

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Efeitos da suplementação de cantaxantina e 25-
Hidroxicolecalciferol para reprodutores de codorna
europeias

Autor: Lucas Pimentel Bonagurio
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos

MARINGÁ
Estado do Paraná

Efeitos da suplementação de cantaxantina e 25-Hidroxicolecalciferol para reprodutores de codorna europeias

Autor: Lucas Pimentel Bonagurio
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Carlesso dos Santos

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá- Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B697e Bonagurio, Lucas Pimentel
Efeitos da suplementação de cantaxantina e 25-Hidroxicolecalciferol para reprodutores de codornas européias / Lucas Pimentel Bonagurio. – Maringá, 2017.
113 f. : il., tabs., figs. (algumas color.).
Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos.
Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.
1. Codornas de corte - Reprodução. 2. Codornas de corte - Nutrição. 3. Codornas de corte - Nutrição - Vitamina D. 4. Codornas de corte - Nutrição - Cantaxantina. I. Santos, Tatiana Carlesso dos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.6

MGC-002025



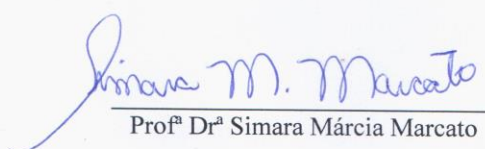
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

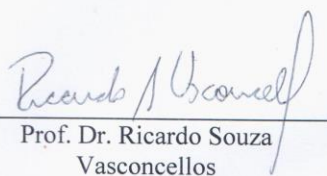
EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE CANTAXANTINA E
25-HIDROXICOLECALCIFEROL PARA REPRODUTORES
DE CODORNAS EUROPEIAS


Autor: Lucas Pimentel Bonagurio
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Tatiana Carlesso dos Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 07 de abril de 2017.


Prof^ª Dr^ª Simara Márcia Marcato


Prof. Dr. Ricardo Souza
Vasconcellos


Prof^ª Dr^ª Tatiana Carlesso dos
Santos
(Orientadora)

Aos meus pais, Gilberto Bonagurio e Claudia Dias Pimentel, por toda colaboração e paciência nesta longa caminhada.

A minha esposa, Camila De Araújo Moreira, por estar do meu lado em todos os momentos e para meu filho Raul Moreira De Araújo Pimentel Bonagurio.

Aos meus avós, Pedro Dias Pimentel, Onira bonagurio, Geraldo Bonagurio e Marina Bonagurio, a minhas tias, Alaíde Bonagurio Julio, Sarita Bonagurio Gallo, Luzia Peressin Bonagurio, Silvana Bonagurio Pavan, por serem essenciais na minha vida,

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilberto Bonagurio e Claudia Dias Pimentel, por todo o apoio solicitado para que este sonho se tornasse realidade. Agradeço pela compreensão, incentivo, paciência e apesar da distância meu coração sempre estará com vocês.

Aos meus queridos avós Onira Leite Pimentel e Pedro Dias Pimentel, sem vocês chegar nesta defesa de dissertação seria impossível. E aos meus inesquecíveis avós Geraldo Bonagurio e Marina Rossi Bonagurio que não estão, mas entre nós.

À minha esposa Camila de Araújo Moreira, a qual, sou eternamente grato por tê-la ao meu lado e ao nosso filho Raul de Araújo Moreira.

À minha família e amigos, por estarem sempre comigo me apoiando, entendendo minhas ausências e acreditando na minha capacidade.

À minha orientadora, Tatiana Carlesso dos Santos, pela convivência durante estes dois últimos anos, que me ensinou a ter perspectiva mais ampla de pesquisas em monogástricos, conhecimentos que levarei comigo pelo resto da minha vida e por toda a compreensão, confiança, paciência, apoio e orientação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelo conhecimento transmitido. Em especial aos professores Paula Toshimi Matumoto Pinto, Alice Eiko Murakami, Paulo Cesar Pozza, Leandro Dalcin Castilha, Carlos Antonio Lopes de Oliveira, Ricardo Souza Vasconcellos, Ricardo Pereira Ribeiro, Simara Márcia Marcatto, pela colaboração essencial neste projeto.

Aos amigos de grupo de pesquisa: Flavia Klesck, Isabelle Naemi Kaneco, Christian Figueroa, Guilherme, Luis, Mariana e Lidiane, pela colaboração tonando possível a realização desta dissertação.

Aos meus amigos que fiz durante o tempo em que resido em Maringá. Em especial ao Leandro Dalcin, Gabriel Baptista Cesar, Wilker Caetano, Jones Bahri, Renan Sanches, Alceu Kazuo, Henrique Ubiara, Renato Sonchini, Alcides Emanuel, Manoel Nogueira.

Em especial ao Leandro Dacil Castilha e Jones Bahri, que muitas vezes prestaram diversos auxílios como, caronas para a Fazenda Experimental de Iguatemi, moradia, confiança e amizade.

Aos meus amigos de infância ou também reconhecidos como irmãos: Alexandre Janotta, Olavo Baptistella, Gustavo Baptistella, Bruno Baptistella, Conrado Baptistella, Renan Bersani, Henrique Anacretto Pereira, Guilherme Bulgraen, Vinicius Frasceto, Rafael Frasceto, Mauricio Renosto, Leandro..., Rafael Scroca e Rafael Albieiro, pela amizade sincera de tantos anos. Em especial ao Olavo Baptistella, que cedeu espaço em sua casa para diversos congressos colaborando em meu aperfeiçoamento como profissional

Aos funcionários do LANA, Augusto e Osvaldo, pelo auxílio nas análises laboratoriais. Aos funcionários do COMCAP e centro odontológico, pela atenção para a utilização dos aparelhos.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, sempre dispostos a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Capes), pela concessão da bolsa de estudo, que possibilitou a realização do mestrado.

BIOGRAFIA

Lucas Pimentel Bonagurio, filho de Gilberto Bonagurio e Claudia Dias Pimentel, nasceu em Capivari-SP, no dia 24 de outubro de 1990.

Em dezembro de 2014, concluiu a graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, Campus Maringá.

Em março de 2015, ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de nutrição e produção animal.

No mês de abril de 2017, submeteu-se à banca para a defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
TABELAS DO APÊNDICE	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I - INTRODUÇÃO.....	1
1. Revisão de literatura.....	3
1.1. Metabolismo lipídico em aves.....	3
1.2. Metabolismo oxidativo.....	6
1.3. Sistema antioxidante.....	9
1.3.1 Sistemas oxidante e antioxidante na gema do ovo e embriões.....	11
1.4. Armazenamento de ovos.....	12
1.5. Carotenoides.....	12
1.6. Cantaxantina na dieta de aves.....	13
1.7. Vitamina D e seus metabólitos.....	15
1.7.1. Suplementação de 25-(OH)D ₃ em dietas de aves.....	17
1.8. Aspectos reprodutivos.....	18
1.8.1. Estresse oxidativo como causa da infertilidade.....	19
1.8.2. Efeitos da idade sobre a fertilidade.....	20
CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
II – OBJETIVO GERAL.....	35
III - Efeito da cantaxantina associada ao 25-Hidroxicolecalciferol sobre o desempenho produtivo, tecidos ósseos e status antioxidante em reprodutores de codorna europeia.....	36
Resumo.....	36

Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	39
Resultados e discussão.....	47
Conclusões.....	59
Referências.....	60
IV - Associação da cantaxantina + 25-hidrocoleciferol no desempenho de incubação e na qualidade da progênie em codornas europeias.....	64
Resumo.....	64
Abstract.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
Resultados e discussão.....	73
Conclusões.....	84
Referências.....	84
V - Associação da cantaxantina + 25-hidroxicoleciferol melhora o status antioxidante durante a incubação e nas primeiras semanas de vida da progênie em codornas europeias.....	87
Resumo.....	87
Abstract.....	88
Introdução.....	89
Material e Métodos.....	90
Resultados e discussão.....	96
Conclusões.....	105
Referências.....	106
VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
VII – APÊNDICE.....	109

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Composição centesimal, química e energética das rações experimentais contendo $Cx+25-(OH)D_3$ para reprodutores de codornas europeias, na fase de postura.....	41
TABELA 2. Coloração de gemas nos ovos das matrizes de codornas europeias ao longo de cinco ciclos, suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	51
TABELA 3. Níveis plasmáticos de albumina, proteínas, fosfatase, fósforo, cálcio e cálcio iônico em matrizes e machos suplementados com níveis de $Cx+25-(OH)D_3$	53
TABELA 4. Análise da composição do ossos do membro pélvico de matéria mineral e resistência ósseas de fêmeas de codornas europeias com 42 semanas suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	55
TABELA 5. Análise da composição dos ossos do membro pélvico de matéria mineral e resistência ósseas em machos reprodutores de codornas europeias, com 42 semanas de idade suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	56
TABELA 6. Capacidade redutora de radicais livres (% DPPH) e oxidação lipídica (TBARS) no soro sanguíneo e no tecido hepático dos reprodutores de codornas europeias (n=8) com 42 semanas de idade, suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	57
TABELA 7. Composição centesimal, química e energética das rações experimentais contendo $Cx+25-(OH)D_3$ para reprodutores de codornas europeias na fase de postura.....	69
TABELA 8. Desempenho de incubação e mortalidade embrionária de codornas europeias com 32 e 38 semanas suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$...	74
TABELA 9. Desdobramento da interação da Idade e dieta na fase inicial e em ovos bicados que não eclodiram.....	75

TABELA 10. Composição centesimal química e energética das rações experimentais contendo $Cx+25-(OH)D_3$ para reprodutores de codornas europeias na fase de postura.....	92
TABELA 11. Período de armazenamentos e análises de % DPPH e TBARS (MDA) na gema do ovo liofilizada de reprodutores de codornas europeias suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	96
TABELA 12. Análise de DPPH e TBARS no fígado e no músculo de embriões com 15 dias de incubação sob duas condições de armazenamento e em pintinhos no dia da eclosão e com sete dias após a eclosão.....	103
TABELA 13. Desdobramento da interação do armazenamento e dias de incubação e de vida no fígado e músculo de pintinhos de codornas europeias suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	103

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Via metabólica do transporte de lipídeos em aves.....	4
FIGURA 2. Estrutura do ovo, localização de nutrientes e de enzimas essenciais na atividade antioxidante no ovo.....	11
FIGURA 3. Síntese da vitamina D ₃	17
FIGURA 4. Probabilidade de fertilidade de reprodutores de codornas europeias em função do número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica (sptz/mm ²) sobre o disco germinativo. E, análise do número de espermatozoides (sptz/mm ²) fixados na membrana vitelínica em função dos dias de coleta dos ovos após a cópula de reprodutores de codornas europeias.....	79
FIGURA 5. Probabilidade de fertilidade de reprodutores com 26 e 40 semanas de idade analisada pelo número de espermatozoides (sptz/mm ²) fixados na membrana vitelínica sobre o disco germinativo em função dos dias após a cópula.....	80
FIGURA 6. Número de espermatozoide (N ^o sptz) fixados na membrana vitelínica (sptz/mm ²) em função das idades dos reprodutores (26 e 40 semanas), dos dias em que os ovos foram coletados após a cópula e dos níveis de Cx+25-(OH)D ₃	81
FIGURA 7. Mensuração da capacidade redutora de radicais livres (% DPPH), em vitelo liofilizado, com diferentes armazenamentos (0 e 8 dias), durante 17 dias de incubação, provenientes de matrizes de codornas europeias (idade), suplementadas com Cx+25-(OH)D ₃	98
FIGURA 8. Mensuração da oxidação lipídica (TBARS), no conteúdo vitelínico liofilizado de ovos sem armazenamento e com 8 dias de armazenamento e coletados na incubação (2 ^o , 4 ^o , 6 ^o , 10 ^o e 15 ^o dias) e na eclosão (17 ^o dia) de pintinhos de matrizes de codornas europeias suplementadas com Cx+25-(OH)D ₃	99

TABELAS DO APÊNDICE

	Página
TABELA 1. Médias da probabilidade de fertilidade após a copula de reprodutores de codornas europeias suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$	110
TABELA 2. Médias do número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica após a cópula de reprodutores de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$	111
TABELA 3. Médias de DPPH no conteúdo vitelínico durante a incubação de ovos de reprodutores de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$	112
TABELA 4. Médias de TBARS no conteúdo vitelínico durante a incubação de ovos de reprodutores de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$	113

RESUMO

O objetivo foi estudar os efeitos da suplementação de diferentes níveis da associação entre a Cantaxantina (Cx) e o 25-Hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃) em reprodutores de codornas europeias sobre o desempenho produtivo, a qualidade do ovo, o sistema genital e o status antioxidante na gema do ovo, no conteúdo vitelínico, fígado e músculo. No experimento I, foram descritos o desempenho produtivo, a qualidade dos ovos, os parâmetros bioquímicos do sangue, a composição mineral da casca do ovo e, dos ossos do membro pélvico, a coloração da gema e o status antioxidante. Foram utilizados 240 reprodutores, submetidos à suplementação de cinco diferentes níveis da associação entre Cx e 25-(OH)D₃, com oito repetições, o desempenho produtivo foi avaliado durante cinco ciclos (21 dias). A qualidade de ovos, a composição mineral da casca dos ovos, a coloração da gema e o peso dos ovos foram avaliada nos três últimos dias de cada ciclo. Ao término do experimento I, foram eutanasiadas quatro matrizes por tratamento e sexo (n=40), para avaliar o status antioxidante no fígado e no soro sanguíneo, a resistência óssea, a quebra e a composição mineral óssea dos membros pélvicos dos reprodutores de codornas europeias. O desempenho e a qualidade dos ovos não foram influenciadas pelos níveis de Cx+25-(OH)D₃. A luminosidade e a cor amarela (b*) da gema diminuiu linearmente, enquanto a cor vermelha aumentou de modo quadrático, demonstrando que a cor da gema mudou de amarelo para vermelha. Em relação a composição mineral das cascas dos ovos, houve redução linear da matéria seca e aumento quadrático da deposição de cálcio, reduzindo a quantidade de água e aumentando a concentração de minerais, principalmente o cálcio e o fósforo em função das dietas. O nível sérico de cálcio, fósforo e cálcio iônico das fêmeas, reduziu de modo quadrático. Assim como a concentração de matéria seca, cinzas e cálcio do fêmur e cinza e cálcio do tibiotarso. Indicando maior remoção de cálcio e fósforo do metabolismo para intensificar a deposição dos mesmos na casca do ovo. Nos machos, houve aumento da concentração de cálcio e da resistência óssea, demonstrando que o tibiotarso se tornou mais rígido e menos propenso à quebra. As análises antioxidantes (DPPH e TBARS) demonstraram que houve maior remoção de radicais livres no soro das fêmeas, assim como no fígado de fêmeas e machos e menor concentração de malonaldeídos no fígado, para ambos os sexos em função das dietas. A suplementação de reprodutores com Cx+25-(OH)D₃ alterou a cor da gema, modificou o metabolismo do cálcio com efeitos na casca do ovo, nas variáveis bioquímicas e nos ossos, promoveu também maior capacidade de remover radicais livres no soro sanguíneo e no fígado reduzindo a peroxidação lipídica no fígado de reprodutores de codornas europeias. Baseado na deposição de cálcio na casca do ovo e no aumento da atividade antioxidante o melhor nível foi o de 5 ppm + 2300 UI 25-(OH)D₃. No experimento II, objetivou-se descrever o desempenho de incubação, a qualidade de pintinho, a interação espermatozoide-ovo. Para o desempenho de incubação foram coletados ovos por 4 dias e armazenados em sala refrigerada (20°C), e posteriormente, incubados por 15 dias e

transferidos para a nascedoura. Para avaliar a interação espermatozoide-ovo, foram utilizados nove casais de codornas europeias que foram mantidos na mesma gaiola por 24 horas e separados, foram coletados ovos por 12 dias consecutivos e armazenados em geladeira a 4° C. Para avaliar a qualidade do pintinho, foram utilizados 50 pintinhos ao eclodirem por tratamento e idade, foi mensurado o tamanho do pintinho e o índice de Pasgar®. No desempenho de incubação realizado nas duas idades (32 e 38 semanas), houve interação entre a mortalidade embrionária inicial e o número de ovos bicados, com comportamento quadrático, sendo que nas matrizes mais novas a redução da mortalidade e de ovos quebrados foram maiores. Independentemente da idade, houve aumento da fertilidade, eclodibilidade total, eclodibilidade de ovos férteis e redução da infertilidade e mortalidade embrionária, indicando que o desempenho dos reprodutores de codornas de corte europeias foi maximizado mesmo em matrizes mais velhas com a suplementação de $Cx+25-(OH)D_3$. Na interação espermatozoide-ovo, a probabilidade de fertilidade aumentou de modo quadrático, assim como o número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica, demonstrando resultados semelhantes entre as matrizes de 42 e 26 semanas de idade. Na qualidade do pintinho, houve aumento do comprimento e do índice de Pasgar® de modo quadrático crescente, indicando melhora na qualidade do pintinho com adição de $Cx+25-(OH)D_3$. Com relação ao desempenho de incubação, o nível estimado de 5,90 ppm de $Cx+25-(OH)D_3$ proporcionou maiores índices de eclodibilidade total, de ovos férteis e de fertilidade e reduziu a mortalidade de ovos férteis, e durante o desenvolvimento embrionário durante a incubação e a fertilidade preservando os espermatozoides dos reprodutores até a 40ª semana, melhorando a viabilidade dos reprodutores e aumentou o comprimento e o escore de Pasgar® dos pintinhos com 1 dia de idade, melhorando a qualidade da progênie. No experimento III, objetivou-se foi descrever o status antioxidante na gema do ovo, no conteúdo vitelínico durante o processo de incubação sem armazenamento e armazenado (8 dias) no músculo e fígado de embrião do último dia de incubação (15º dia), do pintinho no dia da eclosão e com sete dias após a eclosão. Não houve influência da interação entre o armazenamento, os dias de incubação e os níveis de $Cx+25-(OH)D_3$. Na análise do status antioxidante na gema do ovo liofilizada, o armazenamento reduziu a remoção de radicais livres e aumentou a peroxidação lipídica. No status antioxidante do conteúdo vitelínico na incubação e na eclosão, houve influência da dieta de modo quadrático crescente sobre a capacidade de remoção de radicais livres e redução de modo quadrático da concentração de malonaldeído, indicando menor oxidação lipídica do conteúdo vitelínico. No tecido hepático e muscular da progênie, o armazenamento diminuiu a capacidade de remoção de radicais livres e aumentou a peroxidação lipídica. As dietas influenciaram de modo quadrático a capacidade de remoção de radicais livres, reduziram a peroxidação lipídica e aumentaram o peso da progênie no dia da eclosão, demonstrando que a associação entre a $Cx+25-(OH)D_3$ foi efetiva a maximizar o sistema antioxidante. No sistema antioxidante, intensificou a capacidade redutora de radicais livres e minimizou a peroxidação de biomoléculas na gema in natura, no conteúdo do saco vitelínico liofilizado, no fígado e no músculo de embriões e pintinhos de codornas europeias. A adição de $Cx+25-(OH)D_3$ à níveis próximos de 6 ppm + $25-(OH)D_3$ intensificou a proteção contra a oxidação e diminuiu a peroxidação lipídica. Entretanto, em níveis acima de 6 ppm + $25-(OH)D_3$ prejudicou o sistema antioxidante.

Palavras-chave: Carotenoides, reprodução, sistema antioxidante, vitamina D_3 .

ABSTRACT

The objective was to study the effects of supplementation of different levels of the association between Canthaxanthin (Cx) and 25-Hydroxycholecalciferol (25-(OH)D₃) on European quail breeders on productive performance, egg quality, genital system and antioxidant status in egg yolk, yolk content, liver and muscle. In the experiment I, productive performance, egg quality, blood biochemical parameters, mineral composition of egg shell and, of pelvic limb bones, yolk color and antioxidant status were described. A total of 240 breeding herds, supplemented with five different levels of the association between Cx and 25-(OH)D₃, with eight replications, were used for five cycles (21 days). Egg quality, egg shell mineral composition, yolk color and egg weight were evaluated on the last three days of each cycle. At the end of the experiment I, four matrices per treatment and sex (n = 40) were euthanized to evaluate the antioxidant status in the liver and blood serum, bone resistance, breakage and bone mineral composition of the pelvic limbs of quail breeders European countries. Performance and egg quality were not influenced by Cx + 25-(OH)D₃ levels. The brightness and the yellow color (b *) of the yolk decreased linearly, while the red color increased in a quadratic way, demonstrating that the color of the yolk changed from yellow to red. In relation to the mineral composition of the egg shells, there was a linear reduction of dry matter and quadratic increase of calcium deposition, reducing the amount of water and increasing the concentration of minerals, mainly calcium and phosphorus as a function of the diets. The serum calcium, phosphorus and ionic calcium level of the females decreased in a quadratic fashion. As well as the concentration of dry matter, ashes and calcium of the femur and gray and calcium of the tibiotarso. Indicating greater removal of calcium and phosphorus from the metabolism to intensify the deposition of the same in the eggshell. In males, calcium concentration and bone strength increased, demonstrating that the tibiotarso became stiffer and less prone to breakage. The antioxidant analyzes (DPPH and TBARS) showed that there was a greater removal of free radicals in the serum of the females, as well as in the liver of females and males and lower concentration of malonaldehydes in the liver, for both sexes as a function of the diets. Supplementation of Cx + 25-(OH)D₃ broilers altered the color of the yolk, modified calcium metabolism with effects on egg shell, biochemical variables and bone, also promoted a greater ability to remove free radicals in serum and in the liver by reducing lipid peroxidation in the liver of European quail breeders. Based on the deposition of calcium in the eggshell and the increase in antioxidant activity, the best level was 5 ppm Cx + 2300 IU 25-(OH)D₃. In experiment II, the objective was to describe the performance of incubation, chick quality, egg-sperm interaction. For the incubation performance, eggs were collected for 4 days

and stored in a refrigerated room (20°C), and then incubated for 15 days and transferred to the nascedoura. In order to evaluate the spermatozoon-egg interaction, nine pairs of European quails were kept in the same cage for 24 hours and separated, eggs were collected for 12 consecutive days and stored in a refrigerator at 4° C. In order to evaluate the quality of the chick, used 50 chicks when hatching per treatment and age, chick size and Pasgar® index were measured. In the incubation performance performed at both ages (32 and 38 weeks), there was interaction between the initial embryonic mortality and the number of diced eggs, with quadratic behavior, and in the younger matrices the reduction of mortality and broken eggs were higher. Regardless of age, there was an increase in fertility, total hatchability, hatchability of fertile eggs and reduction of infertility and embryonic mortality, indicating that the performance of European quail breeders was maximized even in older matrices with supplementation of Cx+25-(OH)D₃. In the egg-sperm interaction, the probability of fertility increased in a quadratic way, as well as the number of spermatozoa fixed in the yolk membrane, showing similar results between matings of 42 and 26 weeks of age. In chick quality, there was an increase in the length and the Pasgar® index in a quadratic manner, indicating an improvement in chick quality with addition of Cx + 25-(OH) D₃. Concerning the incubation performance, the estimated level of 5.90 ppm of Cx + 25-(OH)D₃ provided higher rates of total hatchability, fertile eggs and fertility, and reduced mortality of fertile eggs, and during embryonic development during incubation and fertility by preserving the reproductive spermatozoa up to the 40th week, improving the viability of the reproductive organs and increasing the length and the Pasgar® score of the chicks at 1 day of age, improving the quality of the progeny. In the experiment III, was to describe the antioxidant status in egg yolk, yolk content during the incubation process without storage and stored (8 days) in the muscle and embryo liver of the last day of incubation (15th day), of the chick on the day of hatching and seven days after hatching. There was no influence of the interaction between the storage, the days of incubation and the levels of Cx+25-(OH)D₃. In the analysis of antioxidant status in lyophilized egg yolk, storage reduced free radical removal and increased lipid peroxidation. In the antioxidant status of the yolk content in incubation and hatching, there was a growing quadratic influence of the diet on the ability of free radical removal and quadratic mode reduction of the malonaldehyde concentration, indicating lower lipid oxidation of the yolk content. In the hepatic and muscular tissue of the progeny, storage decreased the capacity of free radical removal and increased lipid peroxidation. Diets influenced in a quadratic way the capacity of free radical removal, reduced lipid peroxidation and increased progeny weight on hatching day, demonstrating that the association between Cx + 25-(OH)D₃ was effective in maximizing the antioxidant system . In the antioxidant system, it intensified the free radical reducing ability and minimized the peroxidation of biomolecules in the yolk in natura, the contents of lyophilized yolk sac, liver and embryo muscle and European quail chicks. Addition of Cx + 25-(OH)D₃ to levels near 6 ppm Cx + 2760 UI 25-(OH)D₃ enhanced protection against oxidation and decreased lipid peroxidation. However, at levels above 6 ppm Cx+ 2700 UI 25-(OH)D₃, it harmed the antioxidant system.

Key words: Carotenoids, reproduction, antioxidant system, vitamin D3.

I. INTRODUÇÃO

As aves possuem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), principalmente nos espermatozoides, tecidos embrionários. Os PUFAs são susceptíveis ao ataque de radicais livres que degradam lipídios, proteínas e núcleos de DNA. Quando PUFAs são degradados, causam reação em cadeia de degradação e podem prejudicar o desempenhos produtivos e os índices reprodutivos de aves em crescimento, reprodutores e poedeiras comerciais (Surai, 2016). O estresse oxidativo sobre as fêmeas causa maiores danos em relação aos machos, pois as fêmeas são responsáveis pelas principais funções dentro da cadeia produtiva, a formação do ovo (casca, albúmen e gema), fertilização do ovócito e transferência de nutrientes da dieta para a gema do ovo. Devido a estes fatores sua exigência nutricional em relação aos machos é maior.

Na produção comercial de aves, a prevenção contra o estresse oxidativo é essencial. Diversos fatores, como o armazenamento dos ovos, estresse calórico, micotoxinas, idade dos reprodutores, instalações, maquinários, etc (Fotina et al., 2013) podem aumentar o estresse oxidativo e piorar a qualidade da casca do ovo e dos espermatozoides. A redução da fertilidade é um dos principais agravantes na produção avícola causando prejuízos inestimáveis a cadeia produtiva (Surai et al., 1998).

No processo de fertilização do ovócito, as aves armazenam os espermatozoides por longos períodos após à copula nos túbulos de estocagem de espermatozoides, principalmente na junção útero vaginal (Bakst, 1981). Para a estocagem por vários dias ou semanas dos espermatozoides é necessário proteger os espermatozoides que são compostos em grande parte por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) contra a oxidação lipídica. Nesta proteção, nutrientes com propriedade antioxidantes (carotenoides, vitamina C e E) são essenciais na remoção de radicais livres ($-O_2$) e atuam em sinergia com as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CA) no trato reprodutivo das fêmeas para manter as características dos espermatozoides e aumentar a fertilidade (Breque et al., 2006, Surai et al., 2006).

O desenvolvimento embrionário é iniciado após a fertilização do ovócito formando o óvulo e os nutrientes fornecidos nas dietas maternas interferem diretamente no desenvolvimento embrionário, pois vitaminas lipossolúveis (D, E, A, K), carotenoides

e outros nutrientes são depositados na gema do ovo e posteriormente transferidos pela membrana do saco vitelínico para o embrião (Schneider, 2016)

Dentro do grupo dos carotenoides, a cantaxantina (Cx) que é membro da família das xantofilas, assim como a luteína, a zeaxantina e a β -criptoxantina, fucoxantina e estão presentes em diversas plantas como o milho, alfafa, espinafre, entre outras. No milho, as xantofilas, são encontradas principalmente no endosperma e podem estar presentes na quantidade de 11 a 30 mg/kg (Moros et al., 2002). Em relação à concentração de Cx no milho, foi determinada em 0,98 ppm (Rivera & Canela, 2012). A concentração de carotenoides na gema do ovo aumentou de 1,98 mg/kg para 27,80 mg/kg de gema do ovo de reprodutores suplementados com Cx (Rosa et al., 2016). A Cx dietética é absorvida no intestino delgado e depositada em na gema do ovo (Spada et al., 2016), no fígado (Surai et al., 2003), nas penas (Ren et al., 2016a), pernas, carne e na gordura abdominal (Tunio et al., 2013).

A gema do ovo, os espermatozoides e os tecidos embrionários são ricos em PUFA's que desempenham funções essenciais para manter a integridade das membranas fosfolipídicas, entretanto são susceptíveis a oxidação lipídica. A Cx possui propriedades antioxidantes *in vivo* e *in vitro* (Surai, 2002), suas propriedades antioxidantes em parte ocorre pela capacidade de remover radicais livres e de suas espécies reativas a oxigênio (ROS), ao nitrogênio (RNS) e de outros produtos tóxicos ao metabolismo como o malonaldeído (Rocha et al., 2010, Surai et al., 2001a, Surai, 2012).

Nestes tecidos é depositada no interior da mitocôndria, em que remove moléculas livres de oxigênio (O_2) derivadas da respiração celular (Karadas et al., 2016, Karadas et al., 2005, Møller et al., 2000, Surai, 2012, Surai et al., 2016). Deste modo a Cx pode reduzir a oxidação de biomoléculas e de peróxidos que degradam lipídios, proteínas e DNA, processo importante durante a eclosão pelo alto estresse oxidativo para o embrião em função do gasto energético para eclodir e da quantidade abundante de oxigênio na atmosfera (Surai et al., 2003). Maiores níveis de Cx depositada nos tecidos embrionários podem melhorar a qualidade do pintinho no primeiro dia de vida e permanecer no metabolismo durante as primeiras semanas de vida da progênie (Surai et al., 2003). A suplementação de Cx aumentou a pigmentação na gema do ovo, a capacidade antioxidante reduziu a mortalidade em frangos de corte (Zhang et al. (2011). Também melhorou os índices de desempenho de incubação e diminuiu a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na gema do ovo e na fase inicial de incubação (0 a 7 dias) (Rosa et al., 2012).

Além de suas funções no sistema antioxidante a Cx tem demonstrado ter relação com o sistema imune, no qual a ação da vitamina D e de seus metabólitos (25-(OH)D₃ e 1,25-(OH)D₃ sobre a resposta imune já é bem estabelecida (Saunders-Blades & Korver, 2015). O metabólito 25-(OH)D₃ é absorvido no intestino delgado e a forma metabólica com maior taxa de conversão para hormônio calcidiol (1,25-(OH)D₃), que desenvolvem funções na reabsorção e deposição de cálcio e é de duas a quatro vezes mais disponível e é absorvido cerca de 20 % a mais do que a vitamina D₃ (Edwards Jr et al., 1992), e pode influenciar o desenvolvimento dos vilos intestinais aumentando a proliferação celular e o tamanho da cripta dos vilos no jejuno e no íleo e consequentemente melhorar o desenvolvimento embrionário (Ding et al., 2011).

Devido ao metabólito 25-(OH)D₃ proporcionar maiores níveis séricos de cálcio a produção de ovos pode ser maior (Sun et al., 2013) e alterar a qualidade da casca, o número de ovos quebrados e a fertilidade. Para a progênie, maiores níveis de 25-(OH)D₃ na gema pode influenciar a formação do esqueleto ósseo do embrião e nas primeiras semanas de vida (Saunders-Blades & Korver, 2015). Isto provavelmente ocorre em função do metabólito 25-(OH)D₃, estimular a deposição de cálcio na casca do ovo tornando-a mais robusta e aumentando a proteção do embrião contra doenças, bactérias, perda de água excessiva e maior deposição de cálcio no metabolismo do embrião, podendo estar relacionado com maiores níveis de eclosão em dietas suplementadas com o metabólito 25-(OH)D₃ (Bar et al., 1980). Saunders-Blades & Korver (2015) encontraram aumento na produção de ovos, na eclodibilidade e na resposta do sistema imune *in vitro* de pintinhos com 1 dia de relação o metabólito 25-(OH)D₃ na dieta de reprodutores

1. Revisão de literatura

1.1 Metabolismo lipídico em aves

Em aves, os lipídeos consistem principalmente de triacilgliceróis, a digestão, hidrólise e absorção ocorre nas células da mucosa do intestino, nestes processos atuam principalmente as lipoproteínas (Hermier, 1997). A síntese dos ácidos graxos ocorre principalmente no fígado (70 %), enquanto nos tecidos adiposos somente 5% é sintetizado e o restante é fornecido pelas dietas (Griffin & Hermier, 1988). A síntese de ácidos graxos que ocorre no fígado é a maior diferença entre as aves e os mamíferos que sintetizam

praticamente todos os ácidos graxos nos tecidos adiposos. Isto ocorre pois nas aves o sistema linfático do trato gastrointestinal é pouco desenvolvido (Tarugi et al., 1990).

Os ácidos graxos, são transportados na corrente sanguínea pelas lipoproteínas para os adipócitos e para os ovócitos em desenvolvimento no ovário. No processo de vitelogenese, estes são transferidos pelas lipoproteínas vitelogeninas para a gema do ovo e quando os ovos são incubados, o embrião utilizará em seu desenvolvimento (Speake et al., 1998)

As lipoproteínas são um complexo de partículas formados a partir de lipídeos e de proteínas e circulam na corrente sanguínea transportando lipídeos endógenos e exógenos. São compostas por núcleos apolares dos triacilgliceróis e colesteróis esterificados, recobertos por uma camada de fosfolipídios e colesteróis livres. Nesta camada estão presentes várias apoproteínas e suas concentrações diferem de acordo com o tamanho das partículas (Alvarenga et al., 2011)

Os mamíferos dispõem de quilomicrons para transporte dos lipídeos (Griffin & Hermier, 1988). Já nas aves, o transporte de lipídeos, principalmente, dos triacilgliceróis e dos colesteróis (livres e esterificados) pela circulação portal do trato gastrointestinal para o fígado ocorre nos portomícrons, que são lipoproteínas produzidas nos enterócitos. Sendo elas classificadas com base na densidade: lipoproteínas de muito baixa densidade (Em inglês: Very low density lipoprotein “VLDL”), que são sintetizadas no fígado e liberadas na corrente sanguínea. Lipoproteínas de densidade intermediária (Em inglês: Intermediary-density lipoproteins “IDLs), que são oriundas do metabolismo da VLDL e após a lipólise das VLDLs E ILDLs realizada pela enzima lipase lipoproteína (LPL) e lipase hepática (HL) são formadas as lipoproteínas de baixa densidade (Em inglês: Low Density Lipoproteins “LDLs”). E, as proteínas de alta densidade (Em inglês: High-density lipoproteins “HDLs”), que são formadas no fígado e possivelmente no intestino (Figura 1).

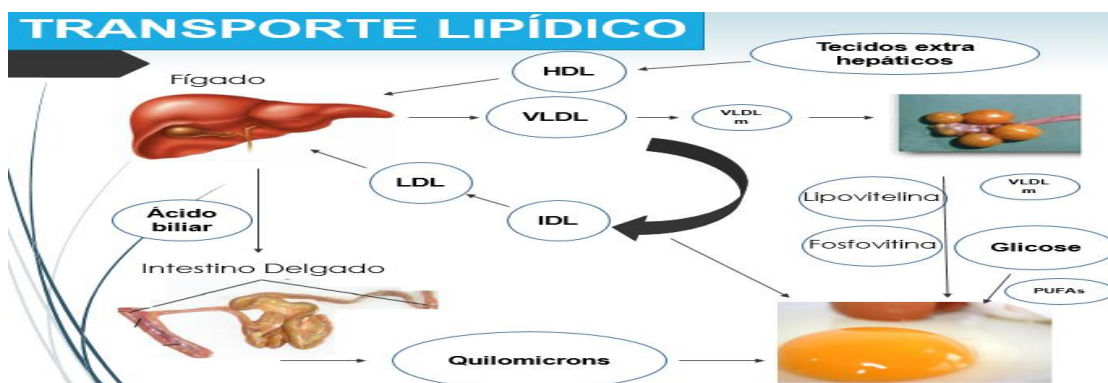


Figura 1. Via metabólica do transporte de lipídeos em aves.

O excesso de triacilgliceróis e colesteróis nos tecidos periféricos são transportados ao fígado na forma de HDLs (Alvarenga et al., 2011, Hermier, 1997, Rocha, 2011). Como previamente mencionado, em reprodutores na fase de postura ocorre a formação de lipoproteínas vitelogenina, que são sintetizadas no fígado e transportadas para o ovário atuando na formação da gema do ovo (Cherian, 2015).

Os lipídeos estão envolvidos na formação do ovo, entretanto a estrutura da camada basal dos folículos do ovário não permite a passagem de portomícrons por causa de seu tamanho. Desta forma, é necessário que o hipotálamo estimule a liberação do hormônio gonadotrofina que irá induzir a liberação do hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) que estão na hipófise (Ritchie & Pilny, 2008, Vezina et al., 2003). Estes hormônios estimulam a produção de estrógenos, desencadeando a síntese das lipoproteínas vitelogenina (VTG) e as lipoproteínas de muita baixa densidade modificada (VLDLm) que tem metade do tamanho da VLDL e possui uma apoproteína VLDL-II na sua camada superficial limitando seu uso como substrato para a enzima LPL nos tecidos. A VLDLm devido seu pequeno tamanho são transportadas para os ovócitos em maturação, em que é clivada nas únicas formas de proteínas na gema do ovo que são a fosvitina e a lipovitelina (Gruber et al., 1976). Então, as VLDLs são fontes de proteínas, de fosfolipídios e de colesterol, interferindo diretamente na composição da gema e no desenvolvimento do embrião (Surai et al., 2001b).

Após a fecundação do ovócito o desenvolvimento embrionário começa e para um desenvolvimento adequado é necessário que os nutrientes sejam fornecidos nas dietas maternas, pois serão transferidos para a gema do ovo, que é fonte exclusiva de nutrientes (lipídios, proteínas, vitaminas, minerais, antioxidantes e etc) e posteriormente para o embrião pela membrana do saco vitelínico que utilizara estes nutrientes em seu desenvolvimento.

1.2 Metabolismo oxidativos

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com número ímpar de elétrons em sua orbita externa tornando-a instáveis e propensos a reações químicas com outras moléculas, causando oxidação de diversos compostos (Fang et al., 2002). São formados em processos fisiológicos do metabolismo, como por exemplo na respiração celular realizada pela mitocôndria e também durante a resposta do sistema imune contra ataques de agentes externos (Bigarella et al., 2014, Fotina et al., 2013, Surai et al., 2006). Dentre

estes processos fisiológicos, o transporte de elétrons que ocorre dentro da mitocôndria é responsável pela respiração celular e a oxidação de NADH e NAD⁺ são as maiores fontes de ROS nos tecidos corporais. Parte do oxigênio consumido pela mitocôndria não é utilizado e são liberados das cadeias laterais formando superóxidos (Fotina et al., 2013, Singal et al., 1998)

No sistema biológico, os radicais livres são geralmente derivados de moléculas sulfuradas, de oxigênio e de nitrogênio e são classificadas em três grupos: (1) Espécies reativas ao oxigênio (ROS), (2) Espécies reativas ao nitrogênio (RNS) e (3) espécies reativas ao enxofre (RSS). Os principais radicais livres das ROS são: superóxido anión (O₂⁻), principal radical livre produzido durante o processo de respiração da mitocôndria, radical peroxil (HO 2⁻), radical hidroxil (OH) e também o óxido nítrico, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio livre (1O₂) e peróxido nítrico (ONOO⁻).

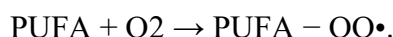
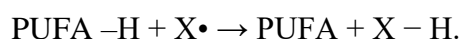
Já no grupo RNS, os radicais livres são oriundos da reação do óxido nítrico com o O₂⁻ produzindo o ONOO⁻. E, nas RSS são formados a partir das reações de tióis com ROS. (Giles & Jacob, 2002, Lü et al., 2010, Vajragupta et al., 2004).

O radical livre com maior poder oxidativo é o OH. Já as ROS e as RNS são constantemente produzidas naturalmente em processos fisiológicos que ocorrem nos tecidos. Os radicais livres possuem importantes funções na sinalização das células, apoptose, expressão de genes e transporte de íons (Giles & Jacob, 2002). Entretanto, quando em excesso aumentam o estresse oxidativo os radicais livres, as ROS e as RNS atacam constantemente os ácidos graxos, ácidos nucleicos e as cadeias laterais dos aminoácidos (Lü et al., 2010) oxidando moléculas de DNA, proteicas, lipídicas ou em carboidratos, causando danos nestes tecidos (Surai, 2016) e, conseqüentemente, podem comprometer a produção e os sistemas reprodutivo (Surai et al., 2006), imune e antioxidante (Surai et al., 2016)

O efeito mais importante dos radicais livres no metabolismo celular ocorre nas reações de peroxidação lipídica que resultam na formação de alcanos, aldeídos, álcoois, hidroperóxidos e outros produtos (Hogg & Kalyanaraman, 1999). Nas membranas celulares os PUFAs, principalmente os ácidos graxos docosaheptaenoico (DHA, 22:6n-3) e o araquidônico (AA, 20:4n-6) são os mais suscetíveis a oxidação, apresentam maior números de ligações duplas entre os átomos de carbono e os ésteres ligados ao glicerol aos ácidos graxos e possuem um hidrogênio bis-álícos do grupo metileno ligados na cadeia adjacentes. Tanto o hidrogênio bis-álícos, quanto o maior o número de ligações

duplas nas cadeias laterais possuem menor ponto de fusão, sendo clivados com maior facilidade (Fotina et al., 2013, Rocha et al., 2010, Sharma et al., 2012).

O peróxil (OH) pode peroxidar diversos PUFAs é componente estrutural de um processo de clivagem em reação em cadeia. O processo de peroxidação lipídica envolve três fases distintas: inicial, propagação e final. Na fase inicial, ocorre o consumo dos substratos (O₂ e lipídios insaturados). A molécula livre de O₂ e o OH podem reagir com os grupos metílicos dos PUFAs, sintetizando dienos conjugados, peróxidos de lipídios e hidroperóxidos segundo (Smirnov & Sestak, 1996) citado por (Sharma et al., 2012):



Em que:

-H = Hidrogênio do grupos metílicos

X• = O₂ e OH

OO• = radical peróxido

O peróxido formado é considerado o primeiro produto peroxidação, é altamente reativo, característica que permite se ligar facilmente a outras moléculas bioquímicas e dar início a segunda fase que é a propagação da reação em cadeia:

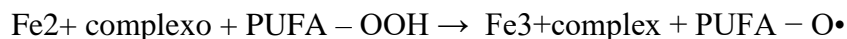


Em que:

OO• = radical peróxido

PUFA - OOH = hidroperóxidos lipídicos

Na terceira fase, os radicais livres atacam o hidrogênio do grupo metílico clivando sua ligação dupla, forçando uma mudança molecular que resulta na formação dos produtos secundários da peroxidação que são os hidroperóxidos lipídicos e que podem ser clivados por íons de metais como o Fe²⁺ na seguinte reação segundo (Smirnov & Sestak, 1996):

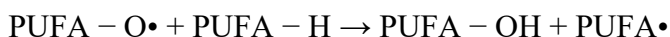


Em que:

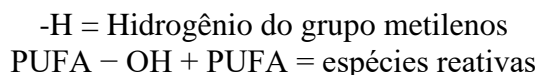
PUFA - O• = radical alcoxi lipídicos

PUFA - OOH = hidroperóxidos lipídicos

O radical alcoxi formado inicia a seguinte reação em cadeia:



Em que:



Nesta última reação em cadeia do processo de peroxidação lipídica, são formadas diversas espécies reativas ao oxigênio, como por exemplo, os radicais alcoxi lipídicos e os aldeídos (malonaldeído, acroleína e crotonaldeído), que causam danos nas membranas celulares (Davies, 2000)

Diante disso, a quantificação de malonaldeídos formados durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) pode representar o status antioxidante de um tecido. A quantidade de malonaldeídos é mensurada pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS em uma determinada amostra e produz um composto de cor avermelhada sendo comumente detectada normalmente em espectrofotômetro na faixa espectral de 532, 538 e 540 nm, expressando a absorvância equivalente de MDA (mg/kg ou μg) (Lee et al., 2012, Rocha et al., 2010, Silva et al., 1999).

Estas reações em cadeias de degradação lipídica são reguladas no organismo por moléculas antioxidantes que podem neutralizar os radicais livres recebendo ou doando elétrons para neutralizar as moléculas que tem número ímpares de elétrons (Lü et al., 2010)

As proteínas são suscetíveis a oxidação por serem as células mais abundantes no metabolismo e possuem estruturas moleculares complexas com diversos grupos funcionais oxidáveis (Höhn et al., 2013). O intestino é o local em que ocorre o controle do balanço entre substâncias antioxidantes e pro oxidantes (Surai & Fisinin, 2015). A formação de radicais livres e suas espécies reativas (ROS e RNS) aumentam quando ocorre um embalo entre a ação do sistema antioxidante e o sistema que formam os radicais livres as ROS e RNS (Zhang et al., 2014). Com maior estresse oxidativo ocorrerá a peroxidação das proteínas, formado diversos compostos peroxidativos (aldeídos, óxido nítrico, radical hidroxil, etc). Normalmente a oxidação modifica as proteínas de forma direta ou indireta. As ROS podem oxidar diretamente a cadeia polipeptídica e os resíduos de aminoácidos (lisina, arginina, prolina e histidina) que são precursores da síntese da proteína carbonil (Höhn et al., 2013, Reznick et al., 1992). A quantificação da proteína carbonil tem sido utilizada como indicador do status da oxidação proteica (Dalle-Donne et al., 2003).

Os produtos da oxidação também podem oxidar indiretamente as proteínas, causando efeitos deletérios nas funções bioquímicas das proteínas, na síntese de proteínas

e agregam proteínas com estruturas diferentes prejudicando suas funções (Nystrom, 2005).

O DNA é oxidado pelas ROS, principalmente pelo radical hidroxil (OH) nas ligações duplas e podem causar danos nucleares nas mitocôndrias e nos cloroplastos causando efeitos deletérios na síntese de bases pirimídicas, purinas, pirimidinas e os polipeptídios do DNA, levando ao mau funcionamento ou inativação da célula (Sharma et al., 2012). O maior produto da oxidação produzido é o óxido nítrico (NO). Podendo afetar diretamente na funcionalidade do metabolismo.

Em humanos, principalmente os danos causados no DNA estão relacionados com diversas doenças as neurológicas como o Alzheimer (Thanan et al., 2014)

1.3 Sistema antioxidante

O mecanismo de defesa “sistema antioxidante” de organismos vivos contra ataques das ROS e RNS foi desenvolvido durante a evolução das espécies, permitindo que sobrevivessem em ambientes com alta concentração de oxigênio. O sistema antioxidante inclui diversos nutrientes (vitaminas, minerais e carotenoides) que se associam às enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase) para intensificar os mecanismos de defesa contra os radicais livres e de seus produtos tóxicos (Fisinin, 2013, Surai & Fisinin, 2015, Surai, 1999, Surai et al., 2016). Os principais nutrientes e enzimas do sistema antioxidante são segundo Surai & Fisinin, 2015:

- Antioxidantes naturais solúveis em água, como a vitamina A, E, carotenoides, ubiquinonas, flavonoides.
- Antioxidantes naturais solúveis em gordura, como o ácido ascórbico, ácido úrico, taurina, etc.
- Enzimas antioxidantes, como a Glutaciona Peroxidase (GSH-Px), Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD).
- Sistema redox tiol que consiste nas reações do complexo enzimático da glutatona (glutatona, glutatona redutase, glutarredoxina, glutatona peroxidase) e o sistema do complexo enzimático da tioredoxina (tioredoxina, tioredoxina peroxidase, tioredoxina redutase).

As substâncias antioxidantes se situam nas organelas, ocupando o espaço intracelular e extracelular e o mecanismo de defesa contra ROS e RNS ocorre em três principais etapas (Fisinin, 2013, Surai, 1999):

1ª Etapa:

Na primeira etapa de defesa, a supressão da formação dos radicais livres ocorre pela eliminação e inativação de seus precursores e o processo de catalise de moléculas é parado principalmente pelas enzimas (Super Óxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase Redutase (GSH- Px) e Catalase (CA). Entretanto, a formação dos radicais livres não é completamente cessada nesta primeira etapa de defesa do sistema antioxidante e permanecem no metabolismo causando danos a proteínas e ao DNA (Surai et al., 2016), sendo necessário a ação do mecanismo de defesa da segunda etapa.

2ª Etapa:

Na segunda etapa de defesa, nutrientes antioxidantes clivam as cadeias laterais dos ácidos graxos poli-insaturados, mantendo o tamanho da cadeia o menor possível e removendo radicais livres, evitando a propagação da peroxidação lipídica. Os principais nutrientes são a vitamina E, coenzima Q, carotenoides, vitamina A, ácido ascórbico e ácido úrico. Componentes enzimáticos das enzimas glutathione e tioredoxina também exercem funções nesta segunda etapa do mecanismo de defesa (Surai & Fisinin, 2012)(Surai et al., 2016). O mecanismo de defesa da segunda etapa não é suficiente para evitar completamente os danos causados pelas ROS e RNS sobre as proteínas, lipídios e DNA. Então ocorre uma terceira etapa de defesa.

3ª Etapa:

Na terceira etapa de defesa, ocorre a remoção ou reparo das moléculas danificadas, processos que são realizados pelas enzimas lipolíticas (lipases), proteolíticas (Peptases ou proteases) e enzimas relacionadas às moléculas do DNA como as ligases, nucleases, polimerases fosfolipases e diversas transferases (Surai & Fisinin, 2012).

As três etapas de mecanismo de defesa ocorrem simultaneamente e os nutrientes antioxidantes cooperam com as enzimas do sistema antioxidante para que ocorra menor quantidade de danos causados pelos radicais livres, ROS e RNS nas moléculas oxidáveis do carboidrato, ácidos graxos poli-insaturados, proteína e do DNA.

1.3.1 Sistema oxidante e antioxidante na gema do ovo e embriões

Os ovos são formados por gema, albúmen e casca. Na gema, são depositados os lipídios, principalmente os PUFAs e as vitaminas e carotenoides lipossolúveis, tais como a vitamina E, D, cantaxantina, que são obtidos pela dieta ou pela síntese metabólica e transportados pelas lipoproteínas vitelogeninas modificadas (VLDLm). E, assim como em outros tecidos, as principais enzimas do sistema antioxidante (SOD, GSH-Px e CA)

estão presentes, localizadas no albúmen. As enzimas e os nutrientes antioxidantes combatem naturalmente os ataques dos radicais livres, ROS e RNS na gema do ovo, evitando a peroxidação de nutrientes (lipídios, proteínas e carboidratos), que serão aporte nutricional e energético para o desenvolvimento do embrião (Figura 2).

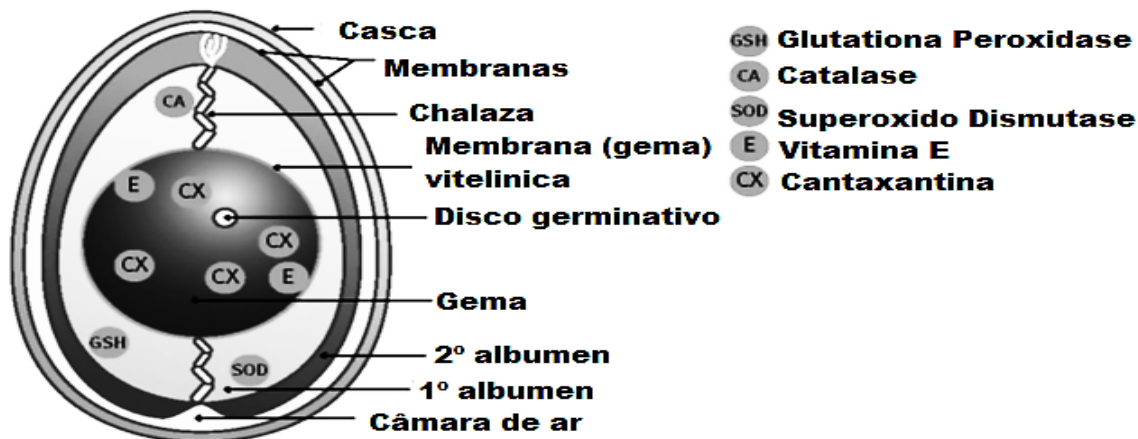


Figura 2- Estrutura do ovo, localização de nutrientes e de enzimas essenciais na atividade antioxidante no ovo. Adaptado de Surai, (2012).

O desenvolvimento embrionário de aves está associado com o acúmulo de PUFA, tornando os tecidos susceptíveis a ataques de radicais livres, ROS e RNS pós eclosão e nos primeiros dias de vida, períodos de alto estresse oxidativo (Speake et al., 1998, Speake et al., 1993). Para combater a peroxidação dos PUFAs os nutrientes antioxidantes com caráter lipossolúveis como a vitamina E, os carotenoides fornecidos nas dietas são absorvidos no intestino delgado e transferidos para a gema do ovo incubado e, posteriormente, para os tecidos do embrião pela membrana do saco vitelínico (Noble, 1987). Maior quantidade armazenada destes nutrientes em tecidos como o fígado e músculo de pintinhos na eclosão e durante a primeira semana de vida, está relacionada com a proteção destes tecidos contra a peroxidação das moléculas, diminuindo assim o estresse oxidativo (Surai et al., 2003; Surai et al., 1999; Surai et al., 1996).

Além dos nutrientes antioxidantes, as principais enzimas do sistema antioxidantes são sintetizadas durante o desenvolvimento embrionário (Surai et al., 2006) e estes dois elementos são responsáveis pelo combate a oxidação dos PUFAs, proteínas, carboidratos e DNA celular em tecidos do embrião.

1.4 Armazenamento de ovos

O processo de armazenamentos em temperaturas entre 15-20 °C e umidade 75 a 80 °C cessem o desenvolvimento embrionário para posteriormente serem incubados, este

processo é necessário para viabilizar a logística na indústria avícola (Fasenko, 2007). Entretanto, foi verificado que para não afetar a eclodibilidade, períodos ideais seriam de 1 a 5, são os mais indicados. Avaliando a incubação de ovos por 5 e 15 dias de reprodutores de frango de corte houve maior eclosão nos ovos que foram armazenados (Petek & Dikmen, 2006).

Períodos armazenamentos com mais de 7 dias, induz estresse ao embrião, aumentando a morte de células e atrasa o desenvolvimento fisiológico do embrião, aumentando a mortalidade embrionária, diminuindo conseqüentemente a eclodibilidade e o tempo de incubação necessário para eclosão dos pintinhos (Khan et al., 2014). Avaliando o período de 7 e 14 dias de armazenamento de ovos de codornas japonesas, foi verificado que a atividade microbiana e a maior perda de peso ocorreram no período de 14 dias. Períodos longos de armazenamento podem ser um fator que aumente o estresse oxidativo durante a incubação.

1.5 Carotenoides

Os Carotenoides são o maior grupo de pigmentantes naturais presentes na natureza. E novos carotenoides ainda são descobertos na natureza, pois em 1998, foram caracterizados aproximadamente 600 pigmentantes (Cunningham Jr & Gantt, 1998). Já em 2004 mais de 750 estruturas foram definidas como carotenoides (Mercadante et al., 2004, Takaichi, 2011). Da classe de moléculas isoprenoides (5 ou mais cadeias de carbonos) encontrados em todos os tipos de plantas (algas, milho, alfafa, etc) bactérias, ácaros, fungos e animais (Fraser & Bramley, 2004).

Em plantas, são componentes essenciais dos microrganismos fotossintéticos, pois são potentes removedores de moléculas oxidadas pelo processo fotooxidativo. (Fernandez-Garcia et al., 2016, Zhang et al., 2014). Seu mecanismo de defesa contra a oxidação é eficiente, principalmente pela sua estrutura linear de cadeias de carbono conjugadas com diversas ligações duplas, quanto mais longa a cadeia maior sua capacidade de capturar oxigênios livres ($-O_2$), porque essa configuração permite que os elétrons interajam facilmente com outros íons, excitam moléculas e podem remover produtos da oxidação (radical peroxil, superóxido anion peroxido de oxigênio, etc) (El-Agamey et al., 2004, Fernandez-Garcia et al., 2016).

Os carotenoides foram classificados de acordo com sua capacidade de remoção de (O_2): alta (licopeno, astaxantina e cantaxantina), intermediária (β -caroteno e bixina)

e baixa (luteínas e crucina) (Fontana et al., 2000). Além das ações isoladas no sistema antioxidante, os carotenoides também interagem sinergicamente com outros antioxidantes dietéticos como a vitamina E e C, causando maior status antioxidante em relação à inclusão individual de vitamina E (Niki et al., 1995).

A ação dos β -carotenoides como precursor da vitamina é bem estabelecida. Entretanto, nem todos os carotenoides são precursores da vitamina A (Surai et al., 2001). Existem dois subgrupos de carotenoides: os carotenos (licopeno, β -caroteno, α -caroteno) não possuem oxigênio nas suas estruturas e são carotenoides apolares. Já as xantofilas ou oxicarotenoides, tais como a luteína, P-criptoxantina, cantaxantina e astaxantina, são polares e contêm oxigênio no anel que facilita a absorção e deposição (Bartley & Scolnik, 1995).

A absorção de carotenoides das dietas é semelhante ao da vitamina D, que já foi supracitada acima. A concentração de carotenoides no plasma tem relação com a concentração no alimento ingerido (Koutsos et al., 2003). Nos pássaros, os carotenoides são depositados no fígado, na gema, no timo, na bolsa cloacal, na camada adiposa subcutânea e no tecido epitelial da perna e do pé (Karadas et al., 2005, Perez-Vendrell et al., 2001).

1.6 Cantaxantina na dieta de aves

A cantaxantina (β,β -Carotene-4,4'-dione) pertence ao grupo xantofil (Zhang et al., 2011). E pode ser encontrada na natureza, no cogumelo “*Cantharellus cinnebari*”, em peixes e crustáceos e flamingos (Fontana et al., 2000), em plantas, como por exemplo no milho, contendo aproximadamente de 0,95 a 1,85 μ /g de milho (Rivera & Canela, 2012, Rosa et al., 2016) e também pode ser sintetizada (Rosenberger et al., 1979).

A Cx da dieta é absorvida e transportada fixada na camada externa das micelas lipídicas, é uma substância polar com caráter lipofílico. O mecanismo de transporte da Cx na corrente sanguínea, até os órgãos e demais tecidos é semelhante ao de células lipídicas, sendo que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL) são responsáveis pelo transporte (Surai et al., 2001). O depósito da Cx na gema do ovo ocorre por meio de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), que depositam cerca de 80% da Cx ingerida da dieta no ovário, que é transferida para a gema do ovo (Johnson-Dahl et al., 2016) pele, músculos e penas (Mordi & Walton, 2016, Tunio et al., 2013).

Em relação a ação da cantaxantina (β -caroteno) com as vitaminas A, C e E, no metabolismo, a Cx não é precursora da vitamina A, diferentemente de outros carotenoides em aves (alfa e beta-carotenos e a criptoxantina). E, no sistema antioxidante, possui interação sinérgica com a vitamina A e E (α -tocoferol). A vitamina C e os carotenoides reduzem o peróxido α -tocoferoxil, modificando-o para o α -tocoferol e possivelmente amenizam os danos causados pelo peróxido α -tocoferoxil. Estes nutrientes atuam em compartimentos separados da membrana celular e no meio extracelular, a vitamina E atua na região superficial, enquanto os carotenoides atuam no interior da membrana celular e possuem relações com a integridade e permeabilidade das membranas (Xia et al., 2015). Já a vitamina C, atua no meio aquoso, aumentando a atividade antioxidante, de modo a inibir os danos causados pela oxidação molecular (Niki et al., 1995, Xia et al., 2015).

A propriedade antioxidante da cantaxantina têm sido associadas em diversas pesquisas ao desempenho reprodutivo (eclosão, ovos férteis e mortalidade), desenvolvimento embrionário e status antioxidantes e imune em pintinhos. Foi relatado que o aumento da concentração de Cx no tecido corporal do embrião, aumenta a capacidade de remoção de radicais livres, de peróxidos e intensifica a reciclagem das vitaminas C e E, minimizando o estresse oxidativo no metabolismo durante o processo de incubação e após eclosão, melhorando assim a viabilidade da progênie (Surai et al., 1996).

Com relação ao desempenho produtivo dos reprodutores e ao status antioxidante em diversos tecidos, foi descrito que em dietas com 6ppm de Cx para reprodutores de frango de corte da linhagem Cobb 500, da 46^a até 66^a semana de idades, houve aumento da eclodibilidade de ovos férteis e da fertilidade e redução da mortalidade embrionária, resultando em maior taxa de eclodibilidade total (Rosa et al., 2012). Em relação a mortalidade embrionária os autores relataram que a Cx foi mais eficiente nas primeiras 48 horas, 15 e 21 dias de incubação. E também redução da quantidade de malonaldeído (mg/kg) nas gemas de ovos, que foram armazenadas e posteriormente incubadas. Efeitos semelhantes foram relatados em reprodutores de patos da linhagem Cherry Valley suplementados com 6 ppm de Cx+ 2700 UI 25-(OH)D₃ da 38^a a 77^a semana de idade. A suplementação aumentou a eclodibilidade de ovos férteis e a eclodibilidade total e diminuiu a mortalidade e a quantidade de malonaldeído na gema do ovo e no soro dos reprodutores machos. Indicando que a Cx melhorou a atividade antioxidante do metabolismo dos machos e a viabilidade das matrizes (Ren et al. (2016). E, em relação a mortalidade de ovos incubados, foi observado menores índices de mortalidade (0 vs 4 %)

em dietas com 6 ppm, quando comparado com a dieta controle e também houve maior atividade antioxidante na gema do ovo, no soro sanguíneo dos reprodutores, na gema e nos tecidos de pintinhos com um dia de vida de reprodutores da linhagem Chinesa Tree-Yellow da 21^a até a 47^a semana de idade (Zhang et al., 2011).

Em relação a deposição de Cx no metabolismo de pintinhos ao eclodir e durante a primeira semana de vida, foi relatado que as concentrações de Cx no fígado de frangos oriundos de reprodutores suplementados com diferentes níveis (0, 6, 12 e 24) foram maiores no fígado de pintinhos ao eclodir e com sete dias pós-eclosão. Enquanto, as concentrações de malonaldeído foram menores nestes tecidos (Surai et al., 2003). Os autores sugeriram que a Cx diminuiu a suscetibilidade dos tecidos ricos em PUFAS a peroxidação. E, em reprodutores de frango de corte da linhagem ROSS, suplementados com 6 ppm de Cx da 27^a até a 38^a semana de idade, houve menor oxidação lipídica no fígado de pintinhos com 1 dia, indicando que a dieta maternal com 6 ppm de Cx aumentou a capacidade antioxidante e reduziu o estresse oxidativo (Robert et al., 2008)

Avaliando o sistema imune em reprodutores de frango da linhagem ROSS 308 da 31^a até a 59^a semana de vida, foi relatado que a suplementação de 6 ppm de Cx aumentou a capacidade antioxidante no plasma de pintinhos com um dia de vida e estimulou a resposta do sistema imune em função da indução com a *Escherichia coli*, sugerindo que a Cx possui característica imunomodulatória (Johnson-Dahl et al., 2016).

1.7 Vitamina D e seus metabólitos

A vitamina D é um conjunto de compostos de estrutura semelhantes a hormônios esteroides (Estradiol, cortisol e aldosterona), as principais moléculas são a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a vitamina D₃ (colecalfiferol) (Norman, 2008).

O metabólito biologicamente ativo 1,25 hidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)D₃) pode ser obtido na dieta, sendo absorvido no intestino delgado e também pelo processo de fotossíntese, que ocorre nos tecidos da pele com a presença de raios UV. Independentemente da origem, a vitamina D será transportada para o fígado, e será hidroxilada na posição do Carbono-25 da cadeia lateral, produzindo o metabólito hormonal 25 hidroxivitamina D₃ (25-(OH)D₃), que é o metabólito mais abundante no metabolismo.

A hidroxilação do 25-(OH)D₃ ocorre principalmente nos rins e é regulada pela enzima 1- α -hidroxilase e pode sintetizar os metabólitos 1,24-25-(OH)₂D₃ e 24-25-(OH)₂D₃ que irão ser catabolizados, sintetizando o metabólito 1,25-(OH)D₃ que é transportado pelas proteínas carreadoras de vitamina D (Vitamin D binding protein (DBP)) por vários tecidos e exerce diversas funções endócrinas que são reguladas pelo receptor (Vitamin D receptor (VDR)). A glândula paratireoide possui o VDR e quando ligado ao 1,25-(OH)D₃ interrompe a síntese do paratormônio (PTH) em altos níveis de cálcio no metabolismo, limitando a ação do 1,25-(OH)D₃ sobre a reabsorção óssea, prevenindo assim a hipercalcemia (Haussler et al., 2013, Shojadoost et al., 2015, Veldman et al., 2000)

As funções endócrina e intrácrina do 1,25-(OH)D₃ estão relacionadas com o metabolismo do cálcio e do fósforo, a reabsorção óssea e remodelação óssea (Atencio et al., 2005, Fritts & Waldroup, 2003, Saunders-Blades & Korver, 2015, Sunde et al., 1978), a eclodibilidade (Atencio et al., 2006), a formação da casca do ovo (Käppeli et al., 2011), a qualidade da casca do ovo (Ren et al., 2016), o metabolismo do músculo (Sato et al., 2005), o desenvolvimento embrionário (Narbaitz & Tsang, 1989), o sistema imune (Rodriguez-Lecompte et al., 2016, Saunders-Blades & Korver, 2015, Veldman et al., 2000) e com o sistema reprodutivo (Dabrowski et al., 2015) (Figura 3).

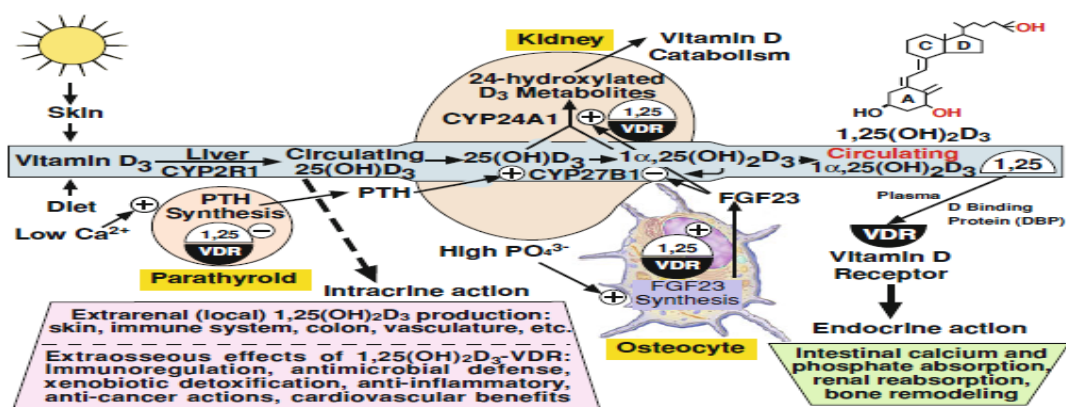


Figura 3- Síntese da vitamina D₃. Adaptado de (Haussler et al., 2013)

1.7.1 Suplementação de 25-(OH)D₃ em dietas de aves

A inclusão isolada do 25-(OH)D₃ em dietas ou em conjunto com a vitamina D₃, pode interferir no metabolismo do cálcio e do fósforo e também ser transferida para a gema do ovo, possuindo alta relação ($r=0,99$ e $r=0,94$, respectivamente) com a quantidade fornecida nas dietas maternas (Mattila et al., 1999). A absorção da vitamina D₃ ocorre no intestino delgado, e possivelmente, atue modificando a morfologia e o

desenvolvimento dos vilos intestinais (Shinki et al., 1991). A suplementação de 25-(OH)D₃ em dietas maternas (3000 UI na dieta experimental e 1000 UI na dieta controle) para matrizes de frango de corte da linhagem Ovambo, com 45 semanas de idade, aumentou o tamanho e a cripta dos vilos, principalmente no jejuno e duodeno (Ding et al., 2011). Os autores sugeriram que o 25-(OH)D₃ em dietas maternas podem estimular o desenvolvimento fisiológico, melhorando as funções do intestino durante a incubação e no primeiro dia de vida. O metabólito 25-(OH)D₃ ainda possui propriedades carcinogênica, anti-inflamatória e propriedade imunomodulatória (Wu et al., 2015).

Os receptores da vitamina D estão presentes em células linfáticas indicando relação com o sistema imune. O 25-(OH)D₃ afeta diretamente a o desenvolvimento e ativação das células T, B, a regulação das células e as células dentríticas que são antígenos do sistema imune (Takeda et al., 2010) e devido a atividade 1 α - 25-OH-D nos rins, vários estágios de doenças crônicas foram reduzidos em humanos (Gurlek et al., 2002).

O metabólito 25-(OH)D₃ possui é duas vezes mais absorvido do que a vitamina D₃ e tem meia vida mais longa (Sun et al., 2012), conseqüentemente a disponibilidade de fósforo e cálcio pode ser maior para a produção de ovos em aves de postura, melhorando a resistência e compactação da casca do ovo. Cascas com maior teor de cálcio, mais compactas e resistentes podem refletir no desempenho de incubação e no desenvolvimento embrionário, pois melhoram o mecanismo de proteção do embrião contra infecções, previne a perda de água e aumenta a quantidade de cálcio para o embrião utilizar durante o desenvolvimento ósseo (Bar et al., 1980). Dietas fornecidas da 23^a a 65^a semana de idade contendo 2700 UI 25-(OH)D₃ para reprodutores da linhagem ROSS 308, aumentou a eclodibilidade e a resposta imune *in vitro* (Saunders-Blades & Korver, 2015).

Avaliando reprodutores da linhagem Cobb 500, suplementadas com 2700 UI 25-(OH)D₃, foi observado aumento da eclodibilidade, da espessura de casca e da massa do ovo (Coto et al., 2010). Efeito sobre a eclodibilidade também foi observado em reprodutores de frango de corte que receberam 4000 IU/Kg de vitamina D e também do metabólito 25-(OH)D₃ (Atencio et al., 2006). Entretanto, níveis deficientes e o excesso de vitamina D na dieta de reprodutores reduziu a eclodibilidade e aumentou a mortalidade embrionária (Wilson, 1997). Os piores índices em altos níveis da vitamina D, possivelmente estão relacionados com a sua toxicidade no metabolismo, destacando que o metabólito 25-(OH)D₃ é de 5 a 10 vezes mais tóxico que a vitamina D₃ (Yarger et al., 1995).

O déficit e o excesso de vitamina D interferem na mortalidade embrionária, em dietas sem vitamina D houve maior mortalidade embrionária quando comparada a dietas com nível de adequado de vitamina D (Mottaghitlab et al., 2013, Soares et al., 1979). Já em pesquisas com dietas que receberam um dos metabólitos (1-25-OH-2D₃ ou 1- α -25-(OH)D₃), como única fonte de vitamina D, foi evidenciado maior mortalidade embrionária (Soares et al., 1979, Sunde et al., 1978). Somente dietas para reprodutores de frango de corte com o metabólito 25-(OH)D₃ apresentou os mesmos índices para mortalidade embrionária, quando comparada a dietas com vitamina D₃ (Abdulrahim et al., 1979). Estas pesquisas indicam que para melhores índices de mortalidade embrionária a associação entre vitamina D e o metabólito 25-(OH)D₃ em níveis ideais é essencial.

1.8.1 Aspectos reprodutivos

A fertilidade é um dos fatores mais importantes para os reprodutores, o número de ovos férteis que são eclodidos indica a viabilidade das matrizes, as infertilidades dos ovos causam prejuízos inestimáveis a produção avícola comercial. Processos metabólicos que ocorrem nas fêmeas e nos machos diminuem a fertilidade.

A fertilização do ovo é realizada pelos espermatozoides, nos machos a membrana espermática é protegida contra a oxidação lipídica pela atividade antioxidante do plasma seminal e após a ejaculação, esta proteção desaparece (Breque et al., 2006). No corpo das fêmeas, os espermatozoides são armazenados em túbulos específicos localizados principalmente nas glândulas da junção útero-vagina (Bakst, 1981). Breque et al. (2006) destacaram que as glândulas da junção útero-vagina proporcionam para os espermatozoides uma barreira protetiva, composta pelos principais antioxidantes e enzimas do sistema antioxidante (Vitamina E, C, carotenoides, SOD, GSH-Px e Ca) contra a oxidação lipídica, a qual, foi parcialmente modificada pela suplementação de vitamina E. Dependendo de fatores como a espécie, idade, composição dos espermatozoides e genética, os espermatozoides podem ser armazenados por longos períodos no trato reprodutivo das fêmeas, entretanto para maior viabilidade da fertilidade a exposição constante aos machos é necessária (Bakst et al., 1994). Em codornas, a duração média da fertilidade após a cópula é de 6,3 dias (Sittmann & Abplanalp, 1965). A fertilidade é reduzida em função da idade das matrizes (Santos et al., 2013) e da oxidação lipídica das membranas espermáticas (Breque et al., 2006). Outro importante componente é o plasma seminal, pois em conjunto com o sistema antioxidante protege

os espermatozoides do estresse oxidativo do ambiente do sistema reprodutivo da fêmea (Kobayashi et al., 1991).

1.8.2 Estresse oxidativo como causa da infertilidade

Os espermatozoides das aves são únicos em sua composição, com aproximadamente 50 % de PUFA's (Surai et al., 2006), que é necessária para manter as propriedades específicas da membrana. Entretanto, torna os espermatozoides altamente susceptíveis a peroxidação lipídica e os leucócitos quando oxidados também produzem peróxidos (EROS), que prejudicam a qualidade do sêmen (Henkel, 2011). A oxidação lipídica que é causada por moléculas livres de oxigênio ($-O_2$) derivada da respiração celular e clivagem do NAD e NADPH, a membrana dos espermatozoides é protegida pela vitamina E, que atua na superfície da membrana, pela vitamina C, que age no meio extracelular e por carotenoides que estão localizados no meio intracelular. Estes três elementos antioxidantes interagem sinergicamente com as enzimas do sistema antioxidante (SOD, GSP-Px e CA) melhorando a atividade do sistema antioxidante e a viabilidade, motilidade e o potencial de fertilização (Surai et al., 2006).

O plasma seminal de aves contém grande quantidade destes nutrientes antioxidantes e enzimas supracitadas providenciando proteção aos espermatozoides contra a oxidação lipídica. Dentre os fluidos corpóreos é o que contém maior concentração de antioxidantes (Henkel, 2011).

A oxidação inativa as funções de determinadas moléculas e prejudica a motilidade dos espermatozoides e a capacidade de os mesmos penetrarem o oócito, contribuindo para a infertilidade aumentando a infertilidade (Aitken & Fisher, 1994). A quantidade produzida de ROS na oxidação dos espermatozoides e tem correlação negativa com a qualidade do sêmen (Gomez et al., 1998). A peroxidação lipídica prejudica a estrutura celular, motilidade, qualidade do sêmen e também afeta a função do DNA, inativando as células que sintetizam os espermatozoides (Surai et al., 2006)

1.8.3 Efeito da idade sobre a fertilidade

A redução da fertilidade dos reprodutores pode ser afetada pela idade dos reprodutores. Avaliando o efeito da idade sobre a fertilidade, eclodibilidade e mortalidade, foi encontrado em reprodutores mais velhos a redução do número de espermatozoides, a fertilidade e o aumento da mortalidade embrionária (Santos et al., 2015). A membrana espermática é temporariamente protegida da peroxidação pela

atividade antioxidante do plasma seminal. Entretanto, após a cópula, este efeito é substituído pelo fluido secretado pelo oviduto e pelas glândulas de armazenamento, que dispõem de barreira contra a oxidação lipídica (vitamina C e E, GSH-Px e SOD) que protegem os espermatozoides durante o tempo em que estes permanecem no oviduto. Entretanto, em aves com idade avançada esta barreira não é tão eficiente quanto em galinhas jovens, explicando a queda de fertilidade em aves mais velhas. A idade dos reprodutores afeta diretamente a qualidade do sêmen, diminuindo o volume do sêmen ejaculado (Zhang et al., 1999), concentração espermática (Hocking & Bernard, 1997). Possivelmente isto ocorra pela maior produção de peróxidos em aves mais velhas. Weir & Robaire (2007) compararam a atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides e a produção de ROS na maturação de espermatozoides de ratos novos e velhos e observaram queda na capacidade antioxidante associada ao aumento na produção de ROS com o envelhecimento dos animais. Os autores concluíram que a queda na qualidade espermática de animais velhos está associada a maior susceptibilidade dos espermatozoides aos danos oxidativos.

A associação entre a $Cx+25-(OH)D_3$, no desempenho de incubação em índices como a eclodibilidade, fertilidade, mortalidade e infertilidade e na qualidade do pintinho. No status antioxidante da gema, do vitelo durante o processo de incubação e na eclosão e no tecido hepático e muscular do peito, no final da incubação e na primeira semana de vida de pintinhos oriundos de reprodutores suplementados com níveis crescentes de $Cx+25-(OH)D_3$ e do armazenamento antes da incubação. Então avaliar como se comportam esses processos fisiológicos em função de diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ é necessário para maximizar o uso desta associação em matrizes.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULRAHIM S., PATEL M. & MCGINNIS J. **Effects of vitamin d3 and d3 metabolites on production parameters and hatchability of eggs.** Poultry Science, 58:858-863, 1979
- AITKEN J. & FISHER H. **Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk.** BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 16:259-67, 1994

- ALVARENGA R., ZANGERONIMO M., PEREIRA L., RODRIGUES P. & GOMIDE E. **Lipoprotein metabolism in poultry.** World's Poultry Science Journal, 67:431-440, 2011
- ATENCIO A., EDWARDS H., PESTI G. & WARE G. **The vitamin d3 requirement of broiler breeders.** Poultry Science, 85:674-692, 2006
- ATENCIO A., PESTI G. & EDWARDS H. **Twenty-five hydroxycholecalciferol as a cholecalciferol substitute in broiler breeder hen diets and its effect on the performance and general health of the progeny.** Poultry Science, 84:1277-1285, 2005
- BAKST M. **Sperm recovery from oviducts of turkeys at known intervals after insemination and oviposition.** Journal of Reproduction and Fertility, 62:159-164, 1981
- BAKST M.R., WISHART G. & BRILLARD J.-P. **Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry.** Poultry Science, 5:117-143, 1994
- BAR A., SHARVIT M., NOFF D., EDELSTEIN S. & HURWITZ S. **Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds.** The Journal of Nutrition, 110:1930-4, 1980
- BARTLEY G.E. & SCOLNIK P.A. **Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health.** The Plant Cell, 7:1027-38, 1995
- BIGARELLA C.L., LIANG R. & GHAFARI S. **Stem cells and the impact of ros signaling.** Development, 141:4206-4218, 2014
- BREQUE C., SURAI P. & BRILLARD J.P. **Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin e supplementation.** Molecular Reproduction and Development, 73:1045-1051, 2006
- CHERIAN G. **Nutrition and metabolism in poultry: Role of lipids in early diet.** Journal of Animal Science and Biotechnology, 6:28, 2015

- CHO J., ZHANG Z. & KIM I. **Effects of canthaxanthin on egg production, egg quality, and egg yolk color in laying hens.** *Journal of Agricultural Science*, 5:269, 2013
- COTO C., CERATE S., WANG Z., YAN F., MIN Y., COSTA F. & WALDROUP P. **Effect of source and level of vitamin d on the performance of breeder hens and the carryover to the progeny.** *International Journal of Poultry Science*, 9:623-633, 2010
- CUNNINGHAM JR F. & GANTT E. **Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants.** *Annual Review of Plant Biology*, 49:557-583, 1998
- DABROWSKI F.A., GRZECHOCINSKA B. & WIELGOS M. **The role of vitamin d in reproductive health—a trojan horse or the golden fleece?** *Nutrients*, 7:4139-4153, 2015
- DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., MILZANI A. & COLOMBO R. **Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.** *Clinica Chimica Acta*, 329:23-38, 2003
- DAVIES K.J. **Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems.** *IUBMB Life*, 50:279-289, 2000
- DING B., PIRONE A., LENZI C., BAGLINI A. & ROMBOLI I. **Effect of hen diet supplemented with 25-oh-d.** *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20:420-431, 2011
- EDWARDS JR H., ELLIOT M. & SOONCHARERNYING S. Quantitative substitution of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and 1-hydroxycholecalciferol for cholecalciferol in broiler diets. In: Conference **Quantitative substitution of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and 1-hydroxycholecalciferol for cholecalciferol in broiler diets**, Year. p. 567-570
- EL-AGAMEY A., LOWE G.M., MCGARVEY D.J., MORTENSEN A., PHILLIP D.M., TRUSCOTT T.G. & YOUNG A.J. **Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430:37-48, 2004

- FANG Y.-Z., YANG S. & WU G. **Free radicals, antioxidants, and nutrition**. Nutrition, 18:872-879, 2002
- FASENKO G.M. **Egg storage and the embryo**¹. Poultry Science, 86:1020-1024, 2007
- FERNANDEZ-GARCIA E., CARVAJAL-LERIDA I. & PEREZ-GALVEZ A. **Carotenoids exclusively synthesized in red pepper (capsanthin and capsorubin) protect human dermal fibroblasts against uvb induced DNA damage**. Photochemical & photobiological sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 15:1204-11, 2016
- FISININ V. **Natural antioxidants in hens'embryogenesis and antistress defence in postnatal development (review)**. Сельскохозяйственная биология, 2013
- FONTANA J.D., MENDES S., PERSICKE D., PERACETTA L. & PASSOS M. **Carotenóides**. Biotecnologia Ciência Desenvolvimento, 13:40-5, 2000
- FOTINA A., FISININ V. & SURAI P. **Recent developments in usage of natural antioxidants to improve chicken meat production and quality**. Bulgarian Journal Agricultural Science, 19:889-896, 2013
- FRITTS C. & WALDROUP P. **Evaluation of bio-mos mannan oligosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diets for turkeys**. International Journal of Poultry Science, 2:19-22, 2003
- GILES G.I. & JACOB C. **Reactive sulfur species: An emerging concept in oxidative stress**. Biological Chemistry, 383:375-388, 2002
- GOMEZ E., IRVINE D. & AITKEN R. **Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxy-alkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function**. International Journal of Andrology, 21:81-94, 1998
- GRIFFIN H. & HERMIER D. **Plasma lipoprotein metabolism and fattening in poultry**. Leanness in Domestic Birds: Genetic, Metabolic and Hormonal Aspects:175-201, 1988

- GRUBER M., BOS E.S. & AB G. **Hormonal control of vitellogenin synthesis in avian liver.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 5:41-50, 1976
- GURLEK A., PITTELKOW M.R. & KUMAR R. **Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 α , 25-dihydroxyvitamin d₃: Implications in cell growth and differentiation.** *Endocrine Reviews*, 23:763-786, 2002
- HAUSSLER M.R., WHITFIELD G.K., KANEKO I., HAUSSLER C.A., HSIEH D., HSIEH J.-C. & JURUTKA P.W. **Molecular mechanisms of vitamin d action.** *Calcified Tissue International*, 92:77-98, 2013
- HENKEL R.R. **Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility.** *Asian Journal of Andrology*, 13:43, 2011
- HERMIER D. **Lipoprotein metabolism and fattening in poultry.** *The Journal of Nutrition*, 127:805s-808s, 1997
- HOCKING P. & BERNARD R. **Effects of dietary crude protein content and food intake on the production of semen in two lines of broiler breeder males.** *British Poultry Science*, 38:199-202, 1997
- HOGG N. & KALYANARAMAN B. **Nitric oxide and lipid peroxidation.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1411:378-384, 1999
- HÖHN A., KÖNIG J. & GRUNE T. **Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins.** *Journal of Proteomics*, 92:132-159, 2013
- JOHNSON-DAHL M.L., ZUIDHOF M.J. & KORVER D.R. **The effect of maternal canthaxanthin supplementation and hen age on breeder performance, early chick traits, and indices of innate immune function.** *Poultry Science*, 96:634-646, 2016
- KÄPPELI S., FRÖHLICH E., GEBHARDT-HENRICH S.G., PFULG A., SCHÄUBLIN H., ZWEIFEL R., WIEDMER H. & STOFFEL M.H. **Effects of dietary supplementation with synthetic vitamin d₃ and 25-hydroxycholecalciferol on**

- blood calcium and phosphate levels and performance in laying hens.** Archiv für Geflügelkunde, 75:179-184, 2011
- KARADAS F., ERDO AN S., KOR D., OTO G. & ULUMAN M. **The effects of different types of antioxidants (se, vitamin e and carotenoids) in broiler diets on the growth performance, skin pigmentation and liver and plasma antioxidant concentrations.** Revista Brasileira de Ciência Avícola, 18:101-116, 2016
- KARADAS F., PAPPAS A.C., SURAI P.F. & SPEAKE B.K. **Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 141:244-251, 2005
- KHAN M.J., KHAN S.H., BUKHSH A. & AMIN M. **The effect of storage time on egg quality and hatchability characteristics of rhode island red (rir) hens.** Veterinarski Arhiv, 84:291-303, 2014
- KOBAYASHI T., MIYAZAKI T., NATORI M. & NOZAWA S. **Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: Superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa.** Human Reproduction, 6:987-991, 1991
- KOUTSOS E.A., CLIFFORD A.J., CALVERT C.C. & KLASING K.C. **Maternal carotenoid status modifies the incorporation of dietary carotenoids into immune tissues of growing chickens (gallus gallus domesticus).** The Journal of Nutrition, 133:1132-8, 2003
- LEE R., MARGARITIS M., CHANNON K.M. & ANTONIADES C. **Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: Methodological aspects and considerations.** Current Medicinal Chemistry, 19:2504-2520, 2012
- LÜ J.M., LIN P.H., YAO Q. & CHEN C. **Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, 14:840-860, 2010

- MATTILA P., LEHIKONEN K., KIISKINEN T. & PIIRONEN V. **Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:4089-92, 1999
- MERCADANTE A., EGELAND E., BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S. & PFANDER H. **Carotenoids handbook.** Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds, 2004
- MØLLER A., BIARD C., BLOUNT J., HOUSTON D., NINNI P., SAINO N. & SURAI P. **Carotenoid-dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?** Avian and Poultry Biology Reviews, 11:137-159, 2000
- MORDI R.C. & WALTON J.C. **Identification of products from canthaxanthin oxidation.** Food Chemistry, 197:836-40, 2016
- MOTTAGHITALAB M., HORMOZDI M. & KAMYAB A. **Effect of cholecalciferol (d3) replacement with 1alpha-hydroxycholecalciferol on broiler breeder hen's performance.** Journal of Animal and Poultry Sciences, 2:39-47, 2013
- NARBAITZ R. & TSANG C.P. **Vitamin d deficiency in the chick embryo: Effects on prehatching motility and on the growth and differentiation of bones, muscles, and parathyroid glands.** Calcified Tissue International, 44:348-355, 1989
- NIKI E., NOGUCHI N., TSUCHIHASHI H. & GOTOH N. **Interaction among vitamin c, vitamin e, and beta-carotene.** The American Journal of Clinical Nutrition, 62:1322S-1326S, 1995
- NOBLE R.C. **Lipid metabolism in the chick embryo: Some recent ideas.** The Journal of experimental zoology. Supplement : published under auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry, 1:65-73, 1987
- NORMAN A.W. **From vitamin d to hormone d: Fundamentals of the vitamin d endocrine system essential for good health.** The American Journal of Clinical Nutrition, 88:491S-499S, 2008

- NYSTROM T. **Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence.** The EMBO Journal, 24:1311-7, 2005
- PEREZ-VENDRELL A.M., HERNANDEZ J.M., LLAURADO L., SCHIERLE J. & BRUFAU J. **Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance.** Poultry Science, 80:320-6, 2001
- PETEK M. & DIKMEN S. **The effects of prestorage incubation and length of storage of broiler-breeder eggs on hatchability and subsequent growth performance of progeny.** Czech Journal of Animal Science 2:51-73, 2006
- REN Z., JIANG S., ZENG Q., DING X., BAI S., WANG J., LUO Y., SU Z., XUAN Y., YAO B., CISNEROS F. & ZHANG K. **Effect of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the performance of duck breeders under two different vitamin regimens.** Journal of Animal Science and Biotechnology, 7:2, 2016
- REZNICK A.Z., CROSS C.E., HU M.L., SUZUKI Y.J., KHWAJA S., SAFADI A., MOTCHNIK P.A., PACKER L. & HALLIWELL B. **Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation.** The Biochemical Journal, 286 (Pt 2):607-11, 1992
- RITCHIE M. & PILNY A.A. **The anatomy and physiology of the avian endocrine system.** The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice, 11:1-14, 2008
- RIVERA S. & CANELA R. **Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize.** Molecules, 17:11255-68, 2012
- ROBERT F., PANHELEUX-LE BASTARD M., HAMELIN C. & BOULARD C. **Effect of canthaxanthin supplementation in the ross breeder diet on oxidative stress in chick.** In: Conference **Effect of canthaxanthin supplementation in the ross breeder diet on oxidative stress in chick**, Year. p. 731-734

- ROCHA J., LARA L., BAIÃO N., VASCONCELOS R., BARBOSA V., POMPEU M. & FERNANDES M. **Antioxidant properties of vitamins in nutrition of broiler breeders and laying hens.** *World's Poultry Science Journal*, 66:261-270, 2010
- ROCHA J.S.R. **Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário.** 2011
- RODRIGUEZ-LECOMPTE J.C., YITBAREK A., CUPERUS T., ECHEVERRY H. & VAN DIJK A. **The immunomodulatory effect of vitamin d in chickens is dose-dependent and influenced by calcium and phosphorus levels.** *Poultry Science*, 95:2547-2556, 2016
- ROSA A., BONILLA C., LONDERO A., GIACOMINI C., ORSO C., FERNANDES M., MOURA J. & HERMES R. **Effect of broiler breeders fed with corn or sorghum and canthaxanthin on lipid peroxidation, fatty acid profile of hatching eggs, and offspring performance.** *Poultry Science*:294, 2016
- ROSA A., SCHER A., SORBARA J., BOEMO L., FORGIARINI J. & LONDERO A. **Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders.** *Poultry Science*, 91:660-666, 2012
- ROSENBERGER M., MCDUGAL P., SAUCY G. & BAHR J. **New approaches to the synthesis of canthaxanthin.** *Pure and Applied Chemistry*, 51:871-886, 1979
- SANTOS T., MURAKAMI A., OLIVEIRA C. & GIRALDELLI N. **Sperm-egg interaction and fertility of japanese breeder quails from 10 to 61 weeks.** *Poultry Science*, 92:205-210, 2013
- SANTOS T., MURAKAMI A., OLIVEIRA C., MORAES G., STEFANELLO C., CARNEIRO T., FEITOSA C. & KANEKO I. **Influence of european quail breeders age on egg quality, incubation, fertility and progeny performance.** *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17:49-56, 2015

- SATO Y., IWAMOTO J., KANOKO T. & SATOH K. **Low-dose vitamin d prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: A randomized controlled trial.** *Cerebrovascular Diseases*, 20:187-92, 2005
- SAUNDERS-BLADES J. & KORVER D. **Effect of hen age and maternal vitamin d source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function.** *Poultry Science*, 94:1233-1246, 2015
- SCHNEIDER W.J. **Lipid transport to avian oocytes and to the developing embryo.** *Journal of Biomedical Research*, 30:174, 2016
- SHARMA P., JHA A.B., DUBEY R.S. & PESSARAKLI M. **Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions.** *Journal of Botany*, 2012, 2012
- SHINKI T., TANAKA H., TAKITO J., YAMAGUCHI A., NAKAMURA Y., YOSHIKI S. & SUDA T. **Putrescine is involved in the vitamin d action in chick intestine.** *Gastroenterology*, 100:113-122, 1991
- SHOJADOOST B., BEHBOUDI S., VILLANUEVA A., BRISBIN J., ASHKAR A. & SHARIF S. **Vitamin d3 modulates the function of chicken macrophages.** *Research in Veterinary Science*, 100:45-51, 2015
- SILVA F.A., BORGES M.F.M. & FERREIRA M.A. **Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante.** *Química Nova*, 22:94-103, 1999
- SINGAL P.K., KHAPER N., PALACE V. & KUMAR D. **The role of oxidative stress in the genesis of heart disease.** *Cardiovascular Research*, 40:426-432, 1998
- SITTMANN K. & ABPLANALP H. **Duration and recovery of fertility in japanese quail (*coturnix coturnix japonica*).** *British Poultry Science*, 6:245-250, 1965
- SMIRNOFF N. & SESTAK Z. **Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation.** *Photosynthetica*, 32:104-104, 1996

- SOARES J., SWERDEL M. & OTTINGER M. **The effectiveness of the vitamin d analog 1 α -oh-d3 in promoting fertility and hatchability in the laying hen.** Poultry Science, 58:1004-1006, 1979
- SPADA F.P., SELANI M.M., COELHO A.A.D., SAVINO V.J.M., RODELLA A.A., SOUZA M.C., FISCHER F.S., LEMES D.E.A. & CANNIATTI-BRAZACA S.G. **Influence of natural and synthetic carotenoids on the color of egg yolk.** Scientia Agricola, 73:234-242, 2016
- SPEAKE B.K., MURRAY A.M. & NOBLE R.C. **Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo.** Progress in Lipid Research, 37:1-32, 1998
- SPEAKE B.K., NOBLE R.C. & MCCARTNEY R.J. **Tissue-specific changes in lipid composition and lipoprotein lipase activity during the development of the chick embryo.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1165:263-270, 1993
- SUN Q., GUO Y., MA S., YUAN J., AN S. & LI J. **Dietary mineral sources altered lipid and antioxidant profiles in broiler breeders and posthatch growth of their offsprings.** Biological Trace Element Research, 145:318-324, 2012
- SUNDE M., TURK C. & DELUCA H. **The essentiality of vitamin d metabolites for embryonic chick development.** Science, 200:1067-1069, 1978
- SURAI A., SURAI P., STEINBERG W., WAKEMAN W., SPEAKE B. & SPARKS N. **Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick.** British Poultry Science, 44:612-619, 2003
- SURAI P. **Antioxidant systems in poultry biology: Superoxide dismutase.** Journal of Animal Research and Nutrition, 2016
- SURAI P. & FISININ V. **Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: Applications in chick placement and pig weaning.** Journal of Veterinary Science and Medicine, 3:16, 2015

- SURAI P., NOBLE R. & SPEAKE B. **Relationship between vitamin e content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick.** British Poultry Science, 40:406-410, 1999
- SURAI P., SPARKS N. & SPEAKE B. The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. In: Conference **The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry**, Year. p. 416-417
- SURAI P., SPEAKE B. & SPARKS N. **Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk.** The Journal of Poultry Science, 38:1-27, 2001a
- SURAI P.F. **The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 1.** World's Poultry Science Journal, 68:465-476, 2012
- SURAI P.F. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, UK., 2002.
- SURAI P.F. **Vitamin e in avian reproduction.** Poultry and avian biology reviews, 10:1-60, 1999
- SURAI P.F., BLESBOIS E., GRASSEAU I., CHALAH T., BRILLARD J.P., WISHART G.J., CEROLINI S. & SPARKS N.H. **Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen.** Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 120:527-33, 1998
- SURAI P.F., FISININ V.I. & KARADAS F. **Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin e, carotenoids and selenium.** Animal Nutrition, 2:1-11, 2016
- SURAI P.F., NOBLE R.C. & SPEAKE B.K. **Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1304:1-10, 1996

- SURAI P.F., SPEAKE B.K., BORTOLOTTI G.R. & NEGRO J.J. **Captivity diets alter egg yolk lipids of a bird of prey (the american kestrel) and of a galliforme (the red-legged partridge)**. *Physiological and Biochemical Zoology* : PBZ, 74:153-60, 2001b
- TAKAICHI S. **Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions**. *Marine Drugs*, 9:1101-1118, 2011
- TAKEDA M., YAMASHITA T., SASAKI N., NAKAJIMA K., KITA T., SHINOHARA M., ISHIDA T. & HIRATA K. **Oral administration of an active form of vitamin d3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory t cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30:2495-503, 2010
- TARUGI P., ALBERTAZZI L., NICOLINI S. & CALANDRA S. **Absence of apolipoprotein b-48 in the chick, gallus domesticus**. *Journal of Lipid Research*, 31:417-27, 1990
- THANAN R., OIKAWA S., HIRAKU Y., OHNISHI S., MA N., PINLAOR S., YONGVANIT P., KAWANISHI S. & MURATA M. **Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer**. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:193-217, 2014
- TUNIO M.T., YANG S., CHEN Z., ZUBAIR M., QIU J., ZHAO Y., CHEN G., CHOW Y. & CHEN A. **Effect of pigments with different origins on pigmentation and performance of broilers**. *Pakistan Journal of Zoology*, 45, 2013
- VAJRAGUPTA O., BOONCHOONG P. & BERLINER L.J. **Manganese complexes of curcumin analogues: Evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide dismutase activity and stability towards hydrolysis**. *Free radical Research*, 38:303-314, 2004
- VELDMAN C.M., CANTORNA M.T. & DELUCA H.F. **Expression of 1,25-dihydroxyvitamin d3 receptor in the immune system**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374:334-338, 2000

- VEZINA F., SALVANTE K.G. & WILLIAMS T.D. **The metabolic cost of avian egg formation: Possible impact of yolk precursor production?** *The Journal of Experimental Biology*, 206:4443-51, 2003
- WEIR C.P. & ROBAIRE B. **Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown norway rat.** *Journal of andrology*, 28:229-40, 2007
- WILSON H. **Effects of maternal nutrition on hatchability.** *Poultry Science*, 76:134-143, 1997
- WU X., ZHOU T., CAO N., NI J. & WANG X. **Role of vitamin d metabolism and activity on carcinogenesis.** *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 22:129-137, 2015
- XIA S., TAN C., ZHANG Y., ABBAS S., FENG B., ZHANG X. & QIN F. **Modulating effect of lipid bilayer-carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128:172-180, 2015
- YARGER J., QUARLES C., HOLLIS B. & GRAY R. **Safety of 25-hydroxycholecalciferol as a source of cholecalciferol in poultry rations.** *Poultry Science*, 74:1437-1446, 1995
- ZHANG J., HOU X., AHMAD H., ZHANG H., ZHANG L. & WANG T. **Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in aaph-challenged chicken erythrocytes.** *Food Chemistry*, 145:57-65, 2014
- ZHANG W., ZHANG K.Y., DING X.M., BAI S.P., HERNANDEZ J.M., YAO B. & ZHU Q. **Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance.** *Poultry Science*, 90:1516-22, 2011
- ZHANG X., BERRY W., MCDANIEL G., ROLAND D., LIU P., CALVERT C. & WILHITE R. **Body weight and semen production of broiler breeder males as influenced by crude protein levels and feeding regimens during rearing.** *Poultry Science*, 78:190-196, 1999

III. Objetivo Geral

Estudar os efeitos da suplementação de diferentes níveis da associação da Cx+25-(OH)D3 em reprodutores de codornas europeias sobre o desempenho produtivo, a qualidade do ovo, o sistema reprodutivo e o status antioxidante na gema do ovo, no conteúdo vitelínico, fígado e músculo.

III.I Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da suplementação da Cx+25-(OH)D3 sobre:

Experimento I:

- Desempenho produtivo,
- Coloração da gema as variáveis bioquímicas,
- Variáveis bioquímicas,
- Tecidos ósseos,
- Status antioxidante no fígado e no soro sanguíneo durante o ciclo produtivo.

Experimento II:

- O desempenho reprodutivo e a qualidade do pintinho e o desenvolvimento embrionário da progênie de reprodutores de codornas europeias em diferentes idades.
- A fertilidade,
- A idade das matrizes.

Experimento III:

- O status antioxidante na gema do ovo,
- O status antioxidante no conteúdo vitelínico durante o período de incubação até a eclosão que foi de 17,5 dias,
- O status antioxidante no fígado e no músculo no final da incubação e na primeira semana de vida.

IV. Efeito da cantaxantina associada ao 25-Hidroxicolecalciferol sobre o desempenho produtivo, tecidos ósseos e status antioxidante em reprodutores de codorna europeia.

Resumo

O objetivo foi avaliar os efeitos da cantaxantina (Cx) associada ao metabólito 25 – hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃), sobre variáveis produtivas, qualidade interna e externa do ovo, matéria mineral da casca, fêmur e tibiotarso, bioquímica sérica e análises antioxidantes no soro sanguíneo e fígado. Foram utilizadas 240 matrizes de codornas distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco dietas e oito repetições, com quatro fêmeas e dois machos. As dietas experimentais foram: (0) dieta basal (vitamina D₃ 2000 UI); (3) dieta basal + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) dieta basal + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃). As variáveis de desempenho produtivo, qualidade interna e externa não foram influenciadas pelos níveis de Cx+25-(OH)D₃. A cor da gema foi influenciada pela dieta de Cx+25-(OH)D₃. Na análise de matéria mineral da casca dos ovos, a % matéria seca diminuiu linearmente conforme os níveis de Cx+25-(OH)D₃ aumentaram na dieta. Já a % Cinzas na matéria seca respondeu de modo quadrático (P=0,04), assim como a % Ca (P=0,02) em função dos níveis de Cx+25-(OH)D₃. Nas análises antioxidantes (DPPH e TBARS), houve influência dos níveis de Cx+25-(OH)D₃, com comportamento linear no soro dos machos (P<0,001) e quadrático crescente (P<0,001) sobre o DPPH no soro das fêmeas e decrescente para TBARS no fígado das fêmeas e dos machos. As análises de bioquímicas sérica dos machos e das fêmeas foram influenciadas (P<0,05) pelos níveis de Cx+25-(OH)D₃. Nas fêmeas, as proteínas totais diminuíram linearmente, (P=0,046) e a albumina, fósforo, cálcio, cálcio iônico e fosfatase decresceram de forma quadrática (P<0,05). Nas análises ósseas a matéria mineral das fêmeas, houve comportamento quadrático decrescente (P<0,05) da matéria seca, cinzas e cálcio no fêmur e no tibiotarso da matéria seca e cálcio. Já nos machos, as variáveis analisadas no fêmur não foram influenciadas (P>0,05) e no tibiotarso as cinzas diminuíram linearmente enquanto o cálcio apresentou comportamento quadrático crescente (P<0,001). Concluindo que a Cx+25-(OH)D₃ beneficia principalmente o metabolismo do cálcio e fósforo e sistema antioxidante quando suplementados para matrizes de codornas europeias com 26 a 42 semanas de idade.

Palavras-chave: Carotenoides, Vitamina D, DPPH, TBARS, tibia,, gema do ovo.

IV. Effect of canthaxanthin associated with 25-Hydroxycholecalciferol on the productive performance and antioxidant status of European quail reproductive.

Abstract

The objective was to evaluate the effects of canthaxanthin (Cx) associated with the metabolite 25 - hydroxycholecalciferol (25-(OH)D₃) on productive variables, internal and external egg quality, eggshell, femur and tibiotarsus mineral matter, serum biochemistry and antioxidants of serum and liver. Twenty-four quail matrices distributed in a completely randomized experimental design with five diets and eight replicates, four females and two males were used. The experimental diets were: (0) basal diet (vitamin D₃ 2000 IU); (3) basal diet + (3 ppm Cx + 1380 IU 25-(OH)D₃); (6) basal diet + (6 ppm Cx + 2.760 IU 25-(OH)D₃); (9) basal diet + (9 ppm Cx + 4,140 IU 25-(OH)D₃); (12) basal diet + (12 ppm Cx + 5,520 IU 25-(OH)D₃). The variables of productive performance, internal and external quality were not influenced by Cx+25-(OH)D₃ levels. In the mineral matter analysis of the eggshell, the dry matter content decreased linearly as the levels of Cx+25-(OH)D₃ increased in the diet. The ash% in the dry matter (P = 0.04), as well as the % Ca (P = 0.02) responded in a quadratic way in function of Cx+25-(OH)D₃ levels. In the antioxidant analyzes (DPPH and TBARS), there were effect of the Cx+25-(OH)D₃ levels, with linear behavior in the males serum (P <0.001) and increasing quadratic (P <0.001) on DPPH in females and decreasing for TBARS in females and males. The serum biochemical analyzes of males and females were influenced (P <0.05) by levels of Cx+25-(OH)D₃. In females, total proteins decreased linearly (P = 0.046) and albumin, phosphorus, calcium, ionic calcium and phosphatase decreased in a quadratic way (P <0.05). In the bone analysis, bone breakage was not influenced (P > 0.05) in females. However in males, the hardness of bone deformation in the tibiotarsus was influenced in an increasing quadratic way (P = 0.04). On the mineral matter of the females, there was a quadratic behavior (P <0.05) of the dry matter, ashes and calcium in the femur and in the tibiotarsus the same behavior occurred of the dry matter and calcium. In males, the variables analyzed in the femur were not influenced (P > 0.05). However, in the tibiotarsus the ashes decreased linearly while the calcium showed increasing quadratic behavior (P <0.001). We conclude that Cx+25-(OH)D₃ benefits several metabolisms, especially calcium and phosphorus and antioxidant system when supplemented for matings of European quails with 26 to 42 weeks of age,

Key words: Carotenoids, Vitamin D₃, DPPH, TBARS, Tibia, Yolk egg.

1. Introdução

A suplementação de cantaxantina (Cx) associada a metabólitos da vitamina D (25 hidrocolecalfiferol ou calcitriol ou 25-(OH)D₃) tem sido usada na dieta de reprodutores na avicultura comercial, com efeitos benéficos sobre a qualidade da casca (Bar et al., 1980) e na viabilidade dos reprodutores e da progênie (Pappas et al., 2005; Surai et al., 2001b).

A Cx é um carotenoide lipossolúvel da família das xantofilas, assim como a luteína, a zeaxantina e a β-criptoxantina e estão presentes em diversas plantas como o milho, alfafa, espinafre, entre outras (Moros et al., 2002). No milho, as xantofilas, são encontradas principalmente no endosperma e podem estar presentes na quantidade de 11 a 30 mg/kg (Moros et al., 2002). O milho contém diversos carotenoides, principalmente da família xantofil, avaliando a concentração de Cx no milho, foi determinada a concentração de 0,98 ppm (Rivera e Canela, 2012).

A Cx dietética é absorvida no intestino delgado e depositada em tecidos lipídicos e membranas biológicas. Em aves, isto ocorre na gema do ovo (Spada et al., 2016a), no fígado (Surai et al., 2003), nas penas (Ren et al., 2016a), pernas, carne e na gordura abdominal (Tunio et al., 2013). A concentração de carotenoides na gema do ovo aumentou de 1,98 mg/kg para 27,8 mg/kg de gema do ovo em reprodutores suplementados com Cx (Rosa et al., 2016).

A gema do ovo, os espermatozoides e os tecidos embrionários são ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) que são susceptíveis a oxidação e constituem as membranas biológicas. A Cx possui propriedades antioxidantes *in vivo* e *in vitro* (Surai, 2002), que estão associadas a sua capacidade de remover radicais livres no metabolismo em geral, espécies reativas a oxigênio (ROS), ao nitrogênio (RNS) e de produtos tóxicos ao metabolismo (Rocha et al., 2010a; Surai et al., 2001a; Surai, 2012). Desta forma a maior concentração de Cx nesses tecidos pode melhorar o sistema antioxidante e assim aumentar a proteção dos PUFA em membranas biológicas (Surai et al., 2003).

A vitamina D está relacionada com o ciclo do cálcio e do fósforo, atuando principalmente na absorção e reciclagem do cálcio no intestino (Berridge et al., 2003). O metabólito 25-(OH)D₃ é de duas a quatro vezes mais disponível e é absorvido cerca de 20 % a mais do que a vitamina D₃ (Edwards Jr et al., 1992). Consequentemente, o nível circulante de cálcio para a produção de ovos pode ser maior (Sun et al., 2013). Desta

forma a suplementação com 25-(OH)D₃ interfere na taxa de postura, na qualidade da casca, no número de ovos quebrados e, de forma indireta, na fertilidade. Para a progênie, maiores níveis de 25-(OH)D₃ na gema pode influenciar a formação do esqueleto ósseo do embrião e nas primeiras semanas de vida (Saunders-Blade e Kover et al., 2015).

Diversos estudos tem sido realizados em matrizes de aves comerciais avaliando os efeitos isolados da Cx ou associados ao metabólito 25-(OH)D₃. Nas matrizes de frango de corte, a suplementação com Cx tem demonstrado efeitos positivos sobre a resposta do sistema imune, proliferação de células, formação de criptas do intestino e no desempenho reprodutivo de matrizes, melhorando a eclodibilidade fertilidade e mortalidade embrionária (Esatbeyoglu e Rimbach, 2016; Rosa et al., 2012). Para o metabólito 25-(OH)D₃ os efeitos positivos descritos ocorrem na produção de ovos, na eclodibilidade, no sistema imune, na qualidade da casca do ovo, no número de ovos quebrados e no nível de cálcio disponível para o embrião durante a incubação e na primeira semana de vida (Bar et al., 1980). E, para a associação entre a Cx e o metabólito 25-(OH)D₃ os efeitos benéficos foram relatados na coloração da gema, na atividade do sistema antioxidante, no peso corporal e no metabolismo de cálcio da progênie (Ren et al., 2016 b,c)

Neste contexto, o objetivo foi avaliar os efeitos da associação entre a Cx+25-(OH)D₃ sobre variáveis de desempenho produtivo, qualidade interna e externa do ovo, matéria mineral da casca, variáveis bioquímicas, status antioxidante e morfologia óssea em reprodutores de codornas europeias.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Coturnicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (CCA/UEM), localizada no Estado do Paraná (23°21'S, 52°04'W, a altitude de 564 m). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA/UEM), tendo sido aprovados para execução (7846161115).

2.1 Animais, instalação e manejo

O galpão de postura utilizado foi do tipo convencional, com cobertura de telha de barro, piso e paredes laterais de alvenaria com 1,20 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado e cortinas laterais móveis. Com duas semanas de antecedência ao

início do experimento, os reprodutores foram alojados em gaiolas de arame galvanizado (25x39 cm) com nipple na parte superior e comedouro tipo calha em frente às gaiolas, para a determinação do peso corporal dos reprodutores e a produção de ovos gaiolas.

Cada gaiola continha quatro fêmeas e dois machos, que foram uniformizados de acordo com o peso corporal ($292,01 \pm 17,82$ e $251,84 \pm 19,07$) e a produção de ovos. O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum* e o programa de luz adotado foi de 17 horas de luz (natural + artificial) + 7 horas de escuro. Os machos e as fêmeas receberam a mesma ração por compartilharem a mesma gaiola. As médias de temperatura, máxima ($30,41 \pm 5,41^\circ\text{C}$) e mínima ($18,48 \pm 3,75^\circ\text{C}$) assim como de umidade, máxima ($45,36 \pm 14,55^\circ\text{C}$) e mínima ($21,93 \pm 12,14^\circ\text{C}$), foram medidas por meio de termo higrômetro digital, diariamente, dentro do galpão.

2.2 Delineamento experimental e dietas

Foram utilizados 240 reprodutores de codornas de corte com 26 semanas de idade, que foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco dietas e oito repetições, sendo a gaiola composta por quatro fêmeas e dois machos, representando a unidade experimental. As dietas experimentais foram: (0) dieta basal (vitamina D₃ 2000 UI); (3) dieta basal + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) dieta basal + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃). O fornecimento das rações experimentais iniciou 14 dias antes do início do experimento para a adaptação dos animais. As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, vitaminas, minerais e seguindo recomendações propostas por Rostagno et al. (2005) (Tabela 1).

Para manter as dietas isoenergéticas e isoproteicas, foi incluído na dieta basal o inerte, sendo substituído conforme a adição da Cx+25-(OH)D₃ nas dietas experimentais. Os níveis de suplementação de vitamina D₃ foram atendidos com o uso do premix vitamínico e o acréscimo do metabólito 25-(OH)D₃ ocorreu em associação com a Cx, por meio do fornecimento de um produto comercial.

Tabela 1. Composição centesimal, química e energética das rações experimentais contendo Cx+25-(OH)D₃ para reprodutores de codornas europeias, na fase de postura.

Ingredientes %	Dietas experimentais				
	0	3	6	9	12
Milho	51,76	51,76	51,76	51,76	51,76
Farelo de Soja	37,03	37,03	37,03	37,03	37,03
Calcário	5,85	5,85	5,85	5,85	5,85
Óleo de soja	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88
Fosfato Bi cálcico	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29
Premix vit+min ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Sal comum	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
DL- Metionina (98,5 %)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
L-Lisina (76,5%)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Inerte ²	0,20	0,15	0,10	0,05	0,0
MaxiChick [®]	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Composição Calculada					
Proteína bruta %	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,850	2,850	2,850	2,850	2,850
Cálcio (%)	2,700	2,700	2,700	2,700	2,700
Cloro (%)	0,248	0,248	0,248	0,248	0,248
Fósforo Disp (%)	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Potássio (%)	0,828	0,828	0,828	0,828	0,828
Sódio	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Lys dig %	1,097	1,097	1,097	1,097	1,097
Met dig %	0,480	0,480	0,480	0,480	0,480
Met + Cys dig %	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767
Cantaxantina (mg/kg)	0,000	3,000	6,000	9,000	12,000
Vitamina D ₃ (UI/Kg)	500	1.380	2.760	4.140	5.520

¹Suplemento vitamínico e mineral – Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A – 2.500.000 UI; Vit. D₃ – 500.000 UI; Vit. E – 5.000 UI; Vit. B1 – 625 mg; Vit. B2 – 1.500 mg/Kg; Vit. B6 – 1.250 mg/kg; Vit. B12 – 5.000 UI; Vit. K3 – 750 mg; Pantotenato de Cálcio – 3.000 mg; Niacina – 6.000 mg/Kg; Ácido fólico – 250 mg/Kg; Biotina – 50,0 mg/Kg; Colina – 75 g/Kg; Antioxidante (Butil Hidroxi Tolueno – BHT) – 1.000 mg/Kg; Zinco – 13 g/ Kg; Ferro – 13 g/Kg; Manganês – 15 g/Kg; Cobre – 3.000 mg/Kg; Cobalto – 50 mg/Kg; Iodo – 250 mg/Kg; Selênio – 63 mg/Kg; Veículo Q.S.P. (Caulim) – 1.000 g/Kg. ²Inerte–Caulim; MaxiChick[®]: cantaxantina (6 mg/Kg) + 25-hidroxicolecalciferol (2.760 UI/Kg) - DSM, São Paulo – SP.

2.3 Desempenho Produtivo

O desempenho produtivo foi avaliado em reprodutores de codornas de corte com 26 a 42 semanas de idades. Foram utilizados cinco ciclos de produção com 21 dias em cada ciclo. As rações, as sobras e os ovos foram coletados semanalmente e as aves mortas foram contabilizadas diariamente para correção do consumo de ração e das variáveis de produção de ovos. A coleta de ovos foi realizada diariamente às 8h, para determinar as seguintes variáveis: consumo de ração diário (g/dia), conversão alimentar referente ao consumido de ração e em relação à produção de massa de ovos – CA(kg/kg), que é obtida

por meio da relação entre o consumo de ração diária e a massa de ovos, sendo calculada pela equação: CAMO (g de ovos^{-1}) = consumo de ração diário (g) / massa de ovos (g ovos ave dia⁻¹), conversão alimentar relacionada ao consumo alimentar e a produção de dúzia de ovos – CA (kg/dz), que foi calculada pela equação: consumo de ração total/dúzia de ovos produzidos e a taxa de postura foi estimada pela divisão do número de ovos produzidos pelo total de aves da unidade experimental, dada por: Taxa de postura (%) = (número de ovos produzidos / número de aves alojadas) x 100. A massa de ovos foi determinada multiplicando a produção de ovos pelo peso médio dos ovos, de acordo com a equação: Massa de ovos ($\text{g ovos ave dia}^{-1}$) = (peso médio dos ovos (g) x número de ovos produzidos) / número de aves alojadas.

2.3.1 Qualidade interna e externa dos ovos

Nos três últimos dias de cada ciclo, foram realizadas análises de qualidade interna e externa dos ovos, coloração de gema e peso médio dos ovos. Para isto, apenas ovos íntegros foram utilizados. As variáveis analisadas foram: peso médio dos ovos (g), gravidade específica (g/ml), Índice de Gema (%) (IG), Unidade Haugh (%) (UH), % casca, % gema, % albúmen, peso de casca por superfície de área (g), espessura da casca (mm) e coloração da gema. Além destas variáveis, foram analisadas a matéria seca, por meio da % de matéria seca, % cinzas e % cálcio na casca (estrutura externa) dos ovos utilizados para as análises das variáveis de qualidade interna e externa nos dois últimos ciclos de postura.

A gravidade específica foi obtida imergindo todos os ovos em diferentes concentrações de solução salina, utilizando soluções com densidade ajustada por meio de densímetro de Baumé, variando $0,005 \text{ g mL}^{-1}$ desde 1,058 a $1,086 \text{ g mL}^{-1}$; de acordo com a metodologia descrita por Hamilton (1982).

Os ovos foram identificados, pesados individualmente e seccionados na porção equatorial, utilizando tesoura cirúrgica. O conteúdo interno foi despejado sobre um vidro para a determinação da altura (mm) e do diâmetro (mm) da gema e do albúmen por meio do paquímetro digital (Digimess, com precisão de 0,02 mm). A determinação da altura da gema ocorreu no ponto mais alto e no albúmen, à medida foi realizada na região mais próxima à gema. O diâmetro foi representado pela média de duas mensurações transversais, tanto da gema quanto do albúmen. Por meio destes dados, foram determinadas as variáveis IG, dada por: $IG = (\text{altura de gema (mm)} / \text{diâmetro de gema$

(mm)) x 100; e a UH, calculada de acordo com Card e Nesheim (1966), considerando a altura do albúmen (A) e o peso do ovo (PO): $UH = 100 \log (A + 7,57 - 1,7 \times PO^{0,37})$.

Nas gemas, foram determinadas a luminosidade (L^*) com valores variando de branco (0) a preto (100), e as intensidades de cores a^* , com faixa de cor entre vermelho (+) e verde (-); e b^* , que varia de amarelo (+) a azul (-). Em seguida, as gemas foram pesadas individualmente em balança de precisão, e o peso do albúmen foi obtido subtraindo-se do peso do ovo, da gema e da casca. Os dados de peso permitiram quantificar as porcentagens de gema, albúmen e casca em relação ao peso do ovo, de acordo com a equação: % do componente = (peso do componente (g) / peso do ovo (g)) x 100.

Após a secção do ovo, as cascas foram lavadas, secas e armazenadas em temperatura ambiente para pesagem e mensuração da espessura (mm). As medidas de espessura foram realizadas em quatro pontos distintos na região equatorial, empregando medidor de espessura (Mitutoyo®, modelo 700-118 “Quick Mini”).

2.4 Coleta e armazenamento de amostras

As amostras sanguíneas foram coletadas com e sem anticoagulante, para obtenção do plasma e soro. As amostras foram centrifugadas (15.000 rpm x g durante 15 minutos), e congeladas em freezer -20° C. E, as amostras de fígado, ducto deferente e mucosa da vagina foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a -80°C.

Ao término dos cinco ciclos (42 semanas de idade), oito matrizes de cada sexo por dieta experimental foram sacrificadas durante o período matutino e foram coletadas as seguintes amostras: ossos dos membros pélvicos (fêmur e tibiotarso), mucosa da vagina, testículos, ductos deferentes, fígado, plasma e soro sanguíneo.

As matrizes utilizadas para obtenção de soro e amostras de vísceras e ossos foram eutanasiadas por injeção intra-abdominal de barbitúrico (tiopental sódico 25 mg/kg de peso vivo associado a lidocaína) e comprovada a anestesia por imobilidade e ausência de reação a estímulos palpebral e corneal, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical. Todas as partes dos cadáveres e vísceras resultantes dos experimentos não utilizadas na pesquisa foram congeladas e enviadas para o incinerador do Biotério da UEM.

Os testículos foram fixados por imersão em solução de paraformol 4% e os ossos tibiotarso e fêmur do membro pélvico foram dissecados, armazenados em gases e congelados a -20 °C, para as análises mecânicas, morfométricas e de matéria mineral.

2.4.1 Análises bioquímicas

No soro ou plasma (n=4/sexo/dietas experimentais), foram analisadas as seguintes variáveis: Albumina (Alb), Proteínas totais (PT), fosfatase, fósforo (P), cálcio (Ca), estas variáveis foram analisadas pelo método colorimétrico, por meio de kits comerciais (Gold Analisa), seguindo os procedimentos operacionais padrões (POP) descritos nos mesmos. E o cálcio iônico (CaI) foi determinado por meio dos dados de albumina, fósforo e cálcio na seguinte fórmula:

$$\text{Cálcio iônico} = (6 \times \text{cálcio} - (0,19 \times \text{fósforo}) + \text{albumina} \div 3) \div (0,19 \times \text{fósforo} + \text{albumina} + 6)$$

2.4.2 Análises ósseas

As variáveis referentes à resistência óssea do fêmur e do tibiotarso foram analisadas no texturômetro (Brookfield, CT3, U.S.A). Os ossos foram posicionados, sobre uma plataforma de metal, apoiando a região das epífises, deixando livre a região central em posição antero-posterior, com um teste de três pontos sendo expressos em newton (N). A força foi aplicada na região da diáfise, padronizando a região para todos os ossos, com uma única velocidade de descida da sonda para aplicação da força de 5 mm/s e o valor utilizado de carga foi 500 g, de modo que a força aplicada foi mensurada no momento imediatamente anterior à ruptura do osso, entretanto, a distância entre os apoios foi específica para cada tipo de osso. As variáveis analisadas foram: resistência à quebra (kg/kf) e deformação na dureza (mm).

As análises de matéria mineral foram realizadas no fêmur e tibiotarso (n=8/sexo/dietas experimentais), utilizando as variáveis de percentagem de matéria seca, cinzas e cálcio. As amostras foram colocadas em estufa a 55°C dentro de cadinhos calcinados, por 72 horas, e posteriormente, pesadas em balança de precisão. Após a pesagem, foram levadas para a estufa com 105°C por mais 24 horas. Após este período, as amostras foram pesadas e calcinadas em mufla a 600°C por 6 horas, sendo feita a pesagem após 30 minutos para o resfriamento das amostras. Por meio destes dados de pesagem, foi determinada a percentagem de cinzas na matéria seca. A partir das cinzas, foram preparadas as soluções minerais, para as determinações de cálcio, que foram feitas por espectrofotometria de chamas.

2.4.3 Análises histológicas de testículo

As amostras de testículos foram processadas na rotina histológica, emblocadas em parafina, cortadas com 5 µm e coradas com HE. Os cortes foram analisados em microscópio de luz (Motic2.0, Hong Kong, China) e imagens digitais foram obtidas e analisadas no software Image J2. Para cada variável de diâmetro e espessura dos túbulos seminíferos, foram obtidas 20 mensurações por ave na objetiva de 20 x.

2.5 Análises antioxidantes

Para a extração lipídica do tecido hepático, oito amostras das matrizes de cada sexo e níveis de $Cx+25-(OH)D_3$, armazenadas em $-80\text{ }^\circ\text{C}$, foram maceradas em nitrogênio líquido, pesadas 200 µg, e homogeneizadas com 1,8 mL de metanol diluído em água destilada (1;2 mL:mL), por 10 segundos em vórtex, e centrifugadas (3000 rpm x g por 20 minutos) (Hermle, modelo Z323 K, Germany), para recuperação de 1,5 mL do sobrenadante (tecido hepático proteinizado). Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 10%; 1:1 v:v) e homogeneizado por 10 segundos, em vórtex, sendo posteriormente centrifugado (3000 rpm x g, por 20 min). O sobrenadante (tecido hepático desproteinizado) foi congelado em freezer $-20\text{ }^\circ\text{C}$ e utilizado nas análises antioxidantes.

Na extração lipídica do soro sanguíneo, quatro amostras das matrizes de cada sexo e níveis de $Cx+25-(OH)D_3$, armazenadas em $-20\text{ }^\circ\text{C}$, foram descongeladas e com o uso de micropipetas de precisão, foi pipetado 200 µL do soro em 200 µL de TCA 10% em tubo falcon, e homogeneizado por 10 segundos em vórtex, sendo posteriormente centrifugado (9.500 rpm x g por 10 minutos). O sobrenadante (soro desproteinizado) foi analisado em seguida, determinando-se a capacidade redutora de radicais livres.

2.5.1 Percentagem da capacidade redutora de radicais livre (% DPPH)

A capacidade redutora de radicais livres do 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH) foi determinada pelo método de DPPH (Sigma-Aldrich D9132), adaptado de Brand-Williams et al. (1995).

Para o extrato do tecido hepático desproteinizado, foi determinada a absorvância de 1,85 mL da solução de DPPH (0,06mM/L) pipetada em microcubeta em 515 nm, após dois minutos de incubação à temperatura ambiente ($20\text{ }^\circ\text{C}$), com o uso de espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22, China, Ninbo Province). Posteriormente, foi adicionado em tubo falcon envolto em papel alumínio, que continha 150 µl do extrato e homogeneizado em vórtex por 10 segundos, sendo que após 30 minutos foi mensurada

a absorvância em 515 nm, representando a decomposição do DPPH neste tempo. Como controle, foi utilizado 150µl de álcool metílico 100%, com 1,85 mL da solução de DPPH e mensurado sua absorvância em 515 nm, para calibrar o espectrofotômetro.

E para determinar a capacidade redutora no extrato sanguíneo, um volume total de 1,80 mL da solução de DPPH (0,06mM/L) foi pipetado em microcubeta de vidro e mensurado sua absorvância em 515 nm após dois minutos de incubação à temperatura ambiente (20° C), com o uso de espectrofotômetro. Posteriormente, foi adicionado em tubo falcon envolto em papel alumínio que continha 100µl de soro desproteínizado, e homogeneizado em vórtex por 10 segundos. Após 30 minutos, foi mensurada a absorvância em 515 nm, determinando a decomposição do DPPH neste tempo. Como controle, foi utilizado 100 µL homogeneizado com 1,8 mL da solução de DPPH e mensurada sua absorvância em 515nm, para calibrar o espectrofotômetro.

Os resultados da decomposição do DPPH foram expressos em percentagem de capacidade redutora de radicais livres (% DPPH), que foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ DPPH} = (1 - (A \text{ amostra } T(30) / A \text{ amostras } T(0))) \times 100$$

Em que:

A amostra: Absorvância da amostra no tempo zero;

A amostras: Absorvância das amostras durante os tempos.

2.5.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático

Para a curva padrão do TBARS, foram preparadas soluções com 1,3,3-tetrametoxipropano e metanol 50 % (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mM), e uma alíquota de 0,500 µL foi adicionada a 2,0 mL da solução de TBA em tubo falcon, colocados em banho fervente (100° C) durante 15 minutos e após 5 minutos, foi mensurada sua absorvância em 532 nm em espectrofotômetro. Os resultados de absorvância foram utilizados para determinar a equação da curva padrão, que só foi utilizada com $R^2 \geq 0,99$.

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de TBARS, adaptado de Chrzczanowicz et al. (2008). Para isto, uma alíquota de 500 µL do extrato de tecido hepático desproteínizado foi homogeneizado com 2,0 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (TBA 1%, TCA 10% e HCL 0,06%), e colocado em banho fervente (100°C), durante 15 minutos. Após cinco minutos, a leitura foi realizada em 532 nm em espectrofotômetro. Como controle, foi utilizado 0,500 µL da solução de álcool metílico e

água destilada (1:2 mL:mL) com 2,0 mL da solução de TBA e mensurada sua absorvância em 352 nm, para calibrar o espectrofotômetro.

Os resultados de absorvância representam a concentração de malonaldeído, que é uma substância reativa ao TBA. Estes resultados foram ajustados na curva padrão do TBARS e convertidos para mg de malonaldeído (MDA mg/ kg de fígado).

2.6 Análises estatísticas

Foram utilizados 240 animais, em um delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com cinco dietas e oito repetições. As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA), posteriormente os graus de liberdade referentes aos níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ foram desdobrados em polinômios ortogonais, para obtenção das equações de regressão, utilizando o modelos quadrático. Os dados foram submetidos à análise de regressão, por intermédio do procedimento GLM (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA), ao nível de significância de 5%. Para obtenção das médias observadas, foi utilizado o PROC MEANS, utilizando os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ como variável classificatória.

O modelo estatístico adotado foi:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{p-1} X_{p-1} + \varepsilon$$

Em que:

\hat{Y} = Variável dependente

x_1, x_2, \dots, X_{p-1} = Variáveis independentes

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{p-1}$ = parâmetros da regressão

ε = Erro aleatório

A significâncias do modelo foi testada na equação:

$$S_{mr} = S_{Qm} \text{ do modelo da anova} - S_{Qm} \text{ do modelo da regressão}$$

Em que,

S_{mr} = Significância do modelo de regressão.

S_{Qm} = Soma dos quadrados médios.

Quando, $P > 0,05$ houve significância do modelo a 5% de significância, aceitando

H_0 .

3. Resultados e Discussão

A suplementação dos níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ não influenciou o desempenho produtivo e a qualidade interna e externa do ovo (Tabela 2).

Tabela 2- Desempenho produtivo (n=240 reprodutores), qualidade interna e externa da casca dos ovos ao longo de cinco ciclos (n=1800 ovos), composição da casca realizada no 4º e 5º ciclo da produção de ovos (n=720 ovos) de matrizes de codornas europeias suplementadas com Cx+25-(OH)D₃.

Variáveis	Desempenho			Qualidade de ovos										Casca			
	CR ¹	Postura	CA ²	CA ²	MO ³	Peso ovo	Grav ⁴	UH ⁵	IG ⁶	Alb	Gema	Casca	Peso casca	Esp ⁷	MS ⁸	Cinzas	Cálcio
Dietas ¹²	(g)	(%)	(kg/kg)	(kg/dz)	(g)	(g)	(g/ml)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(g)	(mm)	(%)	(% MS)	(%MS)
0	28,85	86,51	4,09	0,627	10,96	12,86	1,17	89,61	0,458	61,24	31,04	7,72	1,00	0,222	97,59	79,64	33,66
3	28,65	87,97	3,91	0,578	11,11	12,64	1,16	89,90	0,460	61,84	30,22	7,94	1,04	0,230	97,64	86,25	37,56
6	28,84	87,25	3,92	0,656	11,05	12,79	1,15	89,48	0,451	61,42	30,94	7,64	0,98	0,223	97,49	83,33	36,65
9	28,79	85,60	4,00	0,644	10,87	12,48	1,17	90,02	0,463	61,21	30,94	7,85	1,03	0,228	97,31	82,54	35,23
12	28,81	83,69	4,11	0,631	10,73	12,79	1,15	89,73	0,461	61,33	30,94	7,73	1,03	0,226	97,08	79,69	33,16
Média	28,91	89,23	3,85	0,625	11,27	12,71	1,16	89,74	0,458	61,41	30,81	7,78	1,01	0,226	97,41	82,47	35,41
CV (%) ¹¹	3,05	3,76	11,84	11,15	5,51	4,31	2,26	1,88	3,28	2,29	3,03	3,06	6,11	3,00	0,47	6,43	9,25
EPM ⁹	0,151	0,712	0,096	0,012	0,170	0,086	0,004	0,260	0,002	0,144	0,147	0,039	0,009	0,001	0,048	0,876	0,56
Regressão	P-valor																
Linear	0,941	0,722	0,953	0,847	0,745	0,584	0,601	0,891	0,704	0,606	0,583	0,71	0,468	0,416	0,030	0,012	0,011
Quadrático	0,914	0,707	0,954	0,996	0,815	0,381	0,957	0,922	0,580	0,651	0,484	0,654	0,410	0,427	0,425	0,003	0,023
Equações de regressão														R ²	Cx	25-(OH)D ₃	PI ¹⁰
Matéria seca da casca = 97,68-0,044Dietas														0,86	-	-	-
Cinzas da casca = 80,589+1,484Dietas-0,134Dietas ²														0,68	5,40	2484	85,12
Ca na MS da casca = 34,191+1,071Dietas-0,100Dietas ²														0,86	5,22	2401	0,86

¹CR= Consumo de ração (g/dia);

²CA= Conversão alimentar;

³MO= Massa de ovos;

⁴Grav = Gravidade específica;

⁵UH = Unidade Haugh;

⁶IG = Índice de gema;

⁷Esp = Espessura de casca;

⁸MS= Matéria Seca da casca do ovo;

⁹EPM= Erro padrão da média;

¹⁰Ponto de inflexão;

¹¹CV (%) = Coeficiente de variação.

¹²Peso cas = Peso da casca do ovo;

¹² Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃+ (6 ppm de Cx +2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx +5.520 UI 25-(OH)D₃).

Não houve efeito dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ para taxa de postura, conversão alimentar (kg/kg e kg/dz), massa de ovos (g) e consumo de ração (g/dia), peso do ovo, gravidade específica, unidade Haugh, índice de gema, percentagem de gema, albúmen e casca, peso da casca e espessura de casca (Tabela 2). Os parâmetros de desempenho como a CA Kg/Dz e a CA Kg/Kg foram referentes a gaiolas com machos e fêmeas, justificando os resultados superiores em relação aos estudos realizados somente com fêmeas.

Em galinhas poedeiras alimentadas com dietas à base de milho e soja, outros autores (Cho et al., 2013; Duarte et al., 2015; Garcia et al., 2002; Khatun et al., 1999; Rosa et al., 2012; Zhang et al., 2011a) não observaram influência da suplementação de até 6 ppm de Cx sobre a taxa de postura, massa de ovos e CA Kg/Dz. Entretanto, para a variável taxa de postura, Cho et al. (2012) e Zhang et al. (2011b) observaram aumento da taxa de postura em galinhas poedeiras recebendo dietas contendo sorgo e com adição de 2ppm de Cx em relação à dieta controle.

As diferenças, sobre a taxa de postura, podem ser justificadas em razão da substituição do milho pelo sorgo, uma vez que o sorgo é mais deficiente em nutrientes essenciais, o efeito da Cx pode ser mais expressivo. Em pesquisas avaliando a qualidade interna dos ovos em poedeiras (Cho et al., 2012; Garcia et al., 2002; Rocha et al., 2013; Zhang et al., 2011b), não foi observada influência da Cx no peso do ovo, percentagem de albúmen, gema, casca, unidade Haugh e índice de gema.

O efeito da Cx sobre a qualidade do ovo pode estar relacionado com estrutura da membrana lipídica da gema, pois segundo Xia et al. (2015), os carotenoides aumentam os espaços nas membranas fosfolipídicas quando na fase em gel, facilitando a movimentação das moléculas, e, em sua fase líquida cristalina, desenvolvem funções relacionadas com a rigidez. Fato este que diminui o contato da gema com o oxigênio (O_2), preservando sua qualidade e melhorando a resistência da membrana vitelínica contra rompimentos.

Na análise da qualidade externa dos ovos, as variáveis de peso da casca (g) e espessura da casca (mm) não foram influenciadas ($P>0,05$). Estes resultados corroboram os autores Cho et al. (2012), que suplementaram 280 poedeiras da linhagem ISA Brown e não verificaram influência do tratamento que continha 2,1 ppm de Cx sobre o peso da casca (g) e espessura da casca (mm). Suplementando diferentes fontes da vitamina D_3 na dieta controle (3000 UI D_3) e na dieta teste (1500 UI D_3 + 3 ppm UI $Cx+ 7.140 25-(OH)D_3$), para poedeiras com 49 e 66 semanas, não houve efeito ($P>0,05$) da dieta teste em comparação à dieta controle, em relação às variáveis de peso de casca (g) e espessura

de casca (mm) (Käppeli et al., 2011). Diferindo deste resultado, em reprodutores de patos, foram testados isoladamente a vitamina D₃ (3000 UI) e o metabólito 25-(OH)D₃ (2700 UI) e a associação destes dois produtos (6 ppm + 2760 UI E 3000 UI, respectivamente). Em relação ao peso do ovo, não houve influência das dietas. Entretanto, a associação da vitamina D₃ com o 25-(OH)D₃ aumentou (P<0,05) a espessura de casca, que foi mensurada entre a 38^a e a 77^a semanas (Ren et al., 2016a).

Em galinhas poedeiras de segundo ciclo de produção (>70 semanas), o mesmo efeito foi observado quando foi feita a comparação entre níveis de cálcio associados à vitamina D e seus metabólitos 25-(OH)D₃, 1, 25-(OH)D₃, destacando que o 25-(OH)D₃ melhorou a percentagem de casca, a espessura de casca (mm) e a gravidade específica do Nascimento et al. (2014).

Nessas pesquisas a diferença de idade pode ter influenciado, pois nas galinhas mais velhas (>70 semanas) influenciou a espessura de casca. Sabendo que aves mais velhas possuem menor absorção de cálcio em relação às aves novas, a rápida absorção do 25-(OH)D₃ pode ter maximizado a deposição de cálcio na casca do ovo (Do Nascimento et al. 2014).

Na análise da composição da matéria mineral da casca dos ovos, a matéria seca (MS) diminuiu linearmente conforme os níveis de Cx+25-(OH)D₃ foram incluídos na dieta. As cinzas na matéria seca e o cálcio, responderam de modo quadrático crescente (P=0,04 e P=0,02), com valores máximos estimados nos níveis de 5,69 + 2561 e 5,35 + 2408 (ppm de Cx+25-(OH)D₃), respectivamente (Tabela 2). A composição na matéria seca do ovo reduziu, enquanto o teor de cinzas e cálcio aumentou até aos níveis estimados, indicando menor quantidade de água e maior quantidade de minerais, principalmente o cálcio e o fósforo na casca dos ovos de matrizes de codornas europeias, fato que foi confirmado com a maior percentagem de cálcio na casca. Os resultados de percentagem de matéria seca, cinzas e cálcio são semelhantes ao apresentado por (Souza, 2016). Os valores de cálcio são semelhantes (30,06%) e de cinzas são próximas ao valor (87,56) observado pelos autores Costa et al. (2011), em codornas japonesas. Entretanto, a maior quantidade de cálcio na casca do ovo não fez com que a espessura de casca (mm) aumentasse (Tabela 1). A possível explicação para isto é que o cálcio atue na rigidez da casca do ovo, provavelmente diminuindo o número de ovos quebrados. Reforçando esta hipótese, os autores Ren et al. (2016a) avaliaram o efeito da Cx+25-(OH)D₃ com ou sem vitamina D₃, sobre variáveis de qualidade de ovo e observaram menores índices de ovos quebrados dos reprodutores de patos.

Com relação à análise da coloração da gema, foi observado que a luminosidade L^* (escuro (-) e claro (+)) teve comportamento quadrático decrescente ($P < 0,01$), com valor mínimo de luminosidade predito no nível de 10,24 ppm de $Cx + 4608$ UI 25-(OH) D_3 (Tabela 3). Enquanto, a intensidade a^* (verde (-) a vermelho (+)) foi influenciada ($P < 0,05$) de forma quadrática crescente, com valor máximo estimado no nível de 11,05 ppm de $Cx + 4973$ UI 25-(OH) D_3 (Tabela 3).

Enquanto, a intensidade de coloração b^* (azul (-) a amarelo (+)), diminuiu linearmente ($P = 0,04$) conforme os níveis de $Cx + 25$ -(OH) D_3 aumentaram na ração. A suplementação de $Cx + 25$ -(OH) D_3 aumentou a coloração vermelho-alaranjado na gema do ovo, reduzindo a luminosidade e o tom de amarelo. É importante ressaltar que os valores encontrados para a intensidade a^* estão de acordo com o Spada et al. (2016b), que também verificaram valores negativos de a^* . Os ovos de galinhas poedeiras e de matrizes de codornas de corte apresentam baixos valores de cor vermelha na gema, tornando a adição uma prática comercial para alterar a coloração em função da preferência do consumidor por ovos com gemas mais alaranjadas e também a alterações no sabor dos ovos (Moura et al., 2009).

Tabela 3. Coloração de gemas nos ovos das matrizes de codornas europeias ao longo de cinco ciclos, suplementadas com $Cx + 25$ -(OH) D_3 . (n=1800)

Coloração de gema Dietas ⁴	Luminosidade *L	Verde (-) a Vermelho (+)	Azul (-) a Amarelo (+)	
0	59,44	-3,44	39,50	
3	55,59	6,53	38,54	
6	52,99	13,37	38,24	
9	51,67	17,08	37,92	
12	51,6	17,65	38,00	
Média	54,42	10,25	38,47	
CV (%) ³	2,29	15,2	3,71	
EPM ¹	0,494	1,289	0,236	
Regressão	P-Valor			
Linear	<0,001	<0,001	0,042	
Quadrático	<0,001	<0,001	0,321	
Equações de regressão	R ²	C _x	25-(OH) D_3	PI ²
$L^* = 59,441,4935Dietas + 0,0729Dietas^2$	0,85	10,24	4712	51,79
$a^* = -3,436 + 3,845Dietas - 0,174Dietas^2$	0,96	11,05	50825	17,81
$b^* = 39,16 - 0,115Dietas$	0,80	-	-	-

¹ EPM= Erro padrão da média;

² PI= Ponto de inflexão;

³ CV (%) = Coeficiente de variação.

⁴ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D_3 ; (3) 200 UI Vit D_3 + (3 ppm de $Cx + 1.380$ UI 25-(OH) D_3); (6) 200 UI Vit D_3 + (6 ppm de $Cx + 2.760$ UI 25-(OH) D_3); (9) dieta basal + (9 ppm de $Cx + 4.140$ UI 25-(OH) D_3); (12) dieta basal + (12 ppm de $Cx + 5.520$ UI 25-(OH) D_3).

O depósito da Cx na gema do ovo ocorre por meio de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), que depositam cerca de 80% da Cx ingerida da dieta no ovário, a qual é transferida para a gema do ovo (Johnson-Dahl et al., 2016).

Avaliando o efeito da suplementação de 6 ppm de Cx 2700 UI 25-(OH)D₃ da 38^a a 77^a semana de reprodutores de pato, foi observado maior pigmentação na gema do ovo e na coloração das penas do macho (Ren et al., 2016a). Surai et al. (2003), avaliando o efeito da suplementação de CX em diferentes níveis para reprodutores de frango de corte, com 30 semanas de idade, relatou que o acúmulo de Cx na gema do ovo é proporcional a quantidade fornecida na dieta e está associada com o aumento da concentração de α -tocoferol no fígado de pintinhos com 1 dia de idade e redução da peroxidação lipídica.

Como resultado da adição de 6 ppm Cx de em dietas de milho ou sorgo a concentração de carotenoides aumentou de 1,98 mg/kg para 27,98 mg/kg na gema do ovo de reprodutores da linhagem Cobb-500 da 54^a a 64 semana e foi associada com a redução da susceptibilidade ao estresse oxidativo na gema do ovo, no desenvolvimento embrionário e no desempenho da progênie (Rosa et al., 2016). Apesar de não ter sido quantificado os carotenoides nas gemas, os resultados de coloração sugerem que houve depósito de Cx na gema. A Cx exerce importantes funções nas membranas celulares dos tecidos lipídicos, com altas concentrações de PUFA, como por exemplo na gema do ovo e nos espermatozoides (Rocha et al., 2010b; Surai, 2012).

Nas análises de bioquímicas sérica, houve diferença ($P < 0,05$) entre os machos e as fêmeas, as variáveis foram influenciadas ($P < 0,05$) pelos níveis de Cx+25-(OH)D₃ (Tabela 4).

Nas fêmeas, as proteínas totais séricas diminuíram linearmente ($P = 0,046$). A albumina sérica, fósforo, cálcio, cálcio iônico e fosfatase foram influenciados de forma quadrática decrescente ($P = 0,011$, $P < 0,001$, $P < 0,001$, $P = 0,005$ e $P < 0,001$, respectivamente), os pontos de mínimo do fósforo, cálcio e cálcio iônico foram estimados aos níveis de 8,07+3712, 7,64 + 3515 e 7,24 + 3330 (ppm de Cx + UI 25-(OH)D₃), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis plasmáticos de albumina, proteínas, fosfatase, fósforo, cálcio e cálcio iônico em matrizes e machos suplementados com níveis de Cx+25-(OH)D₃. (n=40)

Dietas ⁴	Albumina (g/dL)		Proteínas (g/dL)		Fosfatase U/L		Fósforo (mg/dL)		Cálcio (mg/dL)		Cálcio Iônico (mg/dL)	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
0	1,65	1,25	5,75	4,70	518,29	992,37	2,18	5,36	13,51	4,81	10,16	2,18
3	1,23	1,08	4,28	4,53	246,71	335,24	0,96	5,13	11,18	4,73	9,08	1,80
6	1,05	1,00	3,95	3,53	419,47	354,59	0,97	5,22	10,44	4,69	8,56	1,54
9	1,03	0,90	4,65	3,58	384,23	443,04	0,74	5,24	11,11	4,81	9,44	1,35
12	1,13	0,98	4,03	4,33	390,45	424,42	0,94	5,10	11,17	4,30	9,12	0,96
Média	1,18	1,04	4,53	4,13	391,83	509,93	1,16	5,21	11,48	4,67	9,24	1,57
CV (%) ³	20,77	10,77	19,12	12,71	22,56	24,37	22,48	3,07	5,91	6,38	5,58	9,59
EPM ¹	0,071	0,03	0,222	0,103	21,331	39,879	0,131	0,033	0,296	0,049	0,183	0,069
Regressão	P-valor											
Linear	0,002	0,004	0,038	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	0,456	<0,001	0,530	<0,001	0,003
Quadrática	0,011	0,037	0,111	0,009	<0,001	<0,001	<0,001	0,742	<0,001	0,226	0,005	0,916
Equações de regressão									R ²	Cx	25OHD ₃	PI ²
Fêmeas	Albumina = 1,636-0,156Dietas+0,010 Dietas ²								0,89	7,80	3588	1,02
	Proteínas = 5,145-0,1025*Dietas								0,46	-	-	-
	Fosfatase=465,121-37,044Dietas+2,759Dietas ²								0,26	6,71	3087	340,78
	Fósforo = 2,071-0,339Dietas+0,021Dietas ²								0,90	8,07	3712	0,70
	Cálcio =13,319-0,749Dietas+0,049Dietas ²								0,72	7,64	3515	10,46
Machos	Cálcio Iônico =10,028-0,362Dietas+0,025Dietas ²								0,90	7,24	3330	8,72
	Albumina = 1,258-0,0694Dietas+0,004 Dietas ²								0,97	8,68	3993	0,96
	Proteínas = 4,88-0,333*Dietas+0,023Dietas ²								0,75	7,24	3330	3,67
	Fosfatase=907,854-162,47Dietas+10,683Dietas ²								0,78	7,60	3496	290,13
	Cálcio Iônico =2,143-0,096Dietas								0,90	-	-	-

¹ EPM = Erro padrão da média;² PI = Ponto de Inflexão;³ CV (%) = Coeficiente de variação.⁴ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃+ (6 ppm de Cx +2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx +5.520 UI 25-(OH)D₃).

O plasma e soro sanguíneo foram coletados no período em que o ovo estava no útero, formando a casca do ovo. Desta forma, a redução de forma quadrática das concentrações de cálcio e fósforo no plasma sanguíneo, provavelmente ocorreu em função da suplementação de $Cx+25-(OH)D_3$, que pode influenciar o transporte de íons cálcio e fósforo da corrente sanguínea para o útero, aumentando a deposição de íons de cálcio e fósforo na casca do ovo. Nesta fase, o útero também deposita o metabólito $25-(OH)D_3$ e a Cx obtidos da dieta na gema do ovo.

O crescimento quadrático de cálcio na casca do ovo (Tabela 2) e possivelmente da Cx e do metabólito $25-(OH)D_3$ na gema do ovo, podem influenciar diretamente o sistema antioxidante e a formação do esqueleto ósseo do embrião durante o processo de incubação. Além disso, os baixos valores de fósforo no plasma podem indicar que houve aumento da atividade da enzima 1- α -hidroxilase nos rins, otimizando a conversão da $25-(OH)D_3$ em 1,25-dihidrocoleciferol (Moe, 2008), corroborando o aumento da deposição de cálcio na casca encontrado neste estudo.

Os valores de fosfatase nas matrizes diminuíram de forma quadrática por causa da menor quantidade de fósforo no metabolismo para ser desfosforilado, além de indicar que as aves estavam em período de remodelamento ósseo, devido à formação da casca.

Nas análises bioquímicas dos machos, não houve efeito dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ sobre o cálcio e fósforo (Tabela 4). O cálcio iônico diminuiu linearmente ($P<0,01$) conforme os níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ aumentaram nas dietas. A albumina, proteínas totais e a fosfatase apresentaram resposta quadrática decrescentes ($P=0,037$, $P=0,009$ e $P<0,001$, respectivamente) (Tabela 4). Os valores médios observados da concentração sérica de cálcio para os machos são bem menores do que em fêmeas. Isto possivelmente ocorreu porque nos machos às exigências de cálcio e fósforo são menores e a homeostase é constante, em razão dos machos não possuírem ossos medulares que armazenam cálcio para a remodelação óssea. Entretanto, os valores de albumina e proteínas totais diminuíram reduzindo o cálcio iônico, indicando relação da $Cx+25-(OH)D_3$ com estas variáveis.

Com relação aos resultados de análises ósseas, houve diferenças entre as variáveis de matéria mineral entre os machos e as fêmeas ($P<0,05$). As variáveis de percentagem de matéria seca, cinzas e cálcio do fêmur e a matéria seca e o cálcio no tibiotarso das fêmeas foram influenciadas com comportamento quadrático decrescente ($P=0,009$; $P=0,021$; $P=0,011$, $P=0,014$ e $P=0,012$, respectivamente) (Tabela 5). Já na análise de

resistência óssea, a resistência a quebra (Re) e deformação na dureza (Df Dr) do fêmur não houve influência ($P > 0,05$) dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da composição do ossos do membro pélvico de matéria mineral e resistência óssea de fêmeas de codornas europeias com 42 semanas suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$. (n=80)

Variáveis	Fêmur						Tibiotarso			
	MS ¹ (%)	Cz ² (%)	Ca ³ (%)	Re ⁴ (kg/kf)	Df Dr ⁵ (mm)	MS (%)	Cz (%)	Ca (%)	Re kg/kf	DfDr (mm)
Dietas ⁹										
0	69,87	40,75	17,22	3,06	1,17	69,18	36,85	15,22	4,74	0,55
3	66,34	37,08	15,86	3,48	0,98	68,18	37,75	14,93	5,24	0,50
6	65,20	37,56	12,90	3,40	1,03	65,82	36,91	12,93	4,84	0,40
9	65,43	37,99	15,86	4,17	0,89	68,61	38,58	15,03	5,44	0,50
12	72,32	41,77	16,02	3,56	0,88	71,26	37,94	15,27	5,82	0,45
Média	67,88	39,17	15,34	3,46	0,98	68,50	37,47	14,54	5,18	0,48
CV (%) ⁸	8,36	11,45	16,42	2,54	1,79	4,58	4,79	11,08	2,99	2,71
EPM ⁶	0,972	0,747	0,438	0,120	0,031	2,565	1,235	0,676	0,244	0,037
Regressão	P-valor									
Linear	0,018	0,037	0,007	0,390	0,181	0,036	0,630	0,010	0,990	0,091
Quadrático	0,009	0,021	0,011	0,340	0,566	0,014	0,870	0,012	0,720	0,180
Equações de regressão							R ²	Cx	25- (OH)D ₃	PI ⁷
	Matéria seca = 69,813-0,028*Dietas+0,18Dietas ²						0,99	4,06	1868	64,55
Fêmur	Cinzas = 40,569-1,301Dietas+0,116Dietas ²						0,95	5,61	2581	36,92
	Cálcio = 17,356-0,986Dietas+0,075Dietas ²						0,66	6,57	3022	14,12
Tibiotarso	Matéria seca = 69,271-0,964Dietas+0,093Dietas ²						0,81	5,18	2383	66,77
	Cálcio = 15,681-0,594Dietas+0,047 Dietas ²						0,60	6,32	2907	13,80

¹ MS = Matéria Seca;

² Cz = Cinzas na matéria seca;

³ Ca = Cálcio nas cinzas;

⁴ Re = Resistência de quebra;

⁵ DfDr = Deformação na dureza;

⁶ EPM = Erro padrão da média;

⁷ PI = Ponto de Inflexão;

⁸ CV (%) = Coeficiente de variação;

⁹ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃ + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃).

No momento da coleta dos ossos dos membros pélvicos, as matrizes estavam em período de formação da casca do ovo, indicando que houve remoção dos minerais dos ossos que foram transportados para a corrente sanguínea e, posteriormente, para o útero, onde ocorre a deposição de cálcio na casca dos ovos. Esse transporte de minerais dos ossos medulares foi confirmado nas análises de bioquímica sérica e da quantidade de cálcio na casca do ovo, pois, o cálcio sérico, o cálcio iônico sérico e o fósforo sérico diminuíram de forma quadrática, enquanto a concentração de cálcio na casca do ovo

aumentou de forma quadrática. Demonstrando o estado de remodelagem do cálcio no metabolismo por causa da formação da casca dos ovos.

Na análise da composição da casca do ovo, a percentagem de matéria seca, cinzas e cálcio do fêmur dos machos não houve influência sobre a Matéria Seca (MS), Cinzas (Cz) e Cálcio (Ca) no fêmur ($P>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Análise da composição dos ossos do membro pélvico de matéria mineral e resistência ósseas em machos reprodutores de codornas europeias, com 42 semanas de idade suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$. (n=80)

Variáveis	Fêmur					Tibiotarso				
	Ms ¹ (%)	Cz ² (%)	Ca ³ (%)	Re ⁴ (kg/kf)	Df Dr ⁵ (mm)	MS (%)	Cz (%)	Ca (%)	Re kg/kf	DfDr (mm)
0	75,66	29,99	17,79	3,98	0,72	81,43	32,06	17,13	5,99	0,75
3	71,77	25,78	18,07	3,27	0,83	74,71	29,96	21,55	5,25	0,59
6	71,20	27,54	18,50	3,63	0,79	78,42	30,37	19,13	5,95	0,45
9	74,37	26,93	16,04	3,76	0,93	77,78	29,98	17,69	4,96	0,45
12	74,31	27,38	17,52	3,68	0,95	78,87	29,72	15,47	5,44	0,54
Média	74,47	27,22	17,52	3,63	0,83	78,22	30,44	18,26	5,47	0,55
CV (%) ⁸	8,49	11,04	14,95	17,82	25,81	8,86	6,61	14,55	2,01	3,12
EPM ⁶	1,032	2,694	0,678	0,101	0,030	1,09	0,332	0,496	0,171	0,031
Regressão	P-valor									
Linear	0,215	0,221	0,221	0,435	0,653	0,218	0,048	0,011	0,435	0,015
Quadrática	0,218	0,225	0,513	0,561	0,574	0,230	0,287	0,001	0,561	0,042
Equações de regressão							R ²	Cx	25- (OH)D ₃	PI ⁷
	Cz = 31,36 - 0,158 Dietas						0,69	-	-	-
Tibiotarso	Ca = 17,866+0,939Dietas-0,0985Dietas ²						0,75	4,77	2194	20,10
	DfDr = 0,759-0,079Dietas+0,005Dietas ²						0,29	7,90	3634	0,447

¹ MS =Matéria Seca;

² Cz = Cinzas na matéria seca;

³ Ca = Cálcio nas cinzas;

⁴ Re = Resistência de quebra;

⁵ DfDr = Deformação na dureza;

⁶ EPM= Erro padrão da média;

⁷ PI= Ponto de inflexão;

⁸ CV (%) = Coeficiente de variação;

⁹ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃+ (6 ppm de Cx +2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx +5.520 UI 25-(OH)D₃).

Entretanto, no tibiotarso houve influência de modo linear nas Cz e de modo quadrático no Ca ($P<0,001$) pelos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$. Na análise de resistência óssea a Re e a Df Dr do fêmur e a Re no tibiotarso não foram influenciadas ($P>0,05$) pelos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$. Enquanto, no tibiotarso a Df Dr foi influenciada de modo quadrático decrescente ($P=0,042$) (Tabela 6).

Os resultados das análises do status antioxidante no fígado e soro sanguíneo de reprodutores com 42 semanas demonstraram influência dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$

sobre todas as variáveis de modo quadrático crescente do DPPH ($P < 0,001$) e decrescente da quantidade de malonaldeído (MDA) ($P < 0,001$), com exceção da % DPPH no soro dos machos, que teve comportamento linear ($P < 0,001$) (Tabela 7).

Nas fêmeas, a % DPPH aumentou de forma quadrática no soro sanguíneo, devido à $Cx+25-(OH)D_3$ ter aumentando a capacidade de remoção de radicais livres. Entretanto, a maior capacidade de remoção de radicais livres no soro acima dos níveis estimados não foi refletida nos resultados da concentração de malonaldeído no tecido hepático.

Tabela 7. Capacidade redutora de radicais livres (% DPPH) e oxidação lipídica (TBARS) no soro sanguíneo e no tecido hepático dos reprodutores de codornas europeias ($n=8$) com 42 semanas de idade, suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$ ($n=40$).

Variáveis	% DPPH				TBARS (MDA mg/kg)	
	Fígado		Soro sanguíneo		Fígado	
Dietas	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
0	43,10	50,74	68,81	65,15	0,256	0,213
3	50,63	54,33	77,93	67,36	0,165	0,159
6	47,36	53,60	77,76	68,38	0,219	0,168
9	47,15	52,22	78,04	69,63	0,229	0,190
12	44,64	48,32	79,47	73,80	0,307	0,284
Média	46,57	51,84	76,41	72,64	0,235	0,203
CV (%) ³	9,69	5,74	3,65	3,65	18,38	17,81
EPM ¹	0,768	0,569	0,675	0,572	0,009	0,011
Regressão	P-valor					
Linear	0,01	0,031	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Quadrática	0,007	<0,001	<0,001	0,352	<0,001	<0,001
Equações de regressão			R ²	Cx	25-(OH)D ₃	PI
Fêmeas						
Fígado	%DPPH=44,22+1,609Dietas-0,135Dietas ²		0,62	5,96	2742	49,01
	TBARS=0,245-0,0224Dietas+0,0023Dietas ²		0,83	4,83	2222	0,189
Soro	%DPPH= 69,99+2,134Dietas-0,1184Dietas ²		0,64	9,04	4158	79,64
Machos						
Fígado	%DPPH =51,00+1,256Dietas-0,124Dietas ²		0,97	5,06	2328	54,18
	TBARS=0,213-0,239Dietas+0,0247Dietas ²		0,98	4,82	2217	0,156
Soro	%DPPH =64,95+0,652Dietas		0,86	-	-	-

¹ EPM = Erro padrão da média;

² PI = Ponto de Inflexão;

³ CV (%) = Coeficiente de variação.

⁴ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃ + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃).

A maior capacidade de remoção de radicais livres do tecido hepático preveniu a degradação de moléculas, fato que foi confirmado pela análise de TBARS. Os resultados da concentração de MDA (mg/kg), no tecido hepático das fêmeas deste estudo,

evidenciaram menor concentração no fígado ao nível estimado de 4,83 ppm + 2222 UI 25-(OH)D₃.

A menor quantidade de MDA no tecido hepático e a maior capacidade redutora de radicais livres no tecido hepático e no soro sanguíneo nos níveis estimados demonstram que houve maior atividade antioxidante no metabolismo, melhorando as condições de saúde dos reprodutores de codornas europeias.

Avaliando dieta com Cx+25-(OH)D₃ sobre o status antioxidante em patos, não houve influência sobre a quantidade de MDA no fígado das matrizes de patos. Entretanto, para os machos, os resultados encontrados corroboram os resultados dos mesmos autores, que verificaram diferenças significativa ($P < 0,01$) do tratamento com 6 ppm de Cx em relação ao controle, onde o valor de MDA diminuiu 20,56 % (Ren et al., 2016b).

A Cx integra as membranas lipídicas do corpo e atua removendo e neutralizando elétrons de carga negativa por meio de doações de elétrons de carga positiva, evitando a formação de radicais livres, que causam danos na integridade das membranas lipídicas, nas enzimas e nos núcleos do DNA (Chew, 1996; Rocha et al., 2010b). Com menor quantidade de radicais livres circulantes, provavelmente a degradação de moléculas irá diminuir, assim como o MDA, que é um dos compostos da oxidação lipídica e tem sido mensurado pelo método de TBARS, representando o sistema oxidativo (Surai, 2012).

Entretanto, no tecido hepático, nos níveis estimados acima de 4,82 ppm Cx + 2222 UI 25-(OH)D₃ e de 5,06 ppm Cx + 2327 UI 25-(OH)D₃, nas fêmeas e nos machos, respectivamente, a quantidade de MDA mg/kg aumentou (Tabela 7). Isto possivelmente ocorreu pelas altas doses de 25-(OH)D₃ em combinação com a vitamina D₃ do premix, que pode ter causado excesso de radicais livres, fazendo com que a máxima capacidade redutora de radicais livres dos níveis estimados não fosse suficiente para evitar a oxidação lipídica, aumentando a quantidade de MDA mg/Kg nos tecidos.

Analisando os efeitos da vitamina D₃ no sistema antioxidante, os pesquisadores Saha et al. (2016) descreveram que os níveis séricos de vitamina D₃ podem influenciar o status do sistema antioxidante e oxidativo. A associação dos níveis séricos de vitamina D₃ com análises antioxidantes poderiam ajudar a compreender os resultados desta pesquisa e comprovar que a vitamina D₃ em excesso, pode causar efeito reverso no sistema antioxidante, aumentando a produção de radicais livres e a oxidação lipídica.

Os testículos dos machos foram analisados histologicamente com o objetivo de verificar se os machos alimentados com dietas formuladas com as exigências de fêmeas em postura, e o excesso de vitaminas D₃, do metabólito 25-(OH)D₃, cálcio e fósforo,

poderiam causar alterações no epitélio do túbulo seminífero. O diâmetro ($211,35 \pm 2,98$) e a espessura ($60,90 \pm 0,55$) do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$. Demonstrando que nas dietas experimentais níveis de $25-(OH)D_3$ elevados não prejudicaram os túbulos seminíferos, embora seja referenciado na literatura que metabólito $25-(OH)D_3$, quando em excesso, pode ser tóxico ao metabolismo animal e prejudicar índices reprodutivos.

De modo geral, a adição de $Cx+25-(OH)D_3$ aumentou o depósito da Cx na gema do ovo, tornando a gema mais vermelha e escura. A suplementação de $Cx+25-(OH)D_3$ melhorou a capacidade redutora de radicais livres dos reprodutores, removendo mais radicais livres do metabolismo e diminuindo a oxidação lipídica, preservando o metabolismo. Isso provavelmente melhorou a condição de saúde e o sistema imune dos reprodutores. Esta hipótese tem como argumento o maior depósito de Cx na gema do ovo e, possivelmente, em outros órgãos, atuando no sistema antioxidante. Outra importante função é a relação da Cx com a vitamina C e E, na defesa e contra-ataques de radicais livres, aumentando a capacidade de neutralização destes radicais, combatendo a oxidação lipídica (Urso et al., 2015). Assim, esse sistema antioxidante atua preservando a integridade do conteúdo nutricional da gema, que será aporte de nutrientes para o embrião durante o desenvolvimento embrionário, podendo melhorar índices reprodutivos, como a eclodibilidade, fertilidade e mortalidade (Rosa et al., 2012; Surai, 2016) e melhorar a qualidade do pintinho.

Também exerceu influência positiva no metabolismo do cálcio, pois os resultados de cálcio na casca do ovo, bioquímico, fêmur e tibiotarso indicam que durante o processo de formação de ovos das matrizes, houve maior remoção de cálcio dos ossos e do plasma, enquanto a percentagem de cálcio aumentou nas cascas dos ovos destas fêmeas. Já nos machos, foi possível verificar que as concentrações séricas de cálcio não sofreram influência dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ e seus valores são muito menores que em fêmeas. Entretanto, observou-se que no tibiotarso dos machos houve maior deposição de cálcio em função dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ e o metabolismo em geral não foi prejudicado pela ingestão das dietas experimentais com elevados níveis de $25-(OH)D_3$.

4. Conclusão

A suplementação de reprodutores com $Cx+25-(OH)D_3$ alterou a cor da gema, modificou o metabolismo do cálcio com efeitos na casca do ovo, nas variáveis

bioquímicas e nos ossos, promoveu também maior capacidade de remover radicais livres no soro sanguíneo e no fígado reduzindo a peroxidação lipídica no fígado de reprodutores de codornas europeias. Baseado na deposição de cálcio na casca do ovo e no aumento da atividade antioxidante o melhor nível foi o de 5 ppm + 2300 UI 25-(OH)D₃.

5. Referências bibliográficas

- Bar, A., M. Sharvit, D. Noff, S. Edelstein, and S. Hurwitz. 1980. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. *The Journal of Nutrition* 110:1930-1934.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and H. L. Roderick. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 4:517-529.
- Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28:25-30.
- Chew, B. P. 1996. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology* 59:103-114.
- Cho, J., Z. Zhang, and I. Kim. 2013. Effects of canthaxanthin on egg production, egg quality, and egg yolk color in laying hens. *Journal of Agricultural Science* 5:269-274.
- Chrczanowicz, J., A. Gawron, A. Zwolinska, J. de Graft-Johnson, W. Krajewski, M. Krol, J. Markowski, T. Kostka, and D. Nowak. 2008. Simple method for determining human serum 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity—possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 46:342-349.
- Costa, C. H. R., S. Barreto, P. C. Gomes, L. H. Hosoda, C. A. Lipari, and H. Lima. 2011. Níveis de fósforo disponível em dietas para codornas japonesas de 45 a 57 semanas de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40:2152-2160.
- Do Nascimento, G., A. Murakami, A. Guerra, I. Ospinas-Rojas, M. Ferreira, and J. Fanhani. 2014. Effect of different vitamin D sources and calcium levels in the diet of layers in the second laying cycle. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 16:37-42.
- Duarte, V., C. S. Minafra, F. R. d. Santos, and F. d. S. Perim. 2015. Inclusion of canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol in the diet of broiler breeders on performance and incubation parameters. *Ciência Rural* 45:2050-2055.
- Edwards Jr, H., M. Elliot, and S. Sooncharenying. Year. Quantitative substitution of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and 1-hydroxycholecalciferol for cholecalciferol in broiler diets. *Proc. Proceedings XIX World's Poultry Congress*, 567-571.
- Esatbeyoglu, T., and G. Rimbach. 2016. Canthaxanthin: From molecule to function. *Molecular Nutrition & Food Research*.
- Garcia, E., A. Mendes, C. Pizzolante, H. Gonçalves, R. Oliveira, and M. Silva. 2002. Efeito dos Níveis de Cantaxantina na Dieta Sobre o Desempenho e Qualidade dos Ovos de Poedeiras Comerciais. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 4:00-00.
- Hamilton, R. 1982. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. *Poultry Science* 61:2022-2039.
- Johnson-Dahl, M. L., M. J. Zuidhof, and D. R. Korver. 2016. The effect of maternal canthaxanthin supplementation and hen age on breeder performance, early chick traits, and indices of innate immune function. *Poultry Science*:293.

- Käppeli, S., E. Fröhlich, S. G. Gebhardt-Henrich, A. Pfulg, H. Schäublin, R. Zweifel, H. Wiedmer, and M. H. Stoffel. 2011. Effects of dietary supplementation with synthetic vitamin D3 and 25-hydroxycholecalciferol on blood calcium and phosphate levels and performance in laying hens. *Archiv für Geflügelkunde* 75:179-184.
- Khatun, A., M. A. Ali, and J. G. Dingle. 1999. Comparison of the nutritive value for laying hens of diets containing azolla (*Azolla pinnata*) based on formulation using digestible protein and digestible amino acid versus total protein and total amino acid. *Animal Feed Science and Technology* 81:43-56.
- Moe, S. M. 2008. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 35:215-237.
- Moros, E. E., D. Darnoko, M. Cheryan, E. G. Perkins, and J. Jerrell. 2002. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5787-5790.
- Moura, A. M. A. d., J. B. Fonseca, E. d. A. Melo, V. L. A. G. d. Lima, P. A. d. Santos, and Q. J. d. Silva. 2009. Características sensoriais de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*, Temminck e Schlegel, 1849) suplementadas com pigmentantes sintéticos e selenometionina. *Ciência e Agrotecnologia* 33:1594-1600.
- Pappas, A. C., T. Acamovic, N. H. C. Sparks, P. F. Surai, and R. M. McDevitt. 2005. Effects of supplementing broiler breeder diets with organic selenium and polyunsaturated fatty acids on egg quality during storage. *Poultry Science* 84:865-874.
- Ren, Z., S. Jiang, Q. Zeng, X. Ding, S. Bai, J. Wang, Y. Luo, Z. Su, Y. Xuan, B. Yao, F. Cisneros, and K. Zhang. 2016a. Effect of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the performance of duck breeders under two different vitamin regimens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7:2-2.
- Ren, Z. Z., S. Z. Jiang, Q. F. Zeng, X. M. Ding, S. P. Bai, J. P. Wang, Y. H. Luo, Z. W. Su, Y. Xuan, and K. Y. Zhang. 2016b. Effects of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the antioxidant status and tibia quality of duck breeders and newly hatched ducklings. *Poultry Science* 95:2090-2096.
- Ren, Z. Z., J. P. Wang, Q. F. Zeng, X. M. Ding, S. P. Bai, Y. H. Luo, Z. W. Su, Y. Xuan, and K. Y. Zhang. 2016c. The effects of maternal dietary vitamin premixes, canthaxanthin, and 25-hydroxycholecalciferol on the performance of progeny ducklings. *Poultry Science* 95:630-635.
- Rivera, S., and R. Canela. 2012. Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. *Molecules* 17:11255-11268.
- Rocha, J., L. Lara, N. Baiao, R. Vasconcelos, V. Barbosa, M. Pompeu, and M. Fernandes. 2010a. Antioxidant properties of vitamins in nutrition of broiler breeders and laying hens. *World's Poultry Science Journal* 66:261-270.
- Rocha, J. S. R., V. M. Barbosa, L. J. C. Lara, N. C. Baião, S. V. Cançado, A. M. Q. Lana, M. A. Pompeu, R. J. C. Vasconcelos, A. L. C. Machado, D. J. A. Miranda, M. N. S. Fernandes, and P. M. M. Mendes. 2013. Efeito do armazenamento e da cantaxantina dietética sobre a qualidade do ovo fértil e o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65:792-800.
- Rocha, J. S. R., L. J. C. Lara, N. C. BaiÃO, R. J. C. Vasconcelos, V. M. Barbosa, M. A. Pompeu, and M. N. S. Fernandes. 2010b. Antioxidant properties of vitamins in nutrition of broiler breeders and laying hens. *World's Poultry Science Journal* 66:261-270.
- Rosa, A., C. Bonilla, A. Londero, C. Giacomini, C. Orso, M. Fernandes, J. Moura, and R. Hermes. 2016. Effect of broiler breeders fed with corn or sorghum and canthaxanthin

- on lipid peroxidation, fatty acid profile of hatching eggs, and offspring performance. *Poultry Science*:294.
- Rosa, A., A. Scher, J. Sorbara, L. Boemo, J. Forgiarini, and A. Londero. 2012a. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science* 91:660-666.
- Rosa, A. P., A. Scher, J. O. Sorbara, L. S. Boemo, J. Forgiarini, and A. Londero. 2012b. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science* 91:660-666.
- Rostagno, H., L. Albino, and J. Donzele. 2005. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa. Minas Gerais, Brazil: Universidade Federal de Viçosa. p 186.
- Saha, P., S. Dasgupta, S. Sen, A. Kumar, and U. K. Biswas. 2016. Patients with type 2 diabetes have reduced levels of plasma vitamin D3 and are well correlated with the oxidative stress parameters. *Asian Journal of Medical Sciences* 7:35-40.
- Saunders-Blades, J., and D. Korver. 2015. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poultry Science* 94:1233-1246.
- Souza, C. S. 2016. Parâmetros fisiológicos e produtivos de codornas japonesas, em postura, suplementadas com 1, 25-dihidroxivitamina-D3-glicosídeo de origem vegetal.
- Spada, F. P., M. M. Selani, A. A. D. Coelho, V. J. M. Savino, A. A. Rodella, M. C. Souza, F. S. Fischer, D. E. A. Lemes, and S. G. Canniatti-Brazaca. 2016a. Influence of natural and synthetic carotenoids on the color of egg yolk. *Scientia Agricola* 73:234-242.
- Spada, F. P., M. M. Selani, A. A. D. Coelho, V. J. M. Savino, A. A. Rodella, M. C. Souza, F. S. Fischer, D. E. A. Lemes, and S. G. Canniatti-Brazaca. 2016b. Influence of natural and synthetic carotenoids on the color of egg yolk. *Scientia Agricola* 73:234-242.
- Sun, Q., Y. Guo, S. Ma, J. Yuan, S. An, and J. Li. 2012. Dietary mineral sources altered lipid and antioxidant profiles in broiler breeders and posthatch growth of their offsprings. *Biological Trace Element Research* 145:318-324.
- Surai, A., P. Surai, W. Steinberg, W. Wakeman, B. Speake, and N. Sparks. 2003a. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* 44:612-619.
- Surai, A. P., P. F. Surai, W. Steinberg, W. G. Wakeman, B. K. Speake, and N. H. C. Sparks. 2003b. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* 44:612-619.
- Surai, P., B. Speake, and N. Sparks. 2001a. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. *The Journal of Poultry Science* 38:1-27.
- Surai, P. F. 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, UK 5-9.
- Surai, P. F. 2012a. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 1. *World's Poultry Science Journal* 68:465-476.
- Surai, P. F. 2012b. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 2. *World's Poultry Science Journal* 68:717-726.
- Surai, P. F., B. K. Speake, and N. H. C. Sparks. 2001b. Carotenoids in Avian Nutrition and Embryonic Development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. *The Journal of Poultry Science* 38:117-145.

- Tunio, M. T., S. Yang, Z. Chen, M. Zubair, J. Qiu, Y. Zhao, G. Chen, Y. Chow, and A. Chen. 2013. Effect of pigments with different origins on pigmentation and performance of broilers. *Pakistan Journal of Zoology* 45:1715-1725.
- Urso, U. R., F. Dahlke, A. Maiorka, I. J. Bueno, A. F. Schneider, D. Surek, and C. Rocha. 2015. Vitamin E and selenium in broiler breeder diets: Effect on live performance, hatching process, and chick quality. *Poultry Science* 94:976-983.
- Xia, S., C. Tan, Y. Zhang, S. Abbas, B. Feng, X. Zhang, and F. Qin. 2015. Modulating effect of lipid bilayer-carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128:172-180.
- Zhang, W., K. Zhang, X. Ding, S. Bai, J. Hernandez, B. Yao, and Q. Zhu. 2011a. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. *Poultry Science* 90:1516-1522.
- Zhang, W., K. Y. Zhang, X. M. Ding, S. P. Bai, J. M. Hernandez, B. Yao, and Q. Zhu. 2011b. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. *Poultry Science* 90:1516-1522.

V. Associação da cantaxantina + 25-hidrocoleciferol no desempenho de incubação, fertilidade e na qualidade da progênie em codornas europeias

Resumo:

O objetivo foi avaliar os efeitos da Cantaxantina (Cx) associada ao metabólito 25-hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃), sobre desempenho de incubação e reprodução em codornas europeias. A fertilidade foi analisada em três métodos de análises. Foram utilizados 440 reprodutores de codornas europeias distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco dietas e oito repetições de quatro fêmeas e dois machos. As dietas experimentais foram: (0) dieta basal (vitamina D₃ 2000 UI); (3) dieta basal + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) dieta basal + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃). O desempenho de incubação foi analisado com 32 e 38 semanas de idade, e foram diferentes em relação as idades. Houve efeito foi quadrático crescente da dieta sobre a eclodibilidade (P<0,001), eclodibilidade de ovos férteis (P=0,004) e fertilidade (P=0,032). E, efeito de modo quadrático decrescente sobre a infertilidade (P=0,032) e mortalidade de ovos férteis (P=0,004). Com 38 semanas, houve efeito quadrático crescente sobre a eclodibilidade (P<0,001), eclodibilidade total de ovos férteis (P=0,003) e fertilidade (P=0,043). E, houve influência de modo quadrático decrescente sobre a infertilidade (P=0,043) e mortalidade de ovos férteis (P=0,043). Na análise da qualidade do pintinho o comprimento (0,021 e 0,040) e o escore de Pasgar[®] (P=0,016 e P=0,017) foram influenciados de modo quadrático. Na análise da membrana vitelínica houve interação (P<0,001) entre os dias de coletado dos ovos após a cópula e os níveis de Cx+25-(OH)D₃ e efeito isolado da idade (P<0,001). Para o número de espermatozoides nas membranas vitelínicas houve interação quadrática entre os dias de coleta dos ovos após a cópula e os níveis de Cx+25-(OH)D₃ e efeito isolado da idade (P<0,001). Nos ovos incubados por 72 horas, houve efeito quadrático dos dias de coleta dos ovos após a cópula e dos níveis de Cx+25-(OH)D₃. Concluindo que o nível estimado de 5,90 ppm de Cx + 2714 UI de 25-(OH)D₃ proporcionou maiores índices de eclodibilidade total e de ovos férteis, de fertilidade e reduziu a mortalidade e a infertilidade, melhorando a viabilidade dos reprodutores e preservando os espermatozoides dos reprodutores até a 40ª semana e também aumentou o comprimento e o escore de Pasgar[®] dos pintinhos com 1 dia de idade, melhorando a qualidade da progênie.

Palavras-chave: Fertilidade, eclosão, escore de Pasgar[®], carotenoides

V. Effect of canthaxanthin supplementation on incubation performance, fertility and offspring quality

ABSTRACT:

The objective was to evaluate the effects of Cx associated with the metabolite 25-(OH)D₃, on hatching performance, which was evaluated by hatching, hatching of fertile eggs, fertile egg mortality, fertility and infertility. Fertility was analyzed in three methods of analysis. A total of 440 quail breeders were distributed in a completely randomized experimental design with five treatments and eight replicates, four females and two males. The experimental diets were: (0) basal diet (vitamin D₃ 500,000 IU); (3) basal diet + (3 ppm Cx + 1380 IU 25-(OH)D₃); (6) basal diet + (6 ppm Cx + 2,760 IU 25-(OH)D₃); (9) basal diet + (9 ppm Cx + 4,140 IU 25-(OH)D₃); (12) basal diet + (12 ppm Cx + 5,520 IU 25-(OH)D₃). In broiler incubation performance at 32 weeks the effect was quadratic on hatchability (P <0.001), hatchability of fertile eggs (P = 0.004) and fertility (P = 0.032). (P = 0.032) and mortality of fertile eggs (P = 0.004). At 38 weeks, there was an increasing quadratic influence on hatchability (P <0.001), total hatchability of fertile eggs (P = 0.003) and fertility (P = 0.043). And, there was a decreasing quadratic influence on infertility (P = 0.043) and fertile egg mortality (P = 0.043). In the chick quality analysis length (0.021 and 0.040) and quality (P = 0.016 and P = 0.017) were influenced in a quadratic way. In the analysis of the yolk membrane there was interaction (P <0.001) between the days of collection of the eggs after copulation and the levels of Cx+25-(OH)D₃ and isolated effect of age (P <0.001). In the number of spermatozoa, there was a quadratic interaction between the days between the collected eggs after the intercourse and the levels of Cx+25-(OH)D₃ and isolated effect of age (P <0.001). In the incubated eggs for 72 hours, there was a quadratic effect of the egg collection days after copulation and Cx+25-(OH)D₃ levels. We concluded that the estimated level of 5.90 ppm Cx + 2714 IU of 25- OH-D₃ provided higher rates of total hatchability and fertile eggs, fertility and reduced mortality and infertility, improving breeding viability and preserving breeding spermatozoa up to the 40th week, and also increased the length and Pasgar[®] score of Chicks with 1 day of age, improving the quality of the progeny.

Key words: Fertility, Hatching, Pasgar[®] score, Carotenoids.

1. Introdução

No sistema de criação de reprodutores de codornas normalmente os machos e as fêmeas consomem a mesma dieta. Nas fêmeas a exigência de vitamina D e de nutrientes com propriedades antioxidantes (carotenoides, vitamina E e C, etc) são maiores devido à formação do ovo (casca, albúmen e gema), fertilização do ovócito e transferência de nutrientes da dieta para a gema do ovo. Para a fertilização do ovócito as aves são capazes de armazenar espermatozoides por longos períodos, após à copula nos túbulos de estocagem de espermatozoides, localizadas principalmente na junção útero vaginal (Bakst, 1981). Sendo necessário um sistema específico para proteger os espermatozoides, uma vez que estes são compostos em grande parte por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Acredita-se que nutrientes com propriedade antioxidantes, como os carotenoides que removem radicais livres ($\cdot O_2$), as vitaminas C e a E e, também as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CA) possam ser secretadas nesta região, para manter as características dos espermatozoides e aumentar a fertilidade (Breque et al., 2006; Surai et al., 2006).

Dentre os carotenoides, a Cx é membro do grupo das xantofilas (asthaxantina, criptoxantina, fucoxantina, etc) e é um importante pigmentante de cor vermelho-alaranjado que podem ser encontrado na natureza ou sintetizado. Em aves, pode ser depositado em vários tecidos, tais como o fígado e saco vitelínico (Surai et al., 2003). Nestes tecidos, é depositado no interior da mitocôndria e remove moléculas livres de oxigênio ($\cdot O_2$) derivas da respiração celular (Karadas et al., 2016; Karadas et al., 2005; Møller et al., 2000; Surai, 2012; Surai et al., 2016). Deste modo a Cx pode reduzir a oxidação de biomoléculas, diminuindo a formação radicais peróxidos que degradam lipídios, proteínas e DNA e assim pode comprometer o desempenho produtivo, reprodutivo, sistema antioxidante e sistema imune (Surai et al., 2016). Esses efeitos ocorrem na gema do ovo, nos tecidos embrionários e espermatozoides que contêm altas concentrações de PUFAs e durante a fase de eclosão que considerada de alto estresse oxidativo para o embrião, em função do gasto energético para eclodir e da quantidade abundante de oxigênio na atmosfera (Surai, 1999).

O desenvolvimento embrionário inicia-se após a fertilização do ovócito, formando o óvulo e nutrientes fornecidos nas dietas maternas, como por exemplo, as vitaminas lipossolúveis (D, E, A e K) e carotenoides são depositados na gema do ovo e

posteriormente transferidos pela membrana do saco vitelínico para o embrião (Schneider, 2016) Então a suplementação de carotenoides e vitaminas em dietas maternas pode influenciar no metabolismo dos reprodutores e da progênie.

A Cx exerce outras importantes funções no metabolismo, atuando na proliferação de células (Okai e Higashi-Okai, 1996; Stahl e Sies, 2003) e na reposta imune (Burton et al., 2014; Esatbeyoglu e Rimbach, 2016). A maior quantidade de Cx depositada nos tecidos embrionários pode melhorar a qualidade do pintinho no primeiro dia de vida e permanecer no metabolismo durante as primeiras semanas de vida da progênie (Surai et al., 2003). Em relação aos efeitos da Cx, foi observado maior pigmentação na gema do ovo, aumentando a concentração de carotenoides, maior capacidade antioxidante e menor mortalidade em frangos de corte (Zhang et al. (2011) e no desempenho de incubação aumentou a eclodibilidade, a fertilidade, diminuiu a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na gema do ovo na fase inicial de incubação (0 a 7 dias) (Rosa et al., 2012).

Além da Cx ser um potente removedor de radicais livres tem demonstrado ter relação com o sistema imune, sendo a ação da vitamina D e de seus metabólitos (25-(OH)D₃ e 1,25-(OH)D₃ sobre a resposta imune já bem estabelecida. Saunders-Blades e Korver (2015) demonstraram efeito do metabólito 25-(OH)D₃ sobre a produção de ovos, eclodibilidade e o sistema imune *in vitro* de pintinhos com 1 dia de vida. Que podem estar relacionados com as funções da Cx no sistema antioxidante e com as funções do metabólito 25-(OH)-D₃ no metabolismo do cálcio e fósforo em tecidos ósseos e na casca, podendo diminuir o número de ovos quebrados e disponibilizar maior quantidade de cálcio para o desenvolvimento da progênie (Bar et al., 1980).

A suplementação em dietas maternas da associação entre a Cx e o metabólito 25-(OH)D₃ pode aumentar a capacidade antioxidante (Surai, 2012) e melhorar a qualidade da casca do ovo (Ren et al., 2016a), fatores que podem aumentar a eclodibilidade e a fertilidade e reduzir a mortalidade, melhorando os índices produtivos de reprodutores em geral.

Desta forma, objetivou-se avaliar a associação da Cx+25-(OH)D₃ sobre a eclodibilidade, a fertilidade, a mortalidade e a qualidade do pintinho com um dia de vida em reprodutores de codornas europeias.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Coturnicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (CCA/UEM), localizada no Estado do Paraná (23°21'S, 52°04'W, a altitude de 564 m). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA/UEM), tendo sido aprovados para execução (7846161115).

2.1 Animais, instalação e manejo

O galpão de postura utilizado foi do tipo convencional, com cobertura de telha de barro, piso e paredes laterais de alvenaria com 1,20 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado e cortinas laterais móveis. Com duas semanas de antecedência ao início do experimento, os reprodutores foram alojados em gaiolas de arame galvanizado (25x39 cm) com nipple na parte superior e comedouro tipo calha em frente as gaiolas, para a determinação do peso corporal dos reprodutores e a produção de ovos gaiolas.

Cada gaiola foi composta por quatro fêmeas e dois machos, que foram uniformizados de acordo com o peso corporal ($292,01 \pm 17,82$ e $251,84 \pm 19,07$) e a produção de ovos. O alimento e a água foram *ad libitum* e o programa de luz adotado foram de 17 horas de luz (natural + artificial) + 7 horas de escuro. Os machos e as fêmeas receberam a mesma ração, por compartilharem a mesma gaiola. As médias de temperatura, máxima ($30,41 \pm 5,41^\circ \text{C}$) e mínima ($18,48 \pm 3,75^\circ \text{C}$) assim como de umidade, máxima ($45,36 \pm 14,55^\circ \text{C}$) e mínima ($21,93 \pm 12,14^\circ \text{C}$), foram medidas no termo higrômetro digital diariamente dentro do galpão.

Para a análise de desempenho de incubação, 240 reprodutores foram distribuídos em 8 gaiolas (unidade experimental) por dieta experimental com quatro fêmeas e dois machos e 5 repetições. Para a determinação da probabilidade de fertilidade e do número de espermatozoides por área de membrana vitelínica, foram utilizados 90 reprodutores distribuídos em gaiolas individuais, sendo nove casais por dieta experimental utilizados em duas idade (26 e 40 semanas) para avaliar o efeito da idade e da suplementação de $\text{C}_x+25\text{-(OH)D}_3$ sobre a fertilidade dos casais.

2.2 Delineamento experimental e dietas

As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com dietas e oito ou nove repetições. As dietas experimentais foram: (0) dieta basal

(vitamina D₃ 2000 UI); (3) dieta basal + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) dieta basal + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃). O fornecimento das rações experimentais iniciou 14 dias antes do início do experimento para a adaptação dos animais. As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, vitaminas, minerais e seguindo recomendações propostas por Rostagno et al. (2005) (Tabela 8).

Tabela 8. Composição centesimal, química e energética das rações experimentais contendo Cx+25-(OH)D₃ para reprodutores de codornas europeias na fase de postura.

Ingredientes %	Dietas experimentais				
	0	3	6	9	12
Milho	51,76	51,76	51,76	51,76	51,76
Farelo de Soja	37,03	37,03	37,03	37,03	37,03
Calcário	5,85	5,85	5,85	5,85	5,85
Óleo de soja	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88
Fosfato Bi cálcico	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29
Premix vit+min ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Sal comum	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
DL- Metionina (98,5 %)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
L-Lisina (76,5%)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Inerte ²	0,20	0,15	0,10	0,05	0,0
MaxiChick [®]	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Composição Calculada					
Proteína bruta %	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,850	2,850	2,850	2,850	2,850
Cálcio (%)	2,700	2,700	2,700	2,700	2,700
Cloro (%)	0,248	0,248	0,248	0,248	0,248
Fósforo Disp (%)	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Potássio (%)	0,828	0,828	0,828	0,828	0,828
Sódio	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Lys dig %	1,097	1,097	1,097	1,097	1,097
Met dig %	0,480	0,480	0,480	0,480	0,480
Met + Cys dig %	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767
Cantaxantina (mg/kg) ³	0,000	3,000	6,000	9,000	12,000
Vitamina D ₃ (UI/Kg) ³	0,000	1.380	2.760	4.140	5.520

¹Suplemento vitamínico e mineral – Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A – 2.500.000 UI; Vit. D₃ – 500.000 UI; Vit. E – 5.000 UI; Vit. B1 – 625 mg; Vit. B2 – 1.500 mg/Kg; Vit. B6 – 1.250 mg/kg; Vit. B12 – 5.000 UI; Vit. K3 – 750 mg; Pantotenato de Cálcio – 3.000 mg; Niacina – 6.000 mg/Kg; Ácido fólico - 250 mg/Kg; Biotina – 50,0 mg/Kg; Colina – 75 g/Kg; Antioxidante (Butil Hidroxi Tolueno – BHT) – 1.000 mg/Kg; Zinco – 13 g/ Kg; Ferro – 13 g/Kg; Manganês – 15 g/Kg; Cobre – 3.000 mg/Kg; Cobalto – 50 mg/Kg; Iodo – 250 mg/Kg; Selênio – 63 mg/Kg; Veículo Q.S.P. (Caulim) – 1.000 g/Kg. ²Inerte–Caulim;

³MaxiChick[®]: cantaxantina (6 mg/Kg) + 25-hidroxicoilecalciferol (2.760 UI/Kg) - DSM, São Paulo – SP.

Para manter as dietas isoenergéticas e isoproteicas foi incluído na dieta basal o inerte, sendo substituído conforme a adição da $Cx+25-(OH)D_3$ nas dietas experimentais. Os níveis de suplementação de vitamina D_3 foram atendidos com o uso do premix vitamínico e o acréscimo do metabólito $25-(OH)D_3$ ocorreu em associação com a Cx por meio do fornecimento de um produto comercial.

2.3 Desempenho de incubação

Após 13 semanas em que as aves estavam recebendo as dietas experimentais, com 32 e 38 semanas foi avaliado o desempenho de incubação. Os ovos de cada unidade experimental foram colhidos por 5 dias e armazenados em sala refrigerada ($20^{\circ}C$). Os ovos foram incubados em incubadora automática a 60% de umidade e $37,4^{\circ}C$, com viragem automática. Decorridas 348 horas de incubação, os ovos foram transferidos para a câmara de eclosão com temperatura de $37,0^{\circ}C$, umidade de 70% por mais 56 horas.

Após a eclosão, a eclodibilidade em relação aos ovos férteis, a mortalidade de ovos férteis, a fertilidade e a infertilidade foram determinadas pelas seguintes fórmulas:

Eclodibilidade: $((\text{número de pintinhos nascidos}/\text{número total de ovos}) \times 100)$.

Eclodibilidade em relação aos ovos férteis: $((\text{número de pintinhos nascidos}/\text{número total de ovos férteis}) \times 100)$.

Mortalidade de ovos férteis: $((\text{número de pintinhos não eclodidos}/\text{número de ovos férteis}) \times 100)$.

Fertilidade: $((\text{número de ovos eclodidos} + \text{número de pintinhos não eclodidos}/\text{número de ovos totais}) \times 100)$

Infertilidade: $((\text{número de brancos}/\text{número de ovos totais}) \times 100)$.

Ao final da eclosão os ovos foram abertos e determinou-se: a percentagem de fertilidade, mortalidade total que foi analisada por meio do embriodiagnóstico. A mortalidade embrionária foi classificada em: mortalidade embrionária inicial (1 a 5 dias), mortalidade embrionária média (6 a 11 dias) e mortalidade embrionária final (12 a 17 dias) e ovos com casca bicada e quebrada, mas que não eclodiram ao término do período de incubação e que ainda estavam vivos.

2.4 Qualidade do pintinho

A qualidade dos pintinhos eclodidos ($n = 40$ pintinhos/dietas experimentais) foi analisada segundo o escore de Pasgar[®] (reflexo, umbigo, pernas, bico e barriga), que confere nota de 1 a 10 a cada ave, descontando um ponto a cada irregularidade observada.

E foram mensurados o peso e o tamanho de cada ave, que foi medido da falange média até o bico sobre uma fita métrica.

2.5 *Análise da interação espermatozoide-ovo*

Foram utilizados nove casais, dispostos em gaiolas individuais (25x39 cm) recebendo as dietas experimentais durante todo o período. As fêmeas ficaram isoladas dos machos por pelo menos 15 dias, para não ter células espermáticas vivas no oviduto. O macho foi colocado na gaiola da fêmea por 24 horas e os ovos colocados a partir deste período, foram coletados diariamente por 10 dias e armazenados a 4°C para análise da interação espermatozoide-ovo.

A fertilidade foi estimada pela morfologia do disco germinativo. Os ovos foram quebrados e considerados férteis ou inférteis e o período de fertilidade dos ovos ao longo do tempo foi estimado após a remoção do macho. Os ovos coletados foram analisados para a fertilidade e a interação espermatozoide-ovo segundo (Kosin, 1945). Para tanto, fragmentos de 1,5 cm² da membrana perivitelínica sobre o disco germinativo foram cortados e lavados em solução de NaCl 1% para remoção do vitelo. Estes fragmentos foram acondicionados sobre uma lâmina histológica e foram tratados com 5 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidroclorido, solução a 5 µmol), para identificação do núcleo dos espermatozoides por marcação do DNA (Wishart, 1997). Os fragmentos foram cobertos por uma lamínula, isolados com esmalte de unha e analisadas em microscópio de fluorescência.

Cada membrana foi analisada em 10 campos de microscópio, sob objetiva de 10x e os espermatozoides contados em uma área de 7,50mm².

2.7 *Análise estatística*

O modelo estatístico adotado foi o de regressão múltipla, sendo adicionado as interações dos parâmetros de regressão com a variável independente:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{p-1} x_{p-1} + \varepsilon$$

Em que:

\hat{Y} = Variável dependente

x_1, x_2, \dots, x_{p-1} = Variáveis independentes

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{p-1}$ = parâmetros da regressão

ε = Erro aleatório

Nas análises de desempenho de incubação, da mortalidade embrionária e da qualidade do pintinho, a variável independente foi a idade e os parâmetros de regressão foram os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$, a interação (5x2) entre a $C_{x+25}-(OH)D_3$ x Idade, foram adicionados no modelo.

Com relação a análise de probabilidade de fertilidade e do número de espermatozoides em função da interação espermatozoide-ovo, a variável independente foi a idade, enquanto os parâmetros da regressão foram os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ e os dias de coletas de ovos após a cópula. Para a probabilidade de fertilidade a interação (5x12x2) entre a $C_{x+25}-(OH)D_3$ x Idade, $C_{x+25}-(OH)D_3$ x Dias após a cópula, Idade x Dias após a cópula e $C_{x+25}-(OH)D_3$ x Idade x Dias após a cópula foram adicionados ao modelo.

Na análise dos dados da fertilidade na fase inicial de incubação (72 horas), os parâmetros da regressão foram os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ e os dias de coleta dos ovos após a cópula, a interação (5x10) entre a $C_{x+25}-(OH)D_3$ x Dias após a cópula foi adicionada ao modelo .

As variáveis de qualidade do pintinho (peso, comprimento e qualidade do pintinho) foram analisados pela análise de variância (ANOVA) a 5% de significância e os polinômios foram desdobrados na análise de regressão utilizando o procedimento de modelos lineares generalizados (GLM).

Entretanto, as análises de probabilidade de desempenho de incubação, fertilidade em função da interação espermatozoide-ovo, fertilidade em função do número de espermatozoides na membrana perivitelínica, número de espermatozoides x dias de coleta após a cópula e da fertilidade na fase inicial de incubação (72 horas) por não possuírem distribuição normal foram analisadas no procedimento GENMOD com distribuição BINOMIAL, GAMMA e POISSON, conforme o comportamento dos dados, estes procedimentos estão descritos abaixo. Foi utilizado o procedimento PREDICTED para diferenciar as idades pelo teste de quadrados mínimos ($P > \chi^2$) a 5% de significância.

Os resultados do desempenho de incubação, da probabilidade de fertilidade devido a interação espermatozoide-ovo, da probabilidade de fertilidade analisada na fase inicial da incubação (até 72horas), foram analisados na distribuição binomial com melhor ajustamento dos dados no link LOGIT, onde $LOGIT = \exp(\beta) / 1 + \exp(\beta)$.

Os dados do número necessário de espermatozoide (sptz/mm²) fixados na membrana vitelínica para que o ovo fosse fértil foram analisados em função dos dias após

a cópula. E, da probabilidade de fertilidade em relação aos dias após cópula foram analisados na distribuição GAMMA com função link INVERSO, onde $INVERSO = 1/\beta$.

Para os resultados da análise do número de espermatozoides/mm² na membrana vitelínica sobre a região do disco germinativo e da análise de mortalidade embrionária foram analisados na distribuição binomial com o melhor ajustamento com função POISSON, em que $POISSON = \exp(\beta)$. Nos dados da mortalidade embrionária, foi utilizado link LOG, com o procedimento PREDICTED para diferenciar as idades pelo teste de quadrados mínimos ($P > \text{Chisq}$) a 5% de significância. Todos os procedimentos estatísticos deste estudo foram realizados no programa SAS version 9.0 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina) e foi adotado a significância de 5 %.

3. Resultados e discussões

Ao longo do período experimental (26 a 42 semanas) o desempenho de incubação e reprodutivo foi analisado na 32^a e 38^a semana. Não houve interação entre a idade e os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ ($P > 0,05$), efeito da idade sobre a fertilidade, infertilidade, qualidade do pintinho e na fase média da mortalidade embrionária ($P > 0,05$). Entretanto, ocorreu interação das idades dos reprodutores com a fase inicial ($P < 0,003$) e ovos bicados ($P = 0,002$) na mortalidade embrionária (Tabela 9).

Desdobrando a interação foi possível observar que tanto com 32 quanto 38 semanas a mortalidade inicial e de ovos bicados foi influenciada de forma quadrática decrescente, pelos níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$, com aumento dos índices após o ponto de inflexão (Tabela 9). A interação entre a idade e os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ ocorreu nos reprodutores com 32 semana de idade com maior redução dos índices de mortalidade e de ovos bicados quando comparados com os reprodutores de 38 semanas de idade (Tabela 10)

Em relação a suplementação de $C_{x+25}-(OH)D_3$ sobre o desempenho de incubação, houve efeito quadrático crescente dos níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ sobre a eclodibilidade ($P < 0,001$), estimados aos níveis de 5,57 + 2562, 5,82 + 2677 e 5,34 + 2456 (ppm de $C_x + UI 25-(OH)D_3$), respectivamente. Houve influência de modo quadrático decrescente sobre a infertilidade ($P < 0,001$) e mortalidade de ovos férteis ($P = 0,003$) em função das dietas com 25-(OH)D₃ (Tabela 9).

Tabela 9. Desempenho de incubação e mortalidade embrionária de codornas europeias com 32 e 38 semanas suplementadas com Cx+25-(OH)D₃ (n=240)

Idade	Eclosão Total (%)	Fertilidade (%)	Infertilidade (%)	Eclosão Férteis	Mortalidade Férteis	Mortalidade Embrionária (%)				Qualidade do pintinho			
						Inicial	Média	Final	Bicados	Peso (g)	Comprimento	Pasgar®	
32 semanas	71,24 A	88,02	12,88	80,67 A	19,33 B	2,01	3,92 B	14,05 A	4,00 A	8,37	11,64 B	9,29	
38 semanas	62,76 B	87,12	11,98	71,05 B	28,94 A	1,45	4,54 A	10,27 B	7,92 B	8,48	12,07 A	9,28	
Dietas ⁴													
0	57,76	83,11	16,89	68,38	31,61	5,00	4,17	16,55	5,88	8,26	11,59	8,98	
3	76,20	94,68	5,32	80,25	19,75	0,00	1,05	12,12	6,58	8,63	12,01	9,38	
6	79,60	92,98	7,03	85,62	14,39	0,66	3,49	7,20	3,05	8,39	11,99	9,51	
9	61,45	84,07	15,94	73,14	26,85	1,12	6,34	13,24	6,15	8,35	11,85	9,28	
12	58,64	83,01	16,99	70,96	29,05	4,04	5,80	11,26	7,95	8,49	11,84	9,29	
EPM ¹	1,931	1,137	1,370	1,558	1,558	0,631	0,760	1,143	1,010	0,080	0,049	0,420	
Fontes de variação						P valor							
Idade	0,001	0,782	0,782	0,003	0,003	0,124	0,231	0,030	<0,001	0,456	<0,001	0,985	
Dietas	<0,001	0,002	0,002	0,013	0,013	0,001	0,029	<0,001	0,163	0,477	0,001	<0,001	
Dietas ²	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	0,003	0,004	0,659	<0,001	0,018	0,544	0,002	<0,001	
Idade x Dieta	0,354	0,846	0,846	0,868	0,868	0,003	0,899	0,306	0,002	0,850	0,259	0,818	
β estimados ³										Cx	25-(OH)D ₃	PI ²	
Eclosão total=0,031+0,301Dietas-0,027Dietas ²										5,57	2562	86,99	
Eclosão de férteis= 0,377+0,299Dietas-0,0257Dietas ²										5,82	2677	77,50	
Mortalidade de férteis= -0,377-0,299Dietas+0,0257Dietas ²										5,82	2677	22,50	
Fertilidade=1,742+0,236Dietas-0,022Dietas ²										5,34	2456	91,49	
Infertilidade=-1,742-0,236Dietas+0,022Dietas ²										5,34	2456	8,51	
Média = 0,845+0,094Dietas										5,29	2433	0,335	
Final = 2,922-0,131Dietas+0,009Dietas ²										-	-	-	
Equações										R ²			
Escore Pasgar® = 9,02+0,125Dietas-0,009Dietas ²										0,78	6,95	3197	9,45
Comprimento = 11,862+0,104Dietas-0,007Dietas ²										0,89	6,06	2788	12,24

¹ EPM = Erro padrão da média;² PI = Ponto de inflexão;³ β estimados= foram utilizados para estimar as probabilidades pela seguinte fórmula: Probabilidade=(exponencial(β))/(1+exponencial(β))*100.

*Letras maiúsculas representam as diferenças entre as médias das idades que foram detectadas (P<0,05) pelo teste de médias do quadrados mínimos.

⁴ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃+ (6 ppm de Cx +2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx +5.520 UI 25-(OH)D₃)

Tabela 10. Desdobramento da interação da Idade e dieta na fase inicial e em ovos bicados que não eclodiram.

Dieta	Fase inicial (%)		Bicados (%)	
	32 semanas	38 semanas	32 semanas	38 semanas
0	6,76	2,45	5,44	6,32
3	0,69	0,70	3,84	9,87
6	0,17	0,49	0,95	4,80
9	0,22	1,81	4,43	7,46
12	0,35	8,04	3,90	11,46

* Diferenças entre as médias das idades foram detectadas ($P < 0,05$) pelo teste de médias do quadro mínimo.

¹ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃ + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃).

A mortalidade embrionária foi influenciada na fase inicial e final de modo quadrático decrescente ($P < 0,004$; $P < 0,001$) e na fase média aumentou linearmente ($P < 0,029$) em função da suplementação de Cx+25-(OH)D₃.

Neste estudo, a suplementação de Cx+25-(OH)D₃ aumentou de forma quadrática a eclosão total, em razão dos maiores índices de fertilidade e eclosão de ovos férteis e da redução da mortalidade.

Isto provavelmente ocorreu por causa da maior quantidade de Cx+25-(OH)D₃ no metabolismo (fígado, tecidos adiposos e útero) dos reprodutores e na gema do ovo que, posteriormente foi transferida para os tecidos corporais do embrião que são ricos em PUFA's e são suscetíveis a degradação (Surai et al., 2003).

A Cx pode ter aumentado à capacidade de remoção de radicais livres e reduzido à suscetibilidade a degradação lipídica da gema do ovo e do embrião, a Cx integra o sistema antioxidante em conjunto com as vitaminas C e E e com as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CA) (Fotina et al., 2013).

Um sistema antioxidante eficiente durante o período de incubação é essencial para o desenvolvimento embrionário, quando em altas concentrações os radicais livres causam danos nas biomoléculas e podem comprometer o desempenho produtivo, reprodutivo, sistema antioxidante e sistema imune (Surai et al., 2016). O efeito quadrático para as variáveis demonstrou que a partir de 6 ppm de Cx + 2760 UI 25-(OH)D₃ esses efeitos tornam-se negativos para o desempenho de incubação.

Durante o processo de eclosão, os pintinhos estão sob alto estresse oxidativo, por estar saindo de um ambiente com pouco oxigênio para um ambiente rico em oxigênio, além do gasto energético elevado que teve para bicar, quebrar e sair de dentro do ovo.

Parte da quantidade da Cx transferida para os tecidos corporais do embrião é armazenada nos tecidos corporais e pode aumentar a proteção contra a peroxidação lipídica, durante a eclosão e primeiros dias de vida, e possivelmente, beneficie o sistema imune da progênie (Surai et al., 2006; Surai et al., 2016). Avaliando a suplementação de 6 ppm de Cx para reprodutores de frango de corte sobre o status antioxidante nos tecidos dos pintinhos com um dia de vida foi observado menor quantidade MDA no fígado do pintinho com 1 dia de vida (Robert et al. 2008) e aumento da capacidade antioxidante no plasma (Johnson-Dahl et al. 2016).

Em relação a redução de forma quadrática da mortalidade de ovos férteis encontradas neste estudo, ocorreu principalmente, pela redução de modo quadrático da mortalidade embrionária durante a fase inicial ($P=0,004$) e final ($P<0,001$) e de modo linear na fase média ($P=0,029$). E, também dos pintinhos que bicaram o ovo e não eclodiram ($P=0,018$) em função das dietas de $Cx+25-(OH)D_3$. A redução da mortalidade durante o desenvolvimento embrionário pode ter relação a ação do metabólito $25-(OH)D_3$ com o metabolismo do cálcio e do fósforo e das propriedades antioxidantes da Cx que podem ter beneficiado o desenvolvimento embrionário.

A vitamina D_3 e o metabólito $25-(OH)D_3$ atuam principalmente na absorção e deposição de cálcio, a quantidade transferida para a gema do ovo tem alta relação ($r=0,99$ e $r=0,94$, respectivamente) com a quantidade fornecida nas dietas maternas (Mattila et al., 1999). O metabólito $25-(OH)D_3$ possui maior absorção e longa vida no metabolismo, fatores que podem aumentar a quantidade de cálcio, melhorando a resistência e compactação da casca do ovo (Bar et al., 1980). Para um desenvolvimento embrionário adequado, cascas com maior teor de cálcio, mais compactas e resistentes são essenciais, pois melhoram o mecanismo de proteção do embrião contra infecções, previnem a perda de água e aumentam a quantidade de cálcio para o embrião utilizar durante o desenvolvimento ósseo.

Menores índices de mortalidade embrionária e maior atividade antioxidante no primeiro dia de vida, após a eclosão de pintinhos oriundos de reprodutores que foram suplementados com Cx, foi descrito por Rosa et al. (2012) e Zhang et al. (2011), que em parte provavelmente ocorreu pela ação da Cx no sistema antioxidante.

Em relação aos efeitos da vitamina D sobre a mortalidade, quando não foi fornecida em doses adequadas a mortalidade embrionária aumentou (Mottaghitlab et al., 2013; Soares et al., 1979). Pesquisando os efeitos da suplementação dos metabólitos ($1-25-OH-2D_3$ ou $1-\alpha-25-(OH)D_3$) associados ou não a vitamina D_3 em dietas de frango de

corde, houve maior mortalidade embrionária quando os metabólitos não foram associados a vitamina D₃ (Soares et al., 1979; Sunde et al., 1978). Dentre os metabólitos da vitamina D fornecidos em dietas de reprodutores de frango de corte somente o metabólito 25-(OH)D₃ apresentou os mesmos índices para mortalidade embrionária quando comparada a dietas com Vitamina D₃ (Abdulrahim et al., 1979).

Estas pesquisas indicam que para melhores índices de mortalidade embrionária, a associação entre vitamina D e o metabólito 25-(OH)D₃ em níveis ideais é essencial. Entretanto, o nível de vitamina D₃ (200 UI) em conjunto com os níveis de 25-(OH)D₃ acima de 2700, afetaram negativamente a eclodibilidade, fertilidade e mortalidade dos ovos férteis. Isto pode ter ocorrido por causa dos elevados níveis de 25-(OH)D₃, que podem ter causado excesso de 1,25-OH-2D₃, hormônio que pode causar toxicidade e prejudicar a calcificação, falhas renais e hipercalcêmica (Pande et al., 2015).

Na avaliação da qualidade do pintinho, não houve efeito da idade sobre o peso do pintinho ($P > 0,05$). Entretanto, houve resposta quadrática crescente ($P = 0,016$ e $P = 0,017$) do escore de Pasgar[®] e comprimento do pintinho de 1 dia de idade ($P < 0,001$ e $P = 0,002$) (Tabela 9). Resultados semelhantes foram encontrados por Rosa et al. (2016), que não observaram efeito da dieta à base de milho, suplementada com 6 ppm de Cx para reprodutores (Cobb500, de 45 a 67 semanas) sobre o peso ao eclodir de pintinhos de frango. O maior comprimento dos pintinhos demonstra que o desenvolvimento embrionário ocorreu adequadamente e que pode ter consumido mais vitelo aumentando seu tamanho e melhorando o escore de Pasgar[®] (viabilidade, umbigo, pernas, abdômen e bico) que é um método conceituado para indicar a qualidade dos pintinhos após a eclosão. Estas duas variáveis de qualidade do pintinho são importantes, pois influenciam o desempenho produtivo durante as primeiras semanas de vida dos pintinhos.

Os resultados deste trabalho e a hipótese supracitada, são embasados em pesquisas já realizadas, que de modo geral, avaliaram o desempenho de incubação e sistema antioxidante nos reprodutores e na progênie com a suplementação de Cx+25-(OH)D₃ (6 ppm de Cx + 2700 UI 25-(OH)D₃) ou somente com a Cx (6 ppm) adicionados em dietas à base de milho, soja, trigo e com substituição de milho por sorgo (Johnson-Dahl et al., 2016; Ren et al., 2016 a,b,c; Robert et al., 2008; Rosa et al., 2016; Rosa et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Diversas pesquisas investigaram os efeitos da suplementação de Cx em 6 ppm em dietas maternas na atividade antioxidante. Surai (2012b) relatou que o aumento da concentração de Cx no tecido corporal do embrião aumenta a remoção de radicais livres

e de peróxidos, a reciclagem da vitamina C e da vitamina E, minimizando o estresse oxidativo no metabolismo durante e após eclosão. Este relato teve como base um estudo com suplementação de diferentes níveis de Cx (0,6,12,24 ppm) para reprodutores e frango de corte em que foi encontrado maior concentração de Cx no fígado que diminuiu a oxidação do α -tocoferol no fígado de pintinhos de frango de corte com um e sete dias de vida e como consequência a peroxidação lipídica diminuiu (Surai et al., 2003).

Investigando os efeitos da suplementação de dietas com 6 ppm para reprodutores de frangos de corte com 47 semanas de idade, houve aumento da capacidade antioxidante no soro sanguíneo dos reprodutores e na gema do ovo, a mortalidade reduziu de 4 % para 0 % de pintinhos (Zhang et al. 2011). Já Rosa et al. (2012) encontraram menor quantidade de malonaldeído na gema de ovos armazenados por 4, 8 e 12 dias e em ovos que foram armazenados por quatro dias e incubados durante sete dias, entretanto não verificaram diferença entre a dieta controle e a dieta com 6 ppm de Cx de reprodutores da linhagem Coob 500. Os autores também observaram aumento da eclodibilidade de ovos férteis e fertilidade enquanto houve redução da mortalidade embrionária, resultando em maior taxa de eclodibilidade total. Em referência a mortalidade embrionária, os autores descreveram que a Cx foi mais eficiente em reduzir a mortalidade embrionária com 48 horas, 15 e 21 dias de incubação.

O efeito da idade sobre os reprodutores está associado à redução da eclodibilidade de ovos férteis, da produção de ovos, do peso do ovo e da mortalidade na fase final de incubação em função da idade do macho com 270 dias de vida, quando comparados a reprodutores com 140 dias (Santos et al., 2015), entretanto não observaram efeito sobre a fertilidade. Os mesmos autores avaliando a interação dos espermatozoide-ovo e a fertilidade, observaram que a idade das fêmeas alterou a quantidade de espermatozoides fixados na membrana vitelínica, depois de oito dias da cópula (Santos et al., 2013) e sugeriram que a idade da fêmea interfere diretamente na manutenção da fertilidade em codornas europeias.

Além da redução dos espermatozoides a idade está associada deterioração da qualidade do sêmen (Bramwell et al., 1996), por causa da redução do volume de sêmen ejaculado (Zhang et al., 1999) da concentração espermática (Sexton et al., 1989) e da capacidade dos espermatozoides em penetrar na membrana perivitelínica (Bramwell et al., 1996). E, com a redução da capacidade antioxidante das fêmeas em função da idade, com menor atividade antioxidante, os espermatozoides armazenados nas glândulas do trato reprodutivo ficam expostos ao processo de oxidação (Surai et al., 1998).

Neste experimento, a fertilidade e o número de espermatozoides sobre a membrana perivitelinica foram avaliados com 26 e 40 semanas. Os ovos obtidos dos casais de codornas europeias analisados, permitiram determinar que com 3 sptz/mm² na membrana vitelínica sobre o disco germinativo a probabilidade é de 97 % do ovo ser fértil e entre o quinto e oitavo dia após a cópula o número de sptz encontrado foi maior que a quantidade estabelecida para o ovo ser fértil (Figura 4).

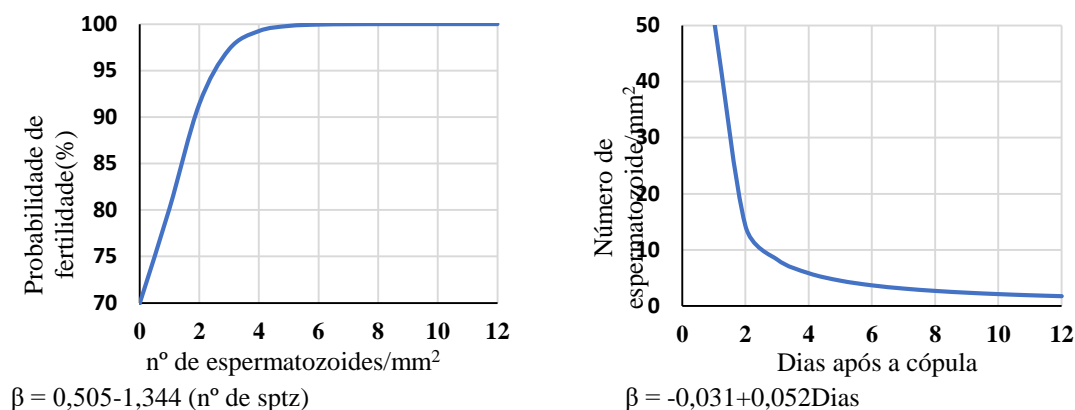


Figura 4 - Probabilidade de fertilidade de reprodutores de codornas europeias em função do número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica (sptz/mm²) sobre o disco germinativo. E, análise do número de espermatozoides (sptz/mm²) fixados na membrana vitelínica em função dos dias de coleta dos ovos após a cópula de reprodutores de codornas europeias. Probabilidade de fertilidade (β) = $1/(\beta)$; Número de espermatozoides (β) = $\exp(\beta)$

Com relação as análises de probabilidade de fertilidade e número de espermatozoides em função da interação espermatozoide-ovo na membrana vitelínica não houve influência da interação entre idades e dias de coleta dos ovos após a cópula x Dietas.

Na análise da probabilidade de fertilidade analisada em função do número de espermatozoides (sptz/mm²) fixados na membrana vitelínica sobre o disco germinativo de reprodutores com 26 e 40 semanas, houve efeito ($P < 0,05$) da idade sobre a probabilidade de fertilidade. Foi identificada interação quadrática decrescente entre os níveis de Cx+25-(OH)D₃ e os dias após a cópula ($P < 0,05$) nas duas idades analisadas (26 e 40 semanas) (Figura 5).

A maior probabilidade de fertilidade (99,99 %) foi estimada no nível de 8,69 ppm de Cx + 3997 UI 25-(OH)D₃ no segundo dia após a cópula. Esta interação indica que a suplementação do nível estimado de Cx+25-(OH)D₃ no dia correto após a cópula aumenta a probabilidade de fertilidade em reprodutores de codornas europeias com 26 e 40

semanas de idade. Níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ reduziram a probabilidade de fertilidade após o quinto dia de cópula dos reprodutores com 26 e 40 semanas de idade.

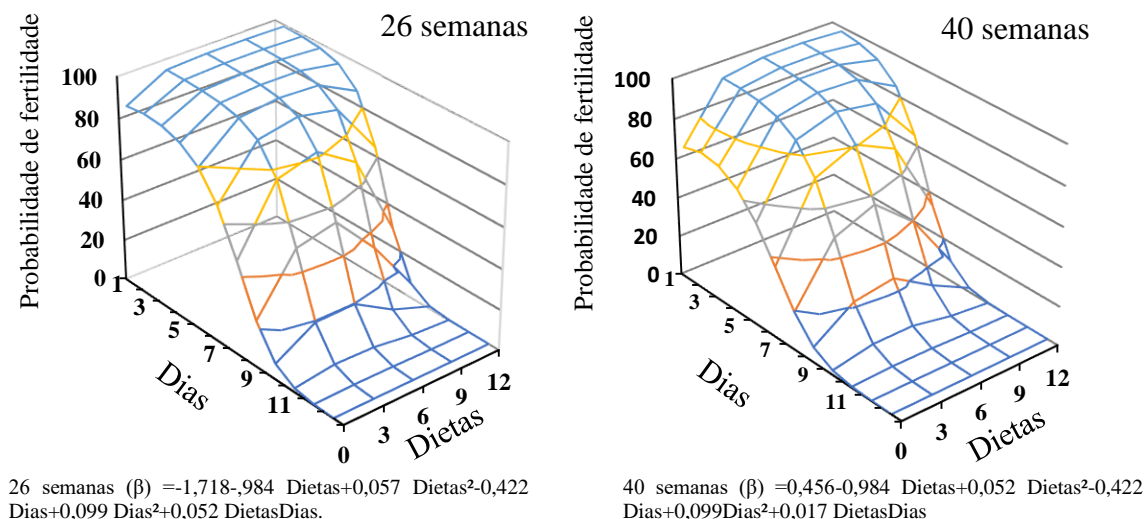


Figura 5- Probabilidade de fertilidade de reprodutores com 26 e 40 semanas de idade analisada pelo número de espermatozoides (sptz/mm²) fixados na membrana vitelínica sobre o disco germinativo em função dos dias após a cópula.

$$\text{Probabilidade de fertilidade} = \frac{\exp(\beta)}{1 + \exp(\beta)}$$

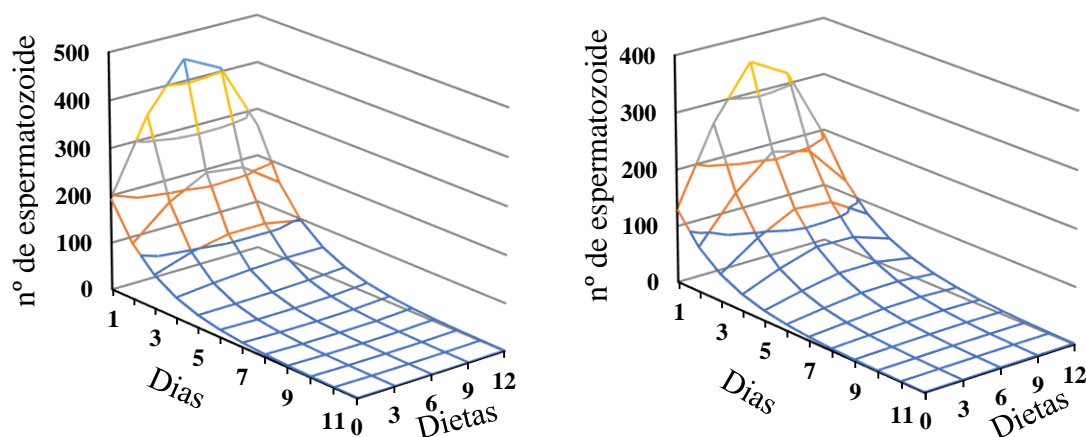
Nos reprodutores com 26 semanas, suplementados com $Cx+25-(OH)D_3$, a probabilidade de fertilidade estava entre 80 % e 100% até o sétimo dia após a cópula, com exceção do nível de 12 ppm + 5520 UI 25-(OH) D_3 , que decaiu para 60 a 80 % no quinto dia após a cópula. Enquanto no nível 0, a probabilidade de fertilidade diminuiu para 60 a 80 % no quarto dia após a cópula. A maior probabilidade de fertilidade dos reprodutores suplementados com $Cx+25-(OH)D_3$ diminuiu para 0 a 20 % somente no dia 9 após a cópula (Figura 5).

Neste período, os ovos já não eram férteis (Figura 4). Já com 40 semanas, os reprodutores suplementados com $Cx+25-(OH)D_3$ mantiveram a probabilidade de fertilidade entre 80 a 100 % até o quinto dia após a cópula. Já no nível 0, a probabilidade de fertilidade estava entre 60 a 80 % no primeiro dia após a cópula e no quarto dia diminuiu para 40 a 60 %. A probabilidade de fertilidade dos reprodutores suplementados com $Cx+25-OH D_3$ diminuiu para 0 a 20 % somente no oitavo dia após a cópula (Figura 5). Neste período, os ovos não eram férteis. Estes resultados corroboram com o relato de Santos et al., (2013) de que matrizes de codornas podem manter a probabilidade de fertilidade acima de 20 % até o novo dia após a cópula.

Neste estudo, a fertilidade não foi reduzida pela idade, isto aconteceu provavelmente pelas propriedades antioxidante da Cx , que pode ter aumentado a

capacidade antioxidante dos reprodutores e assim evitado a peroxidação dos espermatozoides nas aves mais velhas, hipótese que foi confirmada na análise da fertilidade em função da interação espermatozoide-ovo (Figura 5), e a probabilidade de fertilidade dos reprodutores de 40 semanas se mantiveram em índices próximos dos reprodutores com 26 semanas de idade, até o quinto dia após a cópula. A maior probabilidade de fertilidade no desempenho de incubação e na interação espermatozoide-ovo em parte ocorreu por causa do maior número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica em função dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ que podem ter aumentado a capacidade de remoção de radicais livres ($\cdot O_2$) nas membrana fosfolipídica dos espermatozoides reduzindo a oxidação de PUFA's.

Com relação à análise do número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica sobre a região do disco germinativo (Figura 6), houve interação tripla entre a Idade x Dias após a cópula x Dietas ($P<0,011$) com efeito quadrático da dieta na interação ($P=0,006$). Esta interação indicou que nos reprodutores com 26 semanas os números de espermatozoides foram maiores do que aos de 40 semanas. Entretanto, o número de espermatozoides das dietas 3 e 6 se mantiveram próximos.



26 semanas (β) = $5,770 + 0,314 \text{ Dieta} - 0,024 \text{ Dieta}^2 - 0,501 \text{ Dias} - 0,0115 \text{ DietaDias} + 0,0014 \text{ Dieta}^2 \text{ Dias} - 0,051 \text{ DietasDiasIdade} + 0,0038 \text{ Dietas}^2 \text{ DiasIdade}$.

40 semanas (β) = $5,373 + 0,314 \text{ Dieta} - 0,024 \text{ Dieta}^2 - 0,501 \text{ Dias} - 0,0115 \text{ DietaDias} + 0,0014 \text{ Dieta}^2 \text{ Dias} + 0,00 \text{ Dietas}^2 \text{ DiasIdade} - 0,00 \text{ Dietas}^2 \text{ DiasIdade}$.

Figura 6 - Número de espermatozoide (n° sptz) fixados na membrana vitelínica ($sptz/mm^2$) em função das idades dos reprodutores (26 e 40 semanas), dos dias em que os ovos foram coletados após a cópula e dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$.

Com 26 semanas e 40 semanas, o número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica sobre o disco germinativo da gema, diminuiu linearmente ao longo dos dias após a cópula ($P<0,05$). Os níveis de $Cx+25-(OH)D_3$, influenciaram de forma

quadrática crescente ($P < 0,05$) o número de espermatozoide, com pontos de máximo estimados aos níveis de 6,54 ppm de Cx + 3008 UI 25-(OH)D₃ (Figura 6).

Uma contagem maior de espermatozoides sobre a membrana vitelínica indica que maior quantidade de espermatozoides atingiu o infundíbulo durante a fecundação. Esse fato pode ser resultado da melhora na qualidade do sêmen em função da ação da Cx+25-(OH)D₃ na membrana fosfolipídicas dos espermatozoides, com aumento do número de espermatozoides no volume ejaculado, como também nas condições de armazenamento dos espermatozoides no oviduto.

O alto número de espermatozoides contados nos ovos das matrizes com 40 semanas indicam que essas aves conservaram características reprodutivas ao longo do tempo. Sendo que, pode-se sugerir efeitos positivos das Cx+25-(OH)D₃ para machos e fêmeas em codornas europeias.

A suplementação de Cx+25-(OH)D₃ aumentou de forma quadrática a probabilidade de fertilidade nos reprodutores (26 e 40 semanas) e manteve a probabilidade de fertilidade nos reprodutores com 40 semanas nos mesmos índices dos reprodutores de 26 semanas. O mesmo ocorreu com o número de espermatozoides fixado na membrana vitelínica (Figura 6). Também foi verificado que o número de espermatozoides na membrana vitelínica sobre o disco germinativo, diminuiu conforme os dias após a cópula, atingindo a quantidade de três espermatozoides próxima ao 5º e 8º dia após a cópula, quantidade limite estabelecida para que o ovo seja fértil.

O aumento quadrático da probabilidade de fertilidade nas duas incubações comerciais realizadas foi detectado no nível estimado de 5,34 ppm de Cx + 2456 UI 25-(OH)D₃. E, a maior probabilidade de fertilidade e do número de espermatozoides nas duas idades (26 e 40 semanas) em casais foram estimadas nos níveis 6,54 ppm de Cx + 3008 UI 25-(OH)D₃. Também se verificou que a probabilidade de fertilidade e os números de espermatozoide na membrana vitelínica sobre o disco germinativo dos reprodutores com 40 semanas, foram preservados em taxa próxima a de 26 semanas. Podem estar relacionados com a maior atividade antioxidante, pois a Cx remove radicais livres e peróxidos de membranas fosfolipídicas ricas em PUFAS e também atua na reciclagem da vitamina C e da E, atuando em conjunto com essas vitaminas, a vitamina E é conhecida como vitamina da reprodução e atua intensamente no sistema antioxidante.

Outra importante função da Cx é de sua relação com a estrutura das camadas fosfolipídicas como a dos espermatozoides, atua mantendo as ligações estruturais dos fosfolipídeos. Os resultados do segundo método, demonstraram que a probabilidade de

fertilidade e o número de espermatozoides de reprodutores com 40 semanas se mantiveram próximos aos de 26 semanas, confirmando o relato de que a proteção antioxidante das membranas lipídicas contra a peroxidação prolonga a sobrevivência *in vivo* e *in vitro* dos espermatozoides (Breque et al., 2006; Surai, 2002; Surai et al., 1998). Breque et al. (2006) destacaram que as glândulas da junção útero-vagina proporcionam para os espermatozoides uma barreira protetiva composta pelos principais antioxidantes e enzimas do sistema antioxidante (Vitamina E, C, carotenoides, SOD, GSH-Px e Ca) contra a oxidação lipídica, a qual, foi parcialmente modificada pela suplementação de vitamina E. A Cx foi essencial para aumentar a proteção das camadas fosfolipídicas dos espermatozoides que não foram afetadas em função da idade dos reprodutores, demonstrando a eficácia da Cx na proteção do espermatozoide e aumento da fertilidade.

Este resultados em codornas reforçam os resultados de maior fertilidade em reprodutores da linhagem Cobb 500, suplementados com 6 ppm de Cx, encontrados pelos autores Rosa et al. (2012), que foram justificados pelo aumento da sobrevivência e armazenamento dos espermatozoides no trato reprodutivo.

Outro motivo que pode ter elevado a probabilidade de fertilidade é que a vitamina D₃ e metabólito 25-(OH)D₃ são precursores do hormônio calcitriol 1,25-OH-2D₃, que possui efeitos anti-inflamatórios e a capacidade de modular o sistema imune, por controlar as funções das células T, além de atuar em outros diversos sistemas biológicos, dentre eles o reprodutivo, sendo essencial, sua deficiência causa diversas doenças, incluindo infertilidade e prejudica o desenvolvimento embrionário (Hewison, 2012; Rudick et al., 2014). Em aves, há poucas informações literárias sobre a ação da vitamina D na fertilidade, entretanto em ratos foi evidenciado que quando em déficit de vitaminas D ou na ausência dos receptores demonstraram que o útero não se desenvolveu adequadamente e não foi capaz de realizar o processo de maturação do óvulo, resultando na infertilidade (Luk et al., 2012).

4. Conclusão

A suplementação de Cx+25-(OH)D₃ no nível estimado de 5,90 ppm de Cx+25-(OH)D₃ proporcionou maiores índices de eclodibilidade total, de ovos férteis e de fertilidade e reduziu a mortalidade de ovos férteis, e durante o desenvolvimento embrionário durante a incubação e a fertilidade preservando os espermatozoides dos reprodutores até a 40ª semana, melhorando a viabilidade dos reprodutores e aumentou o

comprimento e o escore de Pasgar[®] dos pintinhos com 1 dia de idade, melhorando a qualidade da progênie.

5. Referências bibliográficas

- Abdulrahim, S., M. Patel, and J. McGinnis. 1979. Effects of vitamin D3 and D3 metabolites on production parameters and hatchability of eggs. *Poultry Science* 58:858-863.
- Bakst, M. 1981. Sperm recovery from oviducts of turkeys at known intervals after insemination and oviposition. *Journal of Reproduction and Fertility* 62:159-164.
- Bar, A., M. Sharvit, D. Noff, S. Edelstein, and S. Hurwitz. 1980. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. *The Journal of Nutrition* 110:1930-1934.
- Bramwell, R., C. McDaniel, J. Wilson, and B. Howarth. 1996. Age effect of male and female broiler breeders on sperm penetration of the perivitelline layer overlying the germinal disc. *Poultry Science* 75:755-762.
- Breque, C., P. Surai, and J. P. Brillard. 2006. Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. *Molecular Reproduction and Development* 73:1045-1051.
- Burton, G. W., J. Daroszewski, J. G. Nickerson, J. B. Johnston, T. J. Mogg, and G. B. Nikiforov. 2014. β -Carotene autoxidation: oxygen copolymerization, non-vitamin A products, and immunological activity. *Canadian Journal of Chemistry* 92:305-316.
- Esatbeyoglu, T., and G. Rimbach. 2016. Canthaxanthin—from molecule to function. *Molecular Nutrition & Food Research* 61:6-6.
- Fotina, A., V. Fisinin, and P. Surai. 2013. Recent developments in usage of natural antioxidants to improve chicken meat production and quality. *Bulg J Agric Sci* 19:889-896.
- Hewison, M. 2012. Vitamin D and immune function: an overview. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71:50-61.
- Johnson-Dahl, M. L., M. J. Zuidhof, and D. R. Korver. 2016. The effect of maternal canthaxanthin supplementation and hen age on breeder performance, early chick traits, and indices of innate immune function. *Poultry Science*, 96:634-646.
- Karadas, F., S. Erdo an, D. Kor, G. Oto, and M. Uluman. 2016. The Effects of Different Types of Antioxidants (Se, Vitamin E and Carotenoids) in Broiler Diets on the Growth Performance, Skin Pigmentation and Liver and Plasma Antioxidant Concentrations. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 18:101-116.
- Karadas, F., A. C. Pappas, P. F. Surai, and B. K. Speake. 2005. Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141:244-251.
- Kosin, I. L. 1945. The accuracy of the macroscopic method in identifying fertile unincubated germ discs. *Poultry Science* 24:281-283.

- Luk, J., S. Torrealday, G. Neal Perry, and L. Pal. 2012. Relevance of vitamin D in reproduction. *Human Reproduction* 27:3015-3027.
- Mattila, P., K. Lehtikoinen, T. Kiiskinen, and V. Piironen. 1999. Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4089-4092.
- Møller, A., C. Biard, J. Blount, D. Houston, P. Ninni, N. Saino, and P. Surai. 2000. Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Avian and Poultry Biology Reviews* 11:137-159.
- Mottaghitlab, M., M. Hormozdi, and A. Kamyab. 2013. Effect of cholecalciferol (D3) replacement with 1alpha-hydroxycholecalciferol on broiler breeder hen's performance. *Journal of Animal and Poultry Sciences* 2:39-47.
- Pande, V. V., K. C. Chousalkar, M. S. Bhanugopan, and J. C. Quinn. 2015. Super pharmacological levels of calcitriol (1, 25-(OH) 2D3) inhibits mineral deposition and decreases cell proliferation in a strain dependent manner in chicken mesenchymal stem cells undergoing osteogenic differentiation in vitro. *Poultry Science* 94:2784-2796.
- Ren, Z., S. Jiang, Q. Zeng, X. Ding, S. Bai, J. Wang, Y. Luo, Z. Su, Y. Xuan, B. Yao, F. Cisneros, and K. Zhang. 2016. Effect of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the performance of duck breeders under two different vitamin regimens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7:2-2.
- Robert, F., M. Panheleux-Le Bastard, C. Hamelin, and C. Boulard. Year. Effect of canthaxanthin supplementation in the ROSS breeder diet on oxidative stress in chick. *Proc. Proc. 16th European Symposium on Poultry Nutrition. France* 16:731-734.
- Rosa, A., C. Bonilla, A. Londero, C. Giacomini, C. Orso, M. Fernandes, J. Moura, and R. Hermes. 2016. Effect of broiler breeders fed with corn or sorghum and canthaxanthin on lipid peroxidation, fatty acid profile of hatching eggs, and offspring performance. *Poultry Science*:294.
- Rosa, A., A. Scher, J. Sorbara, L. Boemo, J. Forgiarini, and A. Londero. 2012a. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science* 91:660-666.
- Rosa, A. P., A. Scher, J. O. B. Sorbara, L. S. Boemo, J. Forgiarini, and A. Londero. 2012b. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science* 91:660-666.
- Rostagno, H., L. Albino, and J. Donzele. 2005. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa. Minas Gerais, Brazil: Universidade Federal de Viçosa. p 186.
- Rudick, B. J., S. A. Ingles, K. Chung, F. Z. Stanczyk, R. J. Paulson, and K. A. Bendikson. 2014. Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donor-recipient cycles. *Fertility and Sterility* 101:447-452.
- Santos, T., A. Murakami, C. Oliveira, and N. Giraldeoli. 2013. Sperm-egg interaction and fertility of Japanese breeder quails from 10 to 61 weeks. *Poultry Science* 92:205-210.
- Santos, T., A. Murakami, C. Oliveira, G. Moraes, C. Stefanello, T. Carneiro, C. Feitosa, and I. Kaneko. 2015. Influence of European quail breeders age on egg quality, incubation, fertility and progeny performance. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 17:49-56.
- Saunders-Blades, J., and D. Korver. 2015. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poultry Science* 94:1233-1246.
- Schneider, W. J. 2016. Lipid transport to avian oocytes and to the developing embryo. *Journal of Biomedical Research* 30:174-175.

- Sexton, K., J. Renden, D. Marple, and R. Kempainen. 1989. Effects of dietary energy on semen production, fertility, plasma testosterone, and carcass composition of broiler-breeder males in cages. *Poultry Science* 68:1688-1694.
- Soares, J., M. Swerdel, and M. Ottinger. 1979. The Effectiveness of the Vitamin D Analog 1 α -OH-D3 in Promoting Fertility and Hatchability in the Laying Hen. *Poultry Science* 58:1004-1006.
- Stahl, W., and H. Sies. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24:345-351.
- Sunde, M., C. Turk, and H. DeLuca. 1978. The essentiality of vitamin D metabolites for embryonic chick development. *Science* 200:1067-1069.
- Surai, A. P., P. F. Surai, W. Steinberg, W. G. Wakeman, B. K. Speake, and N. H. C. Sparks. 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* 44:612-619.
- Surai, P., N. Sparks, and B. Speake. 2006. The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. *Proc. 12th European Poultry Conference* 12:416-417.
- Surai, P. F. 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, UK.
- Surai, P. F. 2012. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 1. *World's Poultry Science Journal* 68:465-476.
- Surai, P. F., E. Blesbois, I. Grasseau, T. Chalah, J. P. Brillard, G. J. Wishart, S. Cerolini, and N. H. Sparks. 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 120:527-533.
- Surai, P. F., V. I. Fisinin, and F. Karadas. 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition* 2:1-11.
- Zhang, W., K. Y. Zhang, X. M. Ding, S. P. Bai, J. M. Hernandez, B. Yao, and Q. Zhu. 2011. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. *Poultry Science* 90:1516-1522.
- Zhang, X., W. Berry, G. McDaniel, D. Roland, P. Liu, C. Calvert, and R. Wilhite. 1999. Body weight and semen production of broiler breeder males as influenced by crude protein levels and feeding regimens during rearing. *Poultry Science* 78:190-196.

VI. Associação da cantaxantina + 25-hidroxicolecalciferol melhora o status antioxidante durante a incubação e nas primeiras semanas de vida da progênie em codornas europeias

Resumo:

O objetivo foi avaliar os efeitos da Cx associada ao metabólito 25-(OH)D₃ em diferentes períodos de armazenamento sobre status antioxidante na gema do ovo, durante a incubação e eclosão e sobre o tecido hepático e muscular da progênie no final da incubação e na primeira semana de vida e sobre o peso da progênie nesses períodos. Foram utilizados 240 reprodutores de codornas, distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco dietas e oito repetições, quatro fêmeas e dois machos e dois períodos (0 e 8 dias) de armazenamento dos ovos antes da incubação. As dietas experimentais foram: (0) dieta basal (vitamina D₃ 2000 UI); (3) dieta basal + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) dieta basal + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃). Não houve influência da interação (P>0,05) entre o Armazenamento x Dias de incubação x Níveis de Cx+25-(OH)D₃ em nenhuma das variáveis analisadas por 8 dias, antes da incubação. Na análise do status antioxidante na gema do ovo liofilizada o armazenamento reduziu (P=0,007) a % de DPPH e aumentou (P<0,001) a peroxidação lipídica e a Cx+25-(OH)D₃ aumentou a % de DPPH de modo quadrático crescente (P=0,066) e a peroxidação lipídica reduziu de modo quadrático (P<,001). No status antioxidante do conteúdo vitelínico na incubação e na eclosão não houve influência do armazenamento sobre a % de DPPH (P>0,005), entretanto a Cx+25-(OH)-D₃ influenciou de modo quadrático crescente (P<0,001) a % de DPPH. Em relação a peroxidação lipídica o armazenamento aumentou a quantidade de malonaldeído de forma crescente (P<0,001) e a Cx+25-(OH)D₃ reduziu de forma quadrática (P<0,001) a quantidade de malonaldeído. No tecido hepático e muscular da progênie, não houve interação entre a dieta e a incubação e primeira semana de vida. Entretanto, o armazenamento diminuiu a % de DPPH (P<0,001) e aumentou a peroxidação lipídica e a Cx+25-(OH) na dieta de reprodutores aumentou de modo quadrático a % de DPPH (P<0,001) e também de modo quadrático reduziu a peroxidação lipídica (P<0,001) e aumentou linearmente o peso da progênie nos dias avaliados. Concluímos que a Cx + 25-(OH) foi eficiente na remoção de radicais livres reduzindo a oxidação lipídica e consequentemente diminuiu a peroxidação lipídica em pintinhos.

Palavras-chave: peroxidação lipídica, remoção de radicais livres, fígado, músculo.

VI. Effects of canthaxanthin + 25-hydroxycholecalciferol on the antioxidant status during incubation and in the first weeks of the offspring's life

Abstract:

The objective was to evaluate the effects of Cx associated with the 25-(OH)D₃ metabolite in different storage periods on antioxidant status in egg yolk, during incubation and hatching, as well as on the hepatic and muscular tissue of the progeny at the end of incubation, in the first week of life and on the weight of offspring during these periods. A total of 240 quail breeders were distributed in a completely randomized experimental design with five diets and eight replicates, four females and two males. The experimental diets were: (0) basal diet (vitamin D₃ 500,000 IU); (3) basal diet + (3 ppm Cx + 1380 IU 25-(OH) D₃); (6) basal diet + (6 ppm Cx + 2.760 IU 25-(OH) D₃); (9) basal diet + (9 ppm Cx + 4.140 UI 25-(OH) D₃); (12) basal diet + (12 ppm Cx + 5,520 IU 25-(OH)D₃). There was no influence of the interaction ($P > 0.05$) between storage x days of incubation x levels of Cx+25-(OH)D₃ in any of the variables analyzed. In the analysis of the antioxidant status in lyophilized egg yolk the storage reduced ($P = 0.007$) the percentage of DPPH and increased ($P < 0.001$) lipid peroxidation and Cx+25-(OH)D₃ increased the percentage of DPPH in quadratic way ($P = 0.066$) and lipid peroxidation reduced in a quadratic fashion ($P < .001$). In the antioxidant status of the vitelline content in incubation and hatching, there was no influence of storage on the percentage of DPPH ($P > 0.005$); however, Cx + 25-(OH) -D₃ influenced in a quadratic way increasing ($P < 0.05$) the percentage of DPPH. In relation to lipid peroxidation, storage increased the amount of malonaldehyde ($P < 0.001$) and Cx+25-(OH)D₃ reduced quadratic ($P < 0.001$) the amount of malonaldehyde. In the hepatic and muscular tissue of the progeny there was no interaction between diet and incubation and the first week of life. However, storage decreased the percentage of DPPH and increased lipid peroxidation and Cx + 25-(OH) increased quadratically the percentage of DPPH ($P < 0.001$) and also quadratically reduced lipid peroxidation ($P < 0.001$) and linearly increased progeny weight on the evaluated days. We conclude that Cx + 25-(OH) was efficient in the removal of free radicals reducing lipid oxidation and consequently decreased lipid peroxidation.

Key word: lipid peroxidation, scavenging of free radicals, liver, muscle.

1. Introdução

Nas aves, diversos tecidos são susceptíveis ao ataque de radicais livres, que causam a peroxidação das biomoléculas. Particularmente em tecidos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) como o oócito (gema do ovo), espermatozoides e tecidos embrionários. Em geral, a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) predispõem a oxidação e está quando ocorre, causa degradação em cadeia destas biomoléculas, resultando em piores índices de desempenhos produtivos e reprodutivos de aves em crescimento, reprodutores e poedeiras comerciais (Surai, 2016). A suplementação de nutrientes com propriedades antioxidantes tem se mostrado um meio eficiente para minimizar esse estresse oxidativo em aves (Fellenberg e Speisky, 2006).

Diversos nutrientes nas dietas de aves possuem ação antioxidante pela capacidade de remover radicais livres, espécies reativas ao oxigênio (ROS), espécies reativas ao nitrogênio (RNS) e paralisarem a reação em cadeia da degradação de biomoléculas, minimizando o estresse oxidativo (Falowo et al., 2014).

Os principais nutrientes que possuem propriedades antioxidantes são: vitamina E, vitamina A, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides, etc. Dentre eles, os carotenoides lipossolúveis, como a cantaxantina (Cx), pertencentes a família das xantofilas, são transferidos da dieta para diversos tecidos dos reprodutores e também para a gema, vitelo e tecido embrionário (Galobart et al., 2001; Surai e Speake, 1998). Nesses tecidos, exercem funções no sistema antioxidante, na integridade das camadas fosfolipídicas das membranas celulares, na proliferação de células no intestino delgado e na reciclagem da vitamina C e E, fatores que podem melhorar a eclosão e, conseqüentemente, a viabilidade de matrizes (Surai, 2012).

O efeito da adição de Cx associada ou não com o 25-hidrocoleciferol tem sido estudado em reprodutores de aves e na progênie. Zhang et al. (2011) relataram maior capacidade antioxidante total no soro sanguíneo dos reprodutores, na gema do ovo, em pintinhos recém-nascidos e menor mortalidade (0 vs 4 %). Já Rosa et al. (2012) observaram redução da quantidade de malonaldeído nas gemas de ovos que foram armazenados, aumento da eclodibilidade de ovos férteis, da fertilidade e redução da mortalidade embrionária. Enquanto, Robert et al. (2008) relataram que houve menor oxidação lipídica no fígado de pintinhos com um dia, enquanto Johnson-Dahl et al. (2016) descreveram que a capacidade antioxidante no plasma de pintinhos com um dia de vida aumentou e a resposta do sistema imune foi mais robusta, sugerindo que a Cx possui

característica imunomodulatória. Ren et al. (2016a) descreveram menor quantidade de malonaldeído na gema do ovo e no soro dos reprodutores machos e maior eclodibilidade de ovos férteis e a eclodibilidade total dos ovos das matrizes nas dietas com Cx+ 25-(OH)D₃.

O metabólito 25-(OH)D₃ é a forma metabólica com maior taxa de conversão para hormônio calcidiol (1,25-(OH)D₃), que possui importantes funções na reabsorção e deposição de cálcio, quando maximizada a deposição de cálcio na casca do ovo, espera-se que a qualidade da casca seja melhor, protegendo o embrião contra doenças, bactérias, perda de água excessiva e maior deposição de cálcio no metabolismo do embrião, e pode estar relacionado com os maiores níveis de eclosão em dietas suplementadas com o 25-(OH)D₃ (Bar et al., 1980). Entretanto, o metabólito 25-(OH)D₃ é tóxico, e em altos níveis pode prejudicar o metabolismo.

A associação da Cx e da 25-(OH)D₃ é interessante, pois os dois nutrientes possuem relação direta com o ciclo reprodutivo de matrizes. A Cx pelo seu caráter antioxidante, possivelmente pode minimizar o estresse oxidativo durante o processo de incubação, na eclosão e na primeira semana dos pintinhos. Enquanto o metabólito 25-(OH)D₃ atua no sistema imune, no ciclo do cálcio e do fósforo das matrizes, e pode modificar e melhorar a qualidade da casca do ovo, evitando entrada de patógenos.

Desta forma, o objetivo foi avaliar o status antioxidante na gema, no conteúdo vitelínico durante o processo de incubação, avaliar no último dia de incubação e na primeira semana, o tecido hepático e muscular de pintinhos e períodos de armazenamento dos ovos antes da incubação, oriundos de reprodutores suplementados com diferentes níveis de Cx+25-(OH)D₃.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Coturnicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (CCA/UEM), localizada no Estado do Paraná (23°21'S, 52°04'W e altitude de 564 m). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA/UEM), tendo sido aprovados para execução (7846161115).

2.1 Animais, instalação e manejo

O galpão de postura utilizado foi do tipo convencional, com cobertura de telha de barro, piso e paredes laterais de alvenaria com 1,20 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado e cortinas laterais móveis. Com duas semanas de antecedência ao início do experimento, os reprodutores foram alojados em gaiolas de arame galvanizado (25x39 cm) com nipple na parte superior e comedouro tipo calha em frente às gaiolas, para a determinação do peso corporal dos reprodutores e a produção de ovos nas gaiolas.

Cada gaiola continha quatro fêmeas e dois machos, que foram uniformizados de acordo com o peso corporal ($292,01 \pm 17,82$ e $251,84 \pm 19,07$ kg) e a produção de ovos. O alimento e a água foram *ad libitum* e o programa de luz adotado foi de 17 horas de luz (natural + artificial) + 7 horas de escuro. Os machos e as fêmeas receberam a mesma ração por compartilharem a mesma gaiola. As médias de temperatura, máxima ($30,41 \pm 5,41^\circ\text{C}$) e mínima ($18,48 \pm 3,75^\circ\text{C}$) assim como de umidade, máxima ($45,36 \pm 14,55\%$) e mínima ($21,93 \pm 12,14\%$), foram medidas no termo higrômetro digital diariamente, dentro do galpão.

2.2 Delineamento experimental e dietas

Foram utilizados 240 reprodutores de codornas de corte, com 26 semanas de idade, que foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco dietas e oito repetições, sendo a gaiola composta por quatro fêmeas e dois machos. As dietas experimentais foram: (0) dieta basal (vitamina D₃ 2000 UI); (3) dieta basal + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) dieta basal + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH)D₃

As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, vitaminas, minerais e seguindo recomendações propostas por Rostagno et al. (2005) (Tabela 11).

Para manter as dietas isoenergéticas e isoproteicas, foi incluído na dieta basal o inerte, sendo substituído conforme a adição da Cx+25-(OH)D₃ nas dietas experimentais. Os níveis de suplementação de vitamina D₃ foram atendidos com o uso do premix vitamínico e o acréscimo do metabólito 25-(OH)D₃ ocorreu em associação com a Cx, por meio do fornecimento de um produto comercial.

Tabela 11. Composição centesimal química e energética das rações experimentais contendo Cx+25-(OH)D₃ para reprodutores de codornas europeias na fase de postura.

Ingredientes %	Dietas experimentais				
	0	3	6	9	12
Milho	51,76	51,76	51,76	51,76	51,76
Farelo de Soja	37,03	37,03	37,03	37,03	37,03
Calcário	5,85	5,85	5,85	5,85	5,85
Óleo de soja	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88
Fosfato Bi cálcico	1,29	1,29	1,29	1,29	1,29
Premix vit+min ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Sal comum	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
DL- Metionina (98,5 %)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
L-Lisina (76,5%)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Inerte ²	0,20	0,15	0,10	0,05	0,0
MaxiChick ^{®3}	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Composição Calculada					
Proteína bruta %	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,850	2,850	2,850	2,850	2,850
Cálcio (%)	2,700	2,700	2,700	2,700	2,700
Cloro (%)	0,248	0,248	0,248	0,248	0,248
Fósforo Disp (%)	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
Potássio (%)	0,828	0,828	0,828	0,828	0,828
Sódio	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Lys dig %	1,097	1,097	1,097	1,097	1,097
Met dig %	0,480	0,480	0,480	0,480	0,480
Met + Cys dig %	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767
Cantaxantina (mg/kg) ³	0,000	3,000	6,000	9,000	12,000
Vitamina D ₃ (UI/Kg) ³	0,000	1.380	2.760	4.140	5.520

¹Suplemento vitamínico e mineral – Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A – 2.500.000 UI; Vit. D₃ – 500.000 UI; Vit. E – 5.000 UI; Vit. B1 – 625 mg; Vit. B2 – 1.500 mg/Kg; Vit. B6 – 1.250 mg/kg; Vit. B12 – 5.000 UI; Vit. K3 – 750 mg; Pantotenato de Cálcio – 3.000 mg; Niacina – 6.000 mg/Kg; Ácido fólico – 250 mg/Kg; Biotina – 50,0 mg/Kg; Colina – 75 g/Kg; Antioxidante (Butil Hidroxi Tolueno – BHT) – 1.000 mg/Kg; Zinco – 13 g/ Kg; Ferro – 13 g/Kg; Manganês – 15 g/Kg; Cobre – 3.000 mg/Kg; Cobalto – 50 mg/Kg; Iodo – 250 mg/Kg; Selênio – 63 mg/Kg; Veículo Q.S.P. (Caulim) – 1.000 g/Kg. ²Inerte–Caulim; ³MaxiChick[®]: cantaxantina (6 mg/Kg) + 25-hidroxicolecalciferol (2.760 UI/Kg) - DSM, São Paulo – SP.

2.3 Coleta, armazenamento de amostras e liofilização.

Para realização das análises antioxidantes, foram utilizados 1.600 ovos de reprodutores de 32 a 35 semanas de idade, sendo que 800 ovos foram armazenados por oito dias em sala refrigerada ($\pm 19^{\circ}\text{C}$) e 800 ovos sem armazenamento foram incubados em incubadora automática a 60% de umidade e $37,4^{\circ}\text{C}$, com viragem automática. Decorridas 348 horas de incubação, os ovos foram transferidos para a câmara de eclosão com temperatura de $37,0^{\circ}\text{C}$, umidade de 70% por mais 56 horas.

Os ovos foram analisados na gema (dia 0), no vitelo durante os dias de incubação (2°, 4°, 6°, 10° e 15° dia) e na eclosão (1° dia). Em cada dia 20 ovos/dieta experimental/período de armazenamento foram utilizados para a obtenção de 5 pools/dieta experimental de conteúdo vitelínico, para isto, o ovo foi pesado e posteriormente quebrado para separar o conteúdo vitelínico da membrana vitelínica e para pesá-los individualmente em balança de precisão. O conteúdo vitelínico de quatro ovos foi homogeneizado para obtenção de 1 pool que foi aliquoteado rapidamente em quatro microtubos de 1,5 ml identificados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer – 80 ° C até a liofilização. Para este processo os microtubos foram retirados do freezer – 80 ° C, mantidos em nitrogênio líquido e transferidos para o liofilizador por 72 horas.

Os embriões do 15° dia de incubação e os pintinhos com 1 e 7 dias de vida foram oriundos de 20 ovos/dieta experimental/armazenamento ao término das horas estipuladas para completar 15, 17,5 e 7 os embriões e pintinhos foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical para a obtenção do fígado e do tecido muscular do peito que foram armazenados em papel alumínio devidamente identificados de acordo com a dieta experimental e armazenamento, congeladas em nitrogênio líquido e armazenados em freezer – 80 ° C até a realização das análises. Para a extração lipídica três amostras/dieta experimental/tecido foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas formando um pool. Em cada dia (15 °, 1° e 7°) e armazenamento três pools por dieta experimental foram utilizados na extração lipídica.

2.3.1 Método de extração lipídica no tecido hepático e no músculo

Para a extração lipídica foi pesado 200 µg e em seguida homogeneizado com 1,8 mL de metanol diluído em água destilada (1;2 mL:mL), por 10 segundos, em vórtex, e centrifugados (3000 rpm x g por 20 minutos) (Hermle, modelo Z323 K, Germany), para recuperação de 1,5 mL do sobrenadante (conteúdo vitelínico, tecido hepático e muscular proteinizado). Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 10%; 1:1 v:v) e homogeneizado por 10 segundos, em vórtex, e centrifugado (3000 rpm x g, por 20 min). O sobrenadante (conteúdo vitelínico, tecido hepático e muscular desproteinizado) foi congelado em freezer – 20 °C e utilizado nas análises antioxidantes.

2.3.2 Percentagem da capacidade redutora de radicais livre (% DPPH)

A capacidade redutora de radicais livres do 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH) foi determinada pelo método de DPPH (Sigma-Aldrich D9132), adaptado de Brand-Williams et al. (1995).

Para determinar a capacidade redutora de radicais dos extratos do conteúdo vitelínico, tecido hepático e muscular desproteínizado, foi determinada a absorvância de 1,85 mL da solução de DPPH (0,06mM/L) pipetado em microcubeta, após dois minutos de incubação à temperatura ambiente (20° C), com o uso de espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22, China, Ninbo Province) com leitura em de 515 nm. Posteriormente, foi adicionado em tubo falcon envolto em papel alumínio, que continha 150 µL do extrato e homogeneizado em vórtex, por 10 segundos. Após 30 minutos, foi mensurada a absorvância em 515 nm, representando a decomposição do DPPH neste tempo. Como controle, foi utilizado 150 µL de álcool metílico 100 % com 1,85 mL da solução de DPPH, e mensurada sua absorvância em 515 nm, para calibrar o espectrofotômetro.

Os resultados da decomposição do DPPH foram expressos em percentagem de capacidade redutora de radicais livres (% DPPH), que foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ DPPH} = (1 - (A \text{ amostra } T(30) / A \text{ amostras } T(0))) \times 100$$

Em que:

A amostra: Absorvância da amostra no tempo zero;

A amostras: Absorvância das amostras durante os tempos.

2.3.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A extração lipídica foi realizada em três amostras por dieta, período, armazenamento e tecido.

Para a curva padrão do TBARS, foram preparadas soluções com 1,3,3-tetrametoxipropano e metanol 50% (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mM), e uma alíquota de 0,500 µL foi adicionada a 2,0 mL da solução de TBA em tubo falcon, colocadas em banho fervente (100 °C), durante 15 minutos. Após 5 minutos, foi mensurada sua absorvância em 532 nm, em espectrofotômetro. Os resultados de absorvância foram utilizados para determinar a equação da curva padrão, que só foi utilizada com R² maior que 0,99.

A oxidação lipídica foi determinada pelo método de TBARS, adaptado de Chrczanowicz et al. (2008). Para isto, uma alíquota de 500 µL do extrato do conteúdo

vitelínico, tecido hepático e muscular desproteínizado foi homogeneizada com 2,0 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (TBA 1%, TCA 10% e HCL 0,06%) e colocada em banho fervente (100°C), durante 15 minutos. Após cinco minutos, a leitura foi realizada em 532 nm em espectrofotômetro. Como controle, foi utilizado 0,500 µL da solução de álcool metílico e água destilada (1:2 mL:mL), com 2,0 mL da solução de TBA e mensurado sua absorbância em 352 nm, para calibrar o espectrofotômetro.

Os resultados de absorbância representam a concentração de malonaldeído, que é uma substância reativa ao TBA. Estes foram ajustados na curva padrão do TBARS e convertidos para a quantificação de malonaldeído (MDA mg/ kg) na gema, vitelo liofilizado, tecido hepático e muscular.

2.4 Análises estatísticas

O modelo estatístico adotado foi o de regressão múltipla no qual foi adicionado as interações dos parâmetros de regressão com a variável independente:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_{p-1}x_{p-1} + \varepsilon$$

Em que:

\hat{Y} = Variável dependente;

x_1, x_2, \dots, x_{p-1} = Variáveis independentes;

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{p-1}$ = parâmetros da regressão;

ε = Erro aleatório.

Nas análises antioxidantes (TBARS e DPPH, variáveis dependentes) da gema (dia 0) a variável independente foi o armazenamento, e os parâmetros da regressão foram os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$, a interação armazenamento x $C_{x+25}-(OH)D_3$ foi adicionada ao modelo utilizado. Já na análises do conteúdo do vitelo, a variável independente foi o armazenamento e os polinômios de regressão foram os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$ e os dias de incubação, as interações (2 x 6 x 5) entre Armazenamento x Dias de incubação, Armazenamento x $C_{x+25}-(OH)D_3$ e Armazenamento x Dias de incubação x $C_{x+25}-(OH)D_3$ foram adicionadas ao modelo estatístico. E, para as análises do tecido hepático e muscular, as variáveis independentes foram o armazenamento e os dias de incubação e após a eclosão os polinômios de regressão foram os níveis de $C_{x+25}-(OH)D_3$, as interações (2 x 3 x 5) Armazenamento x Dias de incubação e após a eclosão, Armazenamento x $C_{x+25}-(OH)D_3$ e Armazenamento x Dias de incubação e após a eclosão x $C_{x+25}-(OH)D_3$ foram adicionadas ao modelo utilizado.

As variáveis foram submetidas à análise variância (ANOVA) e posteriormente os graus de liberdade referentes aos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ e dias de incubação e/ou dias de incubação após a eclosão e período de armazenamento foram desdobrados em polinômios ortogonais, para obtenção das equações de regressão, utilizando os modelos quadrático. Os dados foram submetidos às análises estatísticas, no procedimento MIXED do software SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA) com significância de 5 %.

3. Resultados e Discussão

Na análise da gema de ovos, não houve influência da interação ($P>0,05$) entre o Armazenamento x Dias de incubação x Níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 12).

Tabela 12. Período de armazenamentos e análises de % DPPH e TBARS (MDA) na gema do ovo liofilizada de reprodutores de codornas europeias suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$. (n=3/dieta/armazenamento).

Dietas ²	% DPPH		MDA mg/Kg	
	0 dias	8 dias	0 dias	8 dias
0	44,65	46,26	0,928	0,998
3	47,86	43,04	0,510	0,854
6	50,66	48,77	0,582	0,886
9	49,64	48,13	0,585	0,692
12	49,69	45,61	0,518	0,522
Média	48,51	46,36	0,705	0,79
EPM ¹	0,818	0,887	0,019	0,047
Fontes de variação				
Armazenamentos	0,073		<0,001	
Dietas	0,065		<0,001	
Dietas ²	0,012		0,290	
Equações				
DPPH= 45,87-2,144+0,975 Dietas -0,059 Dietas ²				
MDA				
0 dias = 0,858 - 0,061 Dietas				
8 dias = 1,020 - 0,061 Dietas				

¹EPM = Erro padrão da média.

² Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D_3 ; (3) 200 UI Vit D_3 + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH) D_3); (6) 200 UI Vit D_3 + (6 ppm de Cx + 2.760 UI 25-(OH) D_3); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH) D_3); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx + 5.520 UI 25-(OH) D_3).

³ 0 dias = sem armazenamento e 8 dias = oito dias armazenados.

Em gemas liofilizadas dos ovos de matrizes de codornas europeias, que foram armazenadas com diferentes períodos, foi mensurada a quantidade de malonaldeído pelo método de TBARS, a capacidade redutora de radicais livres pelo método de % de DPPH. Houve diferença ($P<0,05$) entre os armazenamentos, em que a % de DPPH demonstrou tendência de modo quadrático crescente ($P=0,066$) e a quantidade de malonaldeído

(MDA) decresceu linearmente ($P < 0,001$) em função dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ (Tabela 12).

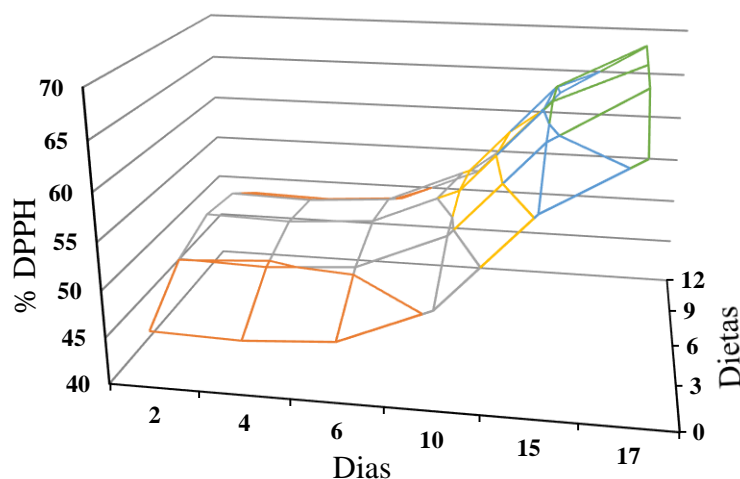
Nas análises das gemas liofilizadas sem armazenamento, o ponto máximo da % de DPPH foi predito no nível de 8,18 ppm de $Cx + 3763 UI 25-(OH)D_3$, enquanto, nas gemas liofilizadas de ovos armazenadas por 8 dias, a % de DPPH obteve ponto máximo estimado ao nível de 8,18 ppm de $Cx + 3763 UI 25-(OH)D_3$.

Os resultados de quantidade de MDA no conteúdo da gema deste estudo, estão de acordo com os valores descritos em experimentos com dietas controles à base de milho e soja para codornas, observados na literatura, que variam de 0,100 a 1,75 mg/kg ou μ/g (Akdemir e Sahin, 2009; Sahin et al., 2010; Sahin et al., 2008).

Os níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ aumentaram de forma quadrática a % de DPPH, diminuindo a quantidade de radicais livres, evitando a degradação das moléculas de carboidrato, lipídicas, proteicas e ácidos nucleicos da gema do ovo, mantendo a integridade e função das células, pela menor degradação das moléculas. A concentração do MDA, que é um composto derivado da oxidação lipídica, diminuiu na gema do ovo, indicando que as matrizes suplementadas com os níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ tiveram seu sistema antioxidante otimizado, melhorando a qualidade do conteúdo da gema.

As gemas de ovos de codornas *in natura*, quando enriquecidas com nutrientes antioxidantes, podem trazer benefícios à saúde humana, podendo apresentar efeitos anticarcinogênicos, antiestresse e modular a composição lipídica no metabolismo humano (Oluwafemi Ibukun e Oludare Oladipo, 2016). Entretanto, os ovos *in natura* deste estudo, foram incubados para avaliar o status antioxidante do conteúdo do vitelo durante a incubação e a eclosão, nos níveis estimados a quantidade de MDA, no início da incubação foram menores, favorecendo o desenvolvimento do embrião na fase inicial de desenvolvimento.

Nas análises antioxidantes realizadas durante o processo de incubação dos ovos, foi testada a interação entre o armazenamento, dias e níveis de $Cx+25-(OH)D_3$, e não houve efeito do armazenamento dos ovos antes da incubação sobre a percentagem de DPPH ($P > 0,05$). Analisando o status antioxidante do conteúdo de vitelo pelo método de DPPH, houve influência de modo quadrático crescente ($P < 0,05$) sobre a % de DPPH em função da suplementação de $Cx+25-(OH)D_3$, com ponto de máximo estimado ao nível 6,65 ppm de $Cx + 3059 UI$ de $25-(OH)D_3$, no quarto (3,59) dia de incubação (Figura 7).

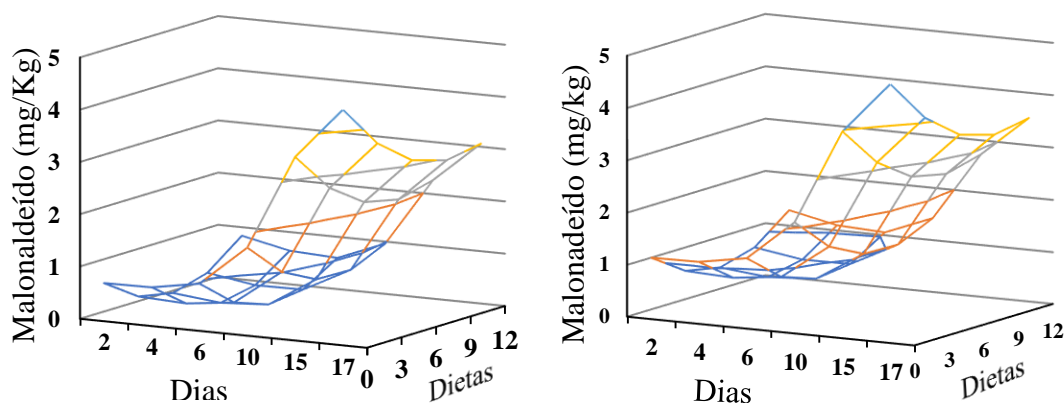


$$\%DPPH = 47,267 + 1,694Dietas - 0,128Dietas^2 - 0,801Dias + 0,112Dias^2, R^2=0,98.$$

Figura 7 - Mensuração da capacidade redutora de radicais livres (% DPPH), em vitelo liofilizado, com diferentes armazenamentos (0 e 8 dias), durante 17 dias de incubação, provenientes de matrizes de codornas europeias (idade), suplementadas com Cx+25-(OH)D₃.

A % de DPPH esteve acima de 50% nos níveis de Cx+25-(OH)D₃, desde o segundo dia de incubação e foi maior até o final da incubação, enquanto o nível 0 alcançou 50 % somente no décimo dia de incubação. A maior % de DPPH no vitelo liofilizado de embriões de codornas europeias demonstra que houve remoção dos radicais livres deste tecido, evitando a formação de novos radicais livres que degradam as moléculas de carboidratos, proteicas e lipídicas, diminuindo o aporte nutricional utilizado pelo embrião e também alteram a integridade das células e dos núcleos de DNA do embrião, causando maior peroxidação do tecido, aumentando os compostos da peroxidação lipídica, como o MDA (Surai et al., 2003).

Na análise da quantidade de MDA no conteúdo do saco vitelínico liofilizado, houve efeito ($P < 0,05$) do armazenamento com valores superiores quando os ovos foram armazenados. Os valores de MDA representam o estresse oxidativo que ocorreu pelo armazenamento de oito dias para a incubação. Houve interação ($P < 0,05$) entre os dias de incubação e os níveis de Cx+25-(OH)D₃. O ponto de mínimo (0,116 mg/kg) foi estimado ao nível de 4,98 ppm de Cx+ 2291 UI 25-(OH)D₃, no terceiro dia de incubação, quando não houve armazenamento; e com 8 dias de armazenamento, o ponto de mínimo (0,579 mg/kg) da oxidação lipídica foi predito no mesmo nível e dia de incubação dos vitelos que não foram armazenados (Figura 8).



Sem armazenamento = $0,883 - 0,1883 \text{ Dietas} + 0,0179 \text{ Dietas}^2 - 0,1084 \text{ Dias} + 0,01896 \text{ Dias}^2 - 0,0089 \text{ DietasDias}$, $R^2=0,83$.

Armazenados (8 dias) = $1,312 - 0,1883 \text{ Dietas} + 0,0179 \text{ Dietas}^2 - 0,1084 \text{ Dias} + 0,01896 \text{ Dias}^2 - 0,00836 \text{ Dietas} \cdot \text{Dias}$, $R = 0,83$.

Figura 8. Mensuração da oxidação lipídica (TBARS), no conteúdo vitelínico liofilizado de ovos sem armazenamento e com 8 dias de armazenamento e coletados na incubação (2°, 4°, 6°, 10° e 15° dias) e na eclosão (17 ° dia) de pintinhos de matrizes de codornas europeias suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$.

Esta interação indica que os níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ interagem com os dias e no nível estimado maximizou a atividade do sistema antioxidante, evitando a degradação de moléculas, principalmente de lipídeos de cadeia longa poli-insaturadas (PUFAS), que são encontrados em altas concentrações no vitelo e no tecido embrionário, influenciando diretamente a eclodibilidade e a qualidade do pintinho. É importante destacar que no conteúdo de vitelos que foram armazenados por oito dias, a quantidade de MDA aumentou em relação aos ovos não armazenados, indicando que longos períodos de armazenamento prejudicam o sistema antioxidante e o desenvolvimento dos embriões.

Esta análise da quantidade de MDA, no conteúdo do saco vitelínico durante a incubação até a eclosão, demonstra como se comporta o status antioxidante durante a incubação em codornas e justifica a menor quantidade de MDA encontrado no saco vitelínico de pintinhos com um dia de vida, que foi encontrada neste estudo.

Avaliando a suplementação de diferentes níveis de Cx (controle, 3, 6, 12 e 24) para matrizes de frango de corte, Surai et al. (2003) relataram que houve menor concentração de MDA na membrana do saco vitelínico de pintinhos com 16 dias de incubação, dos níveis comparados ao controle e do nível de 12 ppm comparado aos demais níveis. E houve deposição linear de Cx na membrana do saco vitelínico, no fígado e no plasma de frangos com um dia de idade. É importante destacar que no nível de 24 ppm de Cx os valores de MDA aumentaram. Os maiores valores de MDA encontrados por Surai et al., (2003) no nível de 24 ppm de Cx demonstram que a Cx em altos níveis

pode prejudicar o metabolismo. Neste estudo, foi encontrado efeito semelhante no nível de 12 ppm de Cx + 5520 UI 25-(OH)D₃. Acredita-se que o alto nível do metabólito 25-(OH)D₃ em conjunto com a vitamina D₃ foi tóxico ao metabolismo, fazendo com que os valores de % de DPPH diminuíssem, e de MDA no conteúdo da gema do ovo aumentassem.

Analisando os efeitos da vitamina D₃ no sistema antioxidante, os pesquisadores Saha et al. (2016) descreveram que os níveis séricos de vitamina D₃ podem influenciar o status do sistema antioxidante e oxidativo. A associação dos níveis séricos de vitamina D₃ com análises antioxidantes poderia ajudar a compreender os resultados desta pesquisa e comprovar que a vitamina D₃ em excesso, pode causar efeito reverso no sistema antioxidante, aumentando a produção de radicais livres e a oxidação lipídica.

Destacando a propriedade antioxidante da Cx no metabolismo de pintinhos com um dia de vida, Johnson-Dahl et al. (2016) descreveram que houve efeito positivo da suplementação de 6 ppm de Cx para matrizes de frango de corte da linhagem Ross 308, na fase média (34^a a 47^a semana) e final (48^a a 61^a semana), sobre a capacidade antioxidante no plasma sanguíneo de pintinhos com um dia de idade, a quantidade de Cx depositada no fígado e sobre o sistema imune. Os autores concluíram que o nível de 6 ppm de Cx melhorou a produtividade dos reprodutores, com efeitos observados nos frangos de corte e relataram maior quantidade de MDA no saco vitelínico e no fígado de patos com 1 dia de idade, provenientes de reprodutores de patos suplementados com 6 ppm de Cx + 0,069 mg/kg de 25-(OH)D₃ da 38^a a 77^a semana de idade (Ren et al., 2016b).

Os resultados desta pesquisa sugerem que os níveis de Cx+25-(OH)D₃ aumentaram a capacidade de redução de radicais livres e, conseqüentemente, evitaram a degradação de moléculas lipídicas, proteicas e de carboidratos no conteúdo do saco vitelínico de pintinhos após eclosão, aumentando o aporte nutricional para o desenvolvimento dos pintinhos nas primeiras semanas de vida. Isto é destacado nos dados de literatura supracitados, em que foi verificada menor quantidade de MDA na membrana do saco vitelínico de frangos com 16 dias de incubação e um dia de vida, e no plasma sanguíneo e no fígado no primeiro dia de vida, assim como maior quantidade de Cx e vitamina E, no fígado até 7 dias de idade. Esses dados sugerem que a suplementação de Cx atua no sistema antioxidante, melhorando o balanço antioxidante e oxidativo no metabolismo em diversos tecidos e nas primeiras semanas de idade, assim como pode ter relação com benefícios ao sistema imune.

A fim de investigar o status antioxidante de embriões com 15 dias de incubação sob duas condições de armazenamento, na eclosão e com 7 dias após a eclosão, foi avaliado o tecido hepático e muscular pelos métodos de DPPH e TBARS, e verificou-se que houve influência do armazenamento ($P < 0,001$) sobre as análises nos dois tecidos e em todos os dias analisados (Tabela 12). Houve interação entre o armazenamento e os dias para a % DPPH no fígado e no músculo ($P < 0,0256$) (Tabela 13).

O armazenamento por oito dias dos ovos diminuiu a capacidade de capturar moléculas de DPPH e aumentou a quantidade de MDA (mg/Kg), isto refletiu em maiores níveis de estresse oxidativos no fígado e músculo, durante a incubação até o sétimo dia de vida dos pintinhos. Independentemente do armazenamento, houve influência dos dias ($P < 0,001$), com crescimento linear da % de DPPH e decrescente para o TBARS, demonstrando que existe relação entre estas duas análises. Comparando os valores de DPPH e TBARS no 15º dia de incubação com os demais dias, indicando que o sistema antioxidante está em desenvolvimento fisiológico e também que é um período crítico, de alto estresse oxidativo. Comparando as análises nos tecidos no sétimo dia com os demais destaca-se a maior capacidade de captura de moléculas de DPPH e menor produção de MDA, indicando a adaptação dos pintinhos com o meio ambiente rico em oxigênio.

Em relação aos efeitos da suplementação de $Cx+25-(OH)D_3$ sobre a análise de DPPH e TBARS, houve resposta quadrática crescente ($P < 0,05$) para a capacidade de capturar o radical DPPH e decrescente ($P < 0,05$) para a peroxidação lipídica no tecido hepático e muscular, independentemente do armazenamento. No tecido hepático, o DPPH teve o ponto máximo estimado no nível de 6 ppm de $Cx + 2700$ UI de $25-(OH)D_3$. E, o ponto mínimo da quantidade de MDA foi estimada ao nível de 6,27 ppm de $Cx + 2886$ UI de $25-(OH)D_3$. Já no fígado, o ponto máximo da capacidade de capturar o radical DPPH foi estimado ao nível 5,01 ppm de $Cx + 2304$ UI de $25-(OH)D_3$, enquanto o ponto mínimo da peroxidação lipídica foi estimado ao nível de 6,07 ppm de $Cx + 2791$ UI de $25-(OH)D_3$ (Tabela 12).

Os efeitos da suplementação da $Cx+25-(OH)D_3$ sobre a capacidade de capturar o radical DPPH do tecido hepático e muscular corroboram com os achados de Tanaka et al. (2012), que descreveram que a Cx atua intensamente na remoção de radicais livres, espécies reativas ao oxigênio (ROS), espécies reativas ao nitrogênio (RNS) e evitam a quebra de cadeias de biomoléculas. As ROS e RNS degradam principalmente os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) das membranas celulares, e esta degradação não é paralisada, continuando em reação de cadeia (Park et al., 2009).

Tabela 2. Análise da % de DPPH e TBARS (mg/Kg) no fígado e no músculo de embriões com 15 dias de incubação sob duas condições de armazenamento e em pintinhos no dia da eclosão e com sete dias após a eclosão. (n=3/dieta/dia/armazenamento).

Armazenamento	Peso do Pintinho (g)	Fígado		Músculo	
		DPPH	TBARS	DPPH	TBARS
Sem armazenamento	10,56	24,62 A	0,219 B	23,42 A	0,155 B
8 dias armazenado	10,87	22,05 B	0,162 A	21,10 B	0,136 A
Dias					
15	6,14 C	21,54	0,221	20,61	0,181
1	8,37 B	23,22	0,203	21,69	0,158
7	16,69 A	25,26	0,158	24,43	0,097
Dieta³					
0	10,25	21,50	0,221	21,11	0,177
3	9,84	24,54	0,168	23,75	0,122
6	10,69	24,55	0,176	23,33	0,129
9	10,36	23,40	0,187	21,75	0,142
12	10,70	22,71	0,201	21,34	0,158
Média	9,98	23,34	0,191	22,26	0,145
EPM ¹	1,71	0,236	0,005	0,25	0,046
Fontes de variação		P-valor			
Armazenamento	0,224	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Dias	<0,001	<0,001	0,017	<0,001	<0,001
Dietas	0,039	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Dietas ²	0,652	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Dias vs Dietas	0,101	0,090	0,887	0,056	0,156
Armazenamento vs Dias	0,897	0,023	0,771	0,018	0,352
Armazenamento vs Dietas	0,843	0,205	0,239	0,472	0,220
Equações		R²	Cx	25-(OH)D₃	PI²
Peso do pintinho = 15,81+0,047Dietas		0,88	-	-	-
Fígado					
DPPH = 22,34+0,819Dietas-0,0683Dietas ²		0,89	6,00	2760	24,80
TBARS=0,1896-,0137Dietas+0,001092Dietas ²		0,90	6,27	2886	0,147
Músculo					
DPPH=23,060+0,594-0,0593Dietas ²		0,86	5,01	2304	25,74
TBARS=0,1276-0,0142Dietas+0,00117Dietas ²		0,84	6,07	2791	0,041

¹ EPM = Erro padrão da média

² PI = Ponto de inflexão;

³ Dietas: (0) 200 UI/Kg de vitamina D₃; (3) 200 UI Vit D₃ + (3 ppm de Cx + 1.380 UI 25-(OH)D₃); (6) 200 UI Vit D₃+ (6 ppm de Cx +2.760 UI 25-(OH)D₃); (9) dieta basal + (9 ppm de Cx + 4.140 UI 25-(OH)D₃); (12) dieta basal + (12 ppm de Cx +5.520 UI 25-(OH)D₃).

* Letras maiúsculas indicam que as médias são diferentes no teste tukey ao nível de 5 % de significância

Tabela 3. Desdobramento da interação entre os períodos de armazenamentos dos ovos antes da incubação e a idade dos embriões (15° dia) e pintainho (1 e 7 dias) para a % de DPPH no fígado e músculo de progênie de matrizes de codornas europeias suplementadas com Cx+25-(OH)D₃

% DPPH	Fígado			Músculo		
	15 dia°	1 dia	7 dia	15 dia°	1 dia°	7° dia
Sem armazenamento	22,10 A	22,70 A	25,45 A	22,65 A	24,27 A	26,95 A
Com armazenamento	19,02 B	20,74 B	23,42 B	20,44 B	22,16 B	23,57 B

* Letras maiúsculas indicam que as médias são diferentes no teste tukey ao nível de 5 % de significância

Provavelmente, a maior % de DPPH no fígado encontrada neste estudo irá diminuir a degradação de diversas biomoléculas, em razão da maior remoção de radicais livres. Fato que aconteceu no tecido hepático onde houve menor quantidade de MDA nos níveis estimados de Cx+25-(OH)D₃ no 15º dia, na eclosão e com sete dias após a eclosão. Isto indica menores índices de peroxidação lipídica. Que ocorreu porque o sistema antioxidante foi mais eficiente pela ação antioxidante da Cx, que aumentou a capacidade de remover o radical DPPH supracitada e provavelmente de remover peróxidos da oxidação lipídica, como o MDA.

A maior capacidade antioxidante no sétimo dia após a eclosão demonstra que a Cx pode ser depositada no fígado dos embriões e ficar armazenada durante a primeira semana de vida. Isso corrobora com os achados de Surai (2012), que descreveu que o aumento da concentração de Cx no tecido corporal do embrião aumentou a remoção de radicais livres e de peróxidos, e a reciclagem da vitamina C e da vitamina E, minimizando o estresse oxidativo no metabolismo, durante e após eclosão, melhorando assim a viabilidade da progênie. Em outro estudo, foi relatado por Surai et al. (2003) maior concentração de Cx e vitamina E no fígado de pintinhos de frango de corte com um e sete dias de vida. Como consequência, a peroxidação lipídica diminuiu, demonstrando ação moduladora da Cx no sistema antioxidante de frango de corte na fase inicial, de um a sete dias.

O músculo assim como fígado são tecidos ricos em proteínas que são susceptíveis a oxidação proteica que produzem peróxidos (ROS, RNS e proteínas carbonil) que causam danos as membranas fosfolipídicas de diversas biomoléculas no metabolismo. Os resultados encontrados da suplementação de Cx+25-(OH)D₃ sobre a capacidade de remover o radical DPPH demonstram que a Cx quando fornecida em dietas maternas é transferida aos diversos tecidos do embrião e podem ser armazenada no tecido por uma semana ou mais tempo, atuando no sistema antioxidante para minimizar o estresse oxidante e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica. Fato que foi confirmado pela quantidade MDA encontrado no músculo que é um indicativo do status da peroxidação. Os resultados são semelhantes aos dados de MDA no músculo do peito de codornas japonesas alimentadas com a dieta controle em pesquisa de Botsoglou et al. (2004).

A fase de eclosão da primeira semana de vida é consideradas de alto nível de estresse oxidativo nos tecidos corporais de pintinhos oriundos de codornas europeias, assim como de outras espécies (Surai et al., 2006; Surai et al., 2016), então a minimização deste estresse oxidativos, no período de eclosão e na primeira semana de vida, resultando

em um pintinho de melhor qualidade, com fisiologia mais desenvolvida, podendo melhorar o desempenho da progênie durante a primeira semana de vida. O peso corporal, o ganho de peso e conversão alimentar de 1 a 14 dias, o consumo alimentar de 1 a 35 dias, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de 1 dia e a atividade antioxidante total foram maiores, enquanto a quantidade de MDA diminuiu na gema e no plasma em patos oriundos de reprodutores da linhagem Cherry Valley, que foram suplementados com 6 mg/kg de Cx + 0,069 mg/kg 25-(OH)D₃.

Estes resultados sustentam a hipótese de que a Cx é depositada na gema do ovo e pela sua propriedade antioxidante ameniza o estresse oxidativo, no conteúdo vitelínico durante a incubação e a eclosão, podendo ser transferidas para diversos tecidos embrionários e serem armazenados no fígado e no músculo, durante a primeira semana, melhorando a adaptação da progênie ao novo ambiente que é rico em oxigênio. O metabólito 25-(OH)D₃ também é depositado na gema do ovo e possui relação com o sistema imune e a mineralização óssea do embrião, além de ser essencial para a deposição de cálcio na casca deixando-a mais compacta evitando a entrada de invasores durante o processo de incubação.

De modo geral, o armazenamento dos ovos diminuiu a % de DPPH e aumentou a quantidade de MDA no músculo e no fígado, no 15º dia de incubação, na eclosão e com sete dias após a eclosão. A adição de Cx+25-(OH)D₃ proporcionou maior % de DPPH, na gema *in natura*, no conteúdo do saco vitelínico durante a incubação e no primeiro dia de vida. O mesmo ocorreu no fígado e no músculo no 15º dia de incubação, na eclosão e com sete dias após a eclosão, melhorando a capacidade de remoção de radicais livres, ROS e RNS do metabolismo, evitando a degradação de biomoléculas que iriam originar compostos como o MDA, que elevam o nível de peroxidação dos tecidos. A menor quantidade de MDA ocorreu na gema *in natura*, no conteúdo do saco vitelínico durante a incubação e na eclosão e no fígado e no tecido muscular de pintinhos oriundos de codornas europeias, com um dia de vida e sete dias após a eclosão. Isso indica que a Cx exerce importantes funções no sistema antioxidante, sendo que uma importante função é a ação da Cx em reciclar a vitamina C e a E (Surai, 2012). Esta última é um dos mais potentes antioxidantes e exerce funções em diversos sistemas, como por exemplo no reprodutivo. Devido à menor quantidade de MDA no fígado e no músculo, na eclosão e com sete dias após a eclosão, que são fases de alto estresse oxidativo, pode-se inferir que a condição de saúde e o sistema antioxidantes foram melhorados, podendo influenciar no desempenho dos pintinhos de codornas europeias na primeira semana de vida e também

de pintinhos de outras espécies, pois a maior peroxidação dos tecidos está relacionada com maior susceptibilidade dos pintinhos a diversas doenças.

Com relação ao peso do pintinho houve influência ($P < 0,001$) dos dias, devido ao crescimento do pintinho e dos níveis de $Cx+25-(OH)D_3$ de forma linear. O maior peso dos pintinhos pode ter ocorrido pela maior atividade do sistema antioxidante que ocorreu durante a incubação. Efeito semelhante foi evidenciado com a suplementação da Cx e do metabólito $25-(OH)D_3$ que aumentou o peso corporal da progênie (Ren et al., 2016 b). O maior peso corporal da progênie pode estar relacionado com a melhora do sistema antioxidante e também da maior absorção do conteúdo vitelínico, que pode ter ocorrido durante o processo de incubação principalmente ao término deste processo.

4. Conclusão

A suplementação de $Cx+25-(OH)D_3$ intensificou a capacidade redutora de radicais livres e minimizou a peroxidação de biomoléculas na gema *in natura*, no conteúdo do saco vitelínico liofilizado, no fígado e no músculo de embriões e pintinhos de codornas europeias. A adição de $Cx+25-(OH)D_3$ à níveis próximos de 6 ppm + $25-(OH)D_3$ intensificou a proteção contra a oxidação e diminuiu a peroxidação lipídica. Entretanto, em níveis acima de 6 ppm + $25-(OH)D_3$ prejudicou o sistema antioxidante.

5. Referências Bibliográficas

- Akdemir, F., and K. Sahin. 2009. Genistein supplementation to the quail: effects on egg production and egg yolk genistein, daidzein, and lipid peroxidation levels. *Poultry Science* 88:2125-2131.
- Bar, A., M. Sharvit, D. Noff, S. Edelstein, and S. Hurwitz. 1980. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. *The Journal of Nutrition* 110:1930-1934.
- Botsoglou, N., G. Papageorgiou, I. Nikolakakis, P. Florou-Paneri, I. Giannenas, V. Dotas, and E. Sinapis. 2004. Effect of dietary dried tomato pulp on oxidative stability of Japanese quail meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2982-2988.
- Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28:25-30.
- Chrczanowicz, J., A. Gawron, A. Zwolinska, J. de Graft-Johnson, W. Krajewski, M. Krol, J. Markowski, T. Kostka, and D. Nowak. 2008. Simple method for determining human serum 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity—possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 46:342-349.
- Falowo, A. B., P. O. Fayemi, and V. Muchenje. 2014. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International* 64:171-181.
- Fellenberg, M. A., and H. Speisky. 2006. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal* 62:53-70.
- Galobart, J., A. Barroeta, M. Baucells, and F. Guardiola. 2001. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poultry Science* 80:327-337.
- Johnson-Dahl, M. L., M. J. Zuidhof, and D. R. Korver. 2016. The effect of maternal canthaxanthin supplementation and hen age on breeder performance, early chick traits, and indices of innate immune function. *Poultry Science* 96:634-646.
- Oluwafemi Ibukun, E., and G. Oludare Oladipo. 2016. Lipidomic Modulation in Stressed Albino Rats Is Altered by Yolk and Albumen of Quail (*Coturnix japonica*) Egg and Poultry Feed. *Biochemistry Research International* 2016:2565178.
- Park, Y., S. Nam, H. J. Yi, H. J. Hong, and M. Lee. 2009. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutrition Research* 29:812-818.
- Ren, Z., S. Jiang, Q. Zeng, X. Ding, S. Bai, J. Wang, Y. Luo, Z. Su, Y. Xuan, B. Yao, F. Cisneros, and K. Zhang. 2016a. Effect of dietary canthaxanthin and 25-

- hydroxycholecalciferol supplementation on the performance of duck breeders under two different vitamin regimens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7:2-3.
- Ren, Z. Z., S. Z. Jiang, Q. F. Zeng, X. M. Ding, S. P. Bai, J. P. Wang, Y. H. Luo, Z. W. Su, Y. Xuan, and K. Y. Zhang. 2016b. Effects of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the antioxidant status and tibia quality of duck breeders and newly hatched ducklings. *Poultry Science* 95:2090-2096.
- Ren, Z. Z., J. P. Wang, Q. F. Zeng, X. M. Ding, S. P. Bai, Y. H. Luo, Z. W. Su, Y. Xuan, and K. Y. Zhang. 2016c. The effects of maternal dietary vitamin premixes, canthaxanthin, and 25-hydroxycholecalciferol on the performance of progeny ducklings. *Poultry Science* 95:630-635.
- Robert, F., M. Panheleux-Le Bastard, C. Hamelin, and C. Boulard. Year. Effect of canthaxanthin supplementation in the ROSS breeder diet on oxidative stress in chick. *Proc. Proc. 16th European Symposium on Poultry Nutrition. France.*
- Rosa, A., A. Scher, J. Sorbara, L. Boemo, J. Forgiarini, and A. Londero. 2012. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science* 91:660-666.
- Rostagno, H., L. Albino, and J. Donzele. 2005. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa. Minas Gerais, Brazil: Universidade Federal de Viçosa. p 186.
- Saha, P., S. Dasgupta, S. Sen, A. Kumar, and U. K. Biswas. 2016. Patients with type 2 diabetes have reduced levels of plasma vitamin D3 and are well correlated with the oxidative stress parameters. *Asian Journal of Medical Sciences* 7:35-40.
- Sahin, K., F. Akdemir, C. Orhan, M. Tuzcu, A. Hayirli, and N. Sahin. 2010. Effects of dietary resveratrol supplementation on egg production and antioxidant status. *Poultry Science* 89:1190-1198.
- Sahin, N., F. Akdemir, C. Orhan, O. Kucuk, A. Hayirli, and K. Sahin. 2008. Lycopene-enriched quail egg as functional food for humans. *Food Research International* 41:295-300.
- Surai, A., P. Surai, W. Steinberg, W. Wakeman, B. Speake, and N. Sparks. 2003a. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* 44:612-619.
- Surai, A. P., P. F. Surai, W. Steinberg, W. G. Wakeman, B. K. Speake, and N. H. C. Sparks. 2003b. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* 44:612-619.
- Surai, P. 2016. Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition* 2:1-11.
- Surai, P., N. Sparks, and B. Speake. 2006. The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. *Proc. 12th European Poultry Conference* 12:416-417.
- Surai, P. F. 2012. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 2. *World's Poultry Science Journal* 68:717-726.
- Surai, P. F., V. I. Fisinin, and F. Karadas. 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition* 2:1-11.
- Surai, P. F., and B. K. Speake. 1998. Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 9:645-651.
- Tanaka, T., M. Shnimizu, and H. Moriwaki. 2012. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules* 17:3202-3242.
- Zhang, W., K. Y. Zhang, X. M. Ding, S. P. Bai, J. M. Hernandez, B. Yao, and Q. Zhu. 2011. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. *Poultry Science* 90:1516-1522.

VII Considerações Finais

Conclui-se que a suplementação de diferentes níveis de $C_{x+25}\text{-OH-D}_3$ influenciou o metabolismo ósseo, sendo capaz de melhorar a deposição de cálcio na casca do ovo. No desempenho reprodutivo, aumentou a eclodibilidade de ovos férteis e a fertilidade e reduziu a infertilidade e a mortalidade embrionária durante o processo de incubação. Em relação a qualidade do pintinho, maximizou o índice de Pasgar[®]. Enquanto no status antioxidante, reduziu o estresse oxidativo e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica.

Esta pesquisa poderá ser utilizada como modelo experimental para outros reprodutores de aves, como por exemplo em patos, perus, frango de corte com o intuito de avaliar a suplementação de $C_{x+25}\text{-(OH)D}_3$ sobre o metabolismo do cálcio e fósforo, reprodutivo e antioxidante.

Sugere-se que ao avaliar a qualidade interna e externa da gema do ovo que se avalie a resistência da membrana da gema do ovo, a resistência a quebra do ovo, o número de cascas quebradas e a estrutura da casca do ovo.

Em relação a vitamina D, sabe-se que quando suplementados altos níveis possivelmente prejudicará alguns metabolismos, como o reprodutivo e antioxidante, então análises bioquímicas que relacionem altas concentração de vitamina D_3 com o sistema antioxidante ou prooxidante podem ser realizadas para verificar os efeitos desta sobre o metabolismo.

Durante o desenvolvimento embrionário e crescimento do pintinho, é interessante analisar a oxidação proteica pela análise da concentração de proteína carbonil em tecidos muscular ou soro sanguíneo, em conjunto com a oxidação lipídica a fim de investigar como amenizar a oxidação proteica para maximizar a deposição de proteínas no músculo.

Devido a possível ação da Cx e da vitamina D sobre o sistema imune e trato gastrointestinal, é possível realizar diversas análises com o intuito de avaliar o sistema imune, em períodos de alto estresse oxidativo, a fim de verificar se há correlações entre o sistema antioxidante e o imune.

6. Apêndice

Tabela 1. Médias da probabilidade de fertilidade após a copula de reprodutores de codornas europeias suplementadas com $Cx+25-(OH)D_3$

Fertilidade												
26 semanas												
Tratamentos	Dias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100,00	75,00	100,00	100,00	80,00	66,67	40,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	100,00	100,00	100,00	80,00	66,67	100,00	100,00	88,89	0,00	0,00	0,00	0,00
6	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	88,89	37,50	16,67	0,00	0,00	0,00
9	100,00	100,00	100,00	100,00	83,33	66,67	16,67	14,29	0,00	0,00	0,00	0,00
12	100,00	100,00	100,00	100,00	77,78	66,67	66,67	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00
42 semanas												
0	80,00	50,00	20,00	66,67	60,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	100,00	100,00	100,00	87,50	100,00	57,14	42,86	14,29	20,00	0,00	0,00	0,00
6	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	85,71	83,33	28,57	0,00	0,00	0,00	0,00
9	100,00	85,71	85,71	75,00	71,43	28,57	16,67	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	100,00	100,00	100,00	100,00	66,67	37,50	16,67	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
Fontes de variação		P valor										
Idade		0,034										
Dias		0,344										
Dias ²		<0,001										
Dietas		<0,001										
Dietas ²		<0,001										
Dietas x Dias		0,005										
Dietas x Dias x Idade		<0,001										

Tabela 2. Médias do número de espermatozoides fixados na membrana vitelínica após a cópula de reprodutores de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$.

N ° Spmtz												
26 semanas												
Tratamentos	Dias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	112,13	62,17	45,71	37,60	17,17	4,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	553,78	381,80	148,83	98,80	40,66	13,00	13,22	6,55	1,28	0,00	0,00	0,00
6	402,38	176,56	59,75	28,87	13,33	10,86	5,00	2,75	0,75	0,00	0,00	0,00
9	456,75	324,14	77,67	105,14	37,00	20,17	12,33	7,14	5,00	0,25	0,00	0,00
12	290,87	193,00	109,86	69,71	30,38	20,11	9,67	7,80	2,56	0,83	0,00	0,00
40 semanas												
0	65,80	9,50	7,00	27,33	11,60	10,75	7,00	3,00	2,75	1,00	0,00	0,00
3	303,67	413,75	61,67	57,25	19,25	30,14	15,50	9,63	7,38	7,50	0,00	0,00
6	417,20	248,29	91,00	78,67	46,16	46,17	24,71	24,16	14,29	3,00	0,00	0,00
9	202,30	196,43	113,71	49,63	19,42	15,50	8,71	6,33	2,62	0,20	0,00	0,00
12	227,63	69,17	172,40	104,50	22,33	19,87	11,00	12,33	3,43	2,70	0,00	0,00
Fonte de variação		P valor										
Idade		<0,001										
Dias		<0,001										
Dias ²		0,394										
Dietas		<0,001										
Dietas ²		<0,001										
Dietas x Dias		0,047										
Dietas ² x Dias		0,017										
Dietas x Dias ²		0,370										
Dietas x Dias x Idades		0,001										

Tabela 3. Médias de DPPH no conteúdo vitelínico durante a incubação de ovos de reprodutores de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$

Tratamentos	Armazenamento											
	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8
	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias
	2		4		6		10		15		17	
0	48,11	51,04	44,26	47,66	46,26	48,03	49,63	52,31	62,72	49,52	61,40	62,51
3	50,14	49,86	47,25	52,17	47,62	48,42	53,23	58,30	72,39	68,49	75,49	71,16
6	48,74	49,72	52,24	50,59	49,91	51,24	57,14	57,61	72,69	78,02	72,42	66,27
9	50,22	47,82	46,48	48,79	49,53	52,51	55,22	54,84	58,16	65,80	68,15	68,65
12	50,23	52,13	48,33	46,50	49,93	53,86	54,16	49,19	59,68	63,60	67,21	67,62
Média	49,48	50,12	47,69	49,14	48,65	50,81	58,64	52,43	65,06	65,09	68,93	67,24
EPM	0,315	0,326	0,507	0,349	0,367	0,415	0,567	0,573	1,36	1,565	0,840	0,652
Regressão	P - Valor											
Armazenamentos	0,767											
Dias	0,010											
Dias ²	<0,001											
Dietas	<0,001											
Dietas ²	<0,001											
Dietas x Dias	0,890											
Dietas x Dias x Armazenamento	0,423											

Tabela 4. Médias de TBARS no conteúdo vitelínico durante a incubação de ovos de reprodutores de codornas europeias suplementadas com diferentes níveis de $Cx+25-(OH)D_3$

Tbars (mg/Kg)	Armazenamento											
	0 dias	8 dias	0 dias	8 dias	0 dias	8 dias	0 dias	8 dias	0 dias	8 dias	0 dias	8 dias
Dietas	2 dias		4 dias		6 dias		10 dias		15 dias		17 dias	
0	0,846	0,978	0,852	1,283	0,928	1,233	0,956	1,146	5,565	6,604	4,205	5,077
3	0,501	0,614	0,453	0,649	0,251	0,510	0,361	0,892	2,935	3,348	2,616	2,996
6	0,655	0,836	0,386	0,692	0,349	0,582	0,576	0,902	3,062	3,419	2,674	3,118
9	0,657	0,702	0,524	0,880	0,584	0,839	0,585	0,838	3,241	3,626	2,793	3,035
12	0,579	0,895	0,643	0,841	0,517	0,823	0,724	0,877	3,249	3,671	2,890	3,201
Média	0,648	0,808	0,571	0,869	0,526	0,797	0,640	0,942	3,616	4,133	3,485	3,036
EPM	0,020	0,052	0,030	0,040	0,041	0,044	0,020	0,032	0,162	0,204	0,098	0,133
Regressão	P-valor											
Armazenamento	<0,001											
Linear	0,472											
Quadrática	<0,712											
Dias	0,137											
Dias ²	<0,001											
Dietas x Dias	0,050											
Dietas ² x dias	<0,001											
Dietas x Dias x Armazenamento	<0,001											