos confiável para estimar o Mn disponível (em baixas concentrações dietéticas do que o teor de Mn nos ossos).

O efeito de sexo na deposição de Mn foi significativo ($P < 0.02$), tendo as fêmeas acumulado mais Mn que os machos, tanto no osso quanto nos rins. O menor teor de Mn no osso dos machos pode ser explicado, em parte, pelo maior tamanho do osso, que faz com que o Mn no osso fique menos concentrado.

Mathers e Hill (1968) encontraram concentrações de Mn semelhantes às do presente trabalho, de 6 a 10.6 ppm nos rins e 1.5 a 7.8 ppm nos ossos, em galinhas de postura de diferentes idades recebendo dietas com 7 a 107 ppm de Mn. Os ossos, fígado e rins normalmente possuem teor maior de Mn do que os demais tecidos do organismo

animal, sendo a concentração especialmente baixa nos músculos. No mesmo trabalho, Mathers e Hill (1968) mediram valores de apenas .6 a 1.5 ppm no tecido muscular. Segundo Underwood (1977), a concentração de Mn nos ossos pode aumentar ou diminuir substancialmente, conforme o nível de ingestão do elemento pelo animal. Cotzias (1962) sugere níveis acima de 2 ppm como normais em ossos de galinha, enquanto os casos das aves com perose contêm apenas um terço a um quarto desse valor.

Foram feitas quatro análises de regressão, considerando como variável de resposta o Mn no osso, em concentração ou quantidade total, e como regressor a concentração de Mn na dieta ou a quantidade total de Mn consumido, visando comparar os modelos para determinar qual deles melhor se ajusta ao fenômeno, estando os resultados resumidos na Tabela 3. O Modelo 1 foi o que melhor explicou o fenômeno, pois teve valor de coeficiente de determinação e teste F maiores e resultou em menor coeficiente de variação. Esse modelo corresponde à regressão da concentração de Mn no osso sobre a concentração de Mn na dieta.

Mathers e Hill (1968) já defendiam a medida da concentração de Mn no osso como melhor medida de resposta à ingestão de Mn do que a quantidade total do mineral depositada, constatação confirmada pelo presente estudo. Em outro trabalho Mathers e Hill (1967) alegam que a retenção e a absorção são influenciadas pela concentração de Mn^{+2} em solução no intestino, a qual depende bem mais da concentração de Mn na dieta do que da quantidade de dieta ingerida, tendo em vista que a taxa de absorção de Mn é de apenas cerca de 2 % (Suso e Edwards, 1969). O Mn absorvido é quase todo eliminado pelo intestino, sendo a bile a principal via de excreção (Underwood, 1977). O aumento da

Tabela 2: Deposição de manganês (ppm na matéria seca) nos tecidos dos frangos abatidos aos 49 dias de idade

	N ¹	Mn no osso	N	Mn nos rins
Média geral	105	4.31	109	10.22
Fêmeas	52	4.61 a	54	10.50 a
Machos	53	4.04 b	55	9.94 b
1: Dieta basal (B)	16	3.187 c	15	9.838 ab
2: B + 8.33 % FAI	15	3.897 bc	16	10.020 ab
3: B + 16.67 % FAI	16	4.360 b	16	10.370 ab
4: B + 25.00 % FAI	15	4.588 b	16	9.530 b
5: B + 116 ppm MnSO ₄	14	4.077 b	15	10.265 ab
6: B + 232 ppm MnSO ₄	14	4.680 b	15	10.634 ab
7: B + 349 ppm MnSO ₄	15	5.519 a	16	10.888 a
Raiz do quad. médio do erro		.728		1.213

^{a,b,c}Médias na mesma coluna com a mesma letra, entre sexos ou entre tratamentos, não diferem estatisticamente ($P > 0.05$) pelo teste de Tukey

¹Número de observações da variável à direita.

quantidade de Mn ingerido provoca aumento na taxa de excreção endógena e redução na percentagem retida do mineral, mecanismo este usado pelo organismo para regular a homeostase (Weigand e Kirchgessner, 1988). Cotzias (1962) sugere que parte do Mn excretado pela bile é reabsorvido no intestino, de modo que cada átomo do metal excretado nas fezes pode ter passado pelos tecidos várias vezes, confundindo o fenômeno da excreção com a absorção. Desta forma seria possível considerar o conteúdo gastrointestinal como um "pool" de Mn que rapidamente entre em equilíbrio com o Mn dos tecidos.

Esse fato, aliado à pequena taxa de absorção do mineral ingerido (Suso e Edwards, 1969), que faz com que a maioria

do Mn ingerido permaneça dentro do tubo digestivo, alterando pouco a concentração na digesta, leva à suposição de que a absorção do mineral seja mais função da concentração do mesmo na dieta do que da quantidade total ingerida, o que foi confirmado no presente trabalho. Em diversos outros trabalhos a concentração de Mn no osso em função da concentração de Mn suplementado na ração foi usada para estimar a disponibilidade do Mn (Black et al., 1984 a, b, 1985; Henry et al., 1986, 1987, 1989; WongValle et al., 1989).

O coeficiente de determinação dos modelos de cerca de .50 é baixo, se comparado com a maioria dos trabalhos de determinação de disponibilidade de fontes inorgânicas de Mn. Isso se deve à reduzida

Tabela 3: Comparação de modelos de regressão de Mn no osso em função do Mn ingerido, usando concentração ou quantidade total

Modelo	Variável de Resposta ¹	Regressor ²	Coefficiente de Determinação	Teste F	Coefficiente de Variação
1	ppm	ppm	.5208	36.5822	16.56
2	ppm	g	.5144	35.6630	16.67
3	g	ppm	.4964	33.1817	18.06
4	g	g	.5132	35.4868	17.75

¹Mn no osso, em concentração (ppm) ou quantidade total (g).

²Mn na ração, em concentração na dieta (ppm) ou quantidade total ingerida (g).

faixa de suplementação de Mn utilizada, de 0 a 90 ppm. Mantido o erro experimental constante, o R^2 será maior quanto maior for o nível máximo de suplementação de Mn. Black et al. (1984a), por exemplo, trabalhando com níveis de 0 a 4000 ppm, obtiveram R^2 para teor de Mn no osso de até .99. Quando Watson et al. (1970) mediram a deposição de Mn no osso resultante de dietas com 0 a 30 ppm de Mn, o R^2 foi de apenas .45. Outros trabalhos (Henry et al., 1986) também apresentaram R^2 proporcional à amplitude de valores de suplementação de Mn utilizada.

Quando se trabalha com fontes orgânicas de Mn, o nível de suplementação é sempre baixo, pois o teor de Mn dos alimentos, por maior que seja, é muito menor que o de fontes minerais. Assim, é de se esperar que os R^2 sejam baixos, estando os valores em torno de .50 perfeitamente normais.

O Modelo 1 foi utilizado para a análise de regressão do teor de Mn no osso e nos rins, sendo obtidas as seguintes equações, em função do Mn suprido pelo

FAI (MF, ppm) ou pelo sulfato de Mn (MS, ppm):

$$\text{Mn Osso} = 3.3033 + .01574624 \text{ MF} + .02428714 \text{ MS}$$

$$R^2 = .5208$$

$$\text{Efeito do sexo: } S_M - S_F = -.5734$$

$$\text{Disponibilidade do Mn do FAI} = 64.8 \%$$

$$\text{Mn Rins} = 10.0176 - .00179885 \text{ MF} + .00987051 \text{ MS}$$

$$R^2 = .1263$$

$$\text{Efeito do sexo: } S_M - S_F = -.5698$$

$$\text{Disponibilidade do Mn do FAI} = -18.2 \%$$

Novamente, o teor de Mn no osso pareceu refletir melhor o nível de Mn ingerido, pois apresentou um coeficiente de determinação de .5208 contra apenas .1263 do teor de Mn nos rins. Além disto, todos os coeficientes de regressão foram altamente

significativos ($P < 0.001$) na equação de teor de Mn no osso, enquanto o coeficiente de MF da regressão de teor de Mn nos rins não foi significativo ($P > .60$) e apresentou valor negativo, o que é incoerente com o aumento na ingestão de Mn nos tratamentos com maior quantidade de FAI na dieta. Esse resultado confirma o da análise da variância de que o teor de Mn no osso foi a medida que melhor refletiu o aproveitamento do Mn da dieta.

Em diversos trabalhos (Black et al., 1985); Henry et al., 1986, 1987, 1989; WongValle et al., 1989), o acúmulo de Mn nos ossos mostrou ser uma resposta mais precisa que os demais tecidos animais, por apresentar coeficiente de declividade maior e melhor ajuste do modelo, dado pelo coeficiente de correlação (r). Black et al. (1984b) classificaram os tecidos através do critério lambda (declividade dividida pelo desvio padrão) e do coeficiente de correlação (r), em função da sua adequabilidade aos ensaios biológicos na seguinte ordem decrescente: osso, rins, plasma, fígado e músculo, recomendando o uso do Mn no osso e nos rins como variável de resposta a ser usada nos bioensaios.

No presente trabalho, o Mn nos rins se comportou de maneira instável, talvez devido à estreita faixa de suplementação e aos baixos teores utilizados de Mn na dieta. Ao utilizar fontes orgânicas de Mn, os níveis de suplementação sempre serão baixos não sendo recomendada a análise dos rins. Nestes casos, sugere-se avaliar apenas o Mn no osso, por resultar numa resposta mais consistente.

Nas condições do presente experimento, concluiu-se que a resposta do Mn no osso ao Mn na dieta é melhor estimada quando ambas as variáveis são medidas em termos de concentração, sendo que o Mn no osso mede melhor a resposta

ao teor de Mn na dieta do que o Mn nos rins.

Literatura Citada

- Black, J.R., C.B. Ammerman, P.R. Henry, and R.D. Miles. 1984a. Biological availability of manganese sources and effects of high dietary manganese on tissue mineral composition of broiler type chicks. *Poult. Sci.* 63:1999.
- Black, J.R., C.B. Ammerman, P.R. Henry, and R.D. Miles. 1984b. Tissue manganese uptake as a measure of manganese bioavailability. *Nutr. Rep. Int.* 29:807.
- Black, J.R., C.B. Ammerman, P.R. Henry, and R.D. Miles. 1985. Effect of dietary manganese and age on tissue trace mineral composition of broiler-type chicks as a bioassay of manganese sources. *Poult. Sci.* 64:688.
- Cotzias, G.C. 1962. Manganese. In: Comar, C.L., and F. Bronner (Ed.). *Mineral Metabolism: An Advanced Treatise*, v. 2B. Academic Press, New York.
- EMBRAPA. 1990. Núcleo Tecnológico Informática Agropecuária (Campinas, SP).
- Fialho, F.B. 1991. Disponibilidade do Manganês do Farelo de Arroz para Frangos de Corte. UFRGS, Porto Alegre. Tese de Mestrado.
- Finney, D.J. 1978. *Statistical Method of Biological Assay* (3rd Ed.). Charles Griffith and Co. Ltd., London.

- Gallup, W.D., and L.C. Norris. 1939. The amount of manganese required to prevent perosis in the chick. *Poult. Sci.* 18:76.
- Halpin, K.M., and D.H. Baker. 1986. Manganese utilization in the chick: effects of corn, soybean meal, fish meal, wheat bran and rice bran on tissue uptake of manganese. *Poult. Sci.* 65:995.
- Henry, P.R., C.B. Ammerman, and R.D. Miles. 1986. Bioavailability of manganese sulfate and manganese monoxide in chicks as measured by tissue uptake of manganese from conventional dietary levels. *Poult. Sci.* 65:983.
- Henry, P.R., C.B. Ammerman, and R.D. Miles. 1987. Bioavailability of manganese monoxide and manganese dioxide for broiler chicks. *Nutr. Rep. Int.* 36:425.
- Henry, P.R., C.B. Ammerman, and R.D. Miles. 1989. Relative bioavailability of manganese in a manganese-methionine complex for broiler chicks. *Poult. Sci.* 68:107.
- Mathers, J.W., and R. Hill. 1967. Factors influencing the retention of an oral dose of radioactive manganese by the chick. *Br. J. Nutr.* 21:513.
- Mathers, J.W., and R. Hill. 1968. Manganese in the nutrition and metabolism of the pullet: 2. The manganese contents of the tissues of pullets given diets of high or low manganese content. *Br. J. Nutr.* 22:635.
- Suso, F.A., and H.M. Edwards, Jr. 1969. Whole body counter studies on the absorption of Co^{60} , Fe^{59} , Mn^{54} and Zn^{65} by chicks, as affected by their dietary levels and other supplemental divalent elements. *Poult. Sci.* 48:933.
- Underwood, E.J. 1977. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* (4th Ed.). Academic Press, New York.
- Watson, L.T., C.B. Ammerman, S.M. Miller, and R.H. Harms. 1970. Biological assay of inorganic manganese for chicks. *Poult. Sci.* 49:1548.
- Weigand, E., and M. Kirchgessner. 1988. Endogenous excretion and true retention of manganese in response to graded levels of dietary Mn supply in chicks. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 60:197.
- Wilgus, Jr., H.S., L.C. Norris, and G.F. Heuser. 1936. The role of certain inorganic elements in the cause and prevention of perosis. *Science.* 84:252.
- Wong-Valle, J., C.B. Ammerman, P.R. Henry, P.V. Rao, and R.D. Miles. 1989. Bioavailability of manganese from feed-grade manganese oxides for broiler chicks. *Poult. Sci.* 68:1,368.