

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**JULIANA VIEIRA MARQUES DE SOUZA PEREIRA BATISTA**

**Suplementação dietética de vitamina E para matrizes pesadas**

Belo Horizonte  
2013

JULIANA VIEIRA MARQUES DE SOUZA PEREIRA BATISTA

**Suplementação dietética de vitamina E para matrizes pesadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, sob orientação do Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião e co-orientação da Dra. Julia Sampaio Rodrigues Rocha

Área de concentração: Produção Animal  
Professor Orientador: Nelson Carneiro Baião

Belo Horizonte  
2013

Batista, Juliana Vieira Marques de Souza Pereira, 1981-  
B333s Suplementação dietética de vitamina E para matrizes pesadas / Juliana Vieira  
Marques de Souza Pereira Batista. – 2013.  
67 p. : il.

Orientador: Nelson Carneiro Baião  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de  
Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Ave doméstica – Alimentação e rações – Teses. 2. Vitamina E na nutrição animal –  
Teses. 3. Dieta em veterinária – Teses. 4. Suplemento alimentar – Teses. I. Baião, Nelson  
Carneiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 5

Dissertação defendida e aprovada em 11/04/2013, pela Comissão Examinadora constituída por,



---

Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara



---

Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, pilares da minha existência. À vovó Clarinda, tão longe, tão perto, sempre meu amparo.

*Todo o trabalho é vazio a não ser que haja amor.*

Khalil Gibran

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo amor infinito, pela dádiva da vida.

Aos meus pais, por se doarem tanto, pelo cuidado diário, por acreditarem em quem sou, por estarem sempre presentes!

À toda minha família, que alegram os meus dias!

À tia Tazinha. Sei que está feliz e orgulhosa aonde quer que esteja!

Ao Gustavo, por acreditar e me fazer acreditar! Por não me deixar esquecer que tenho com quem contar: sempre e apesar de tudo!

Ao meu afilhado Tomaz, por ser tão especial e único.

Aos amigos mais especiais que alguém pode ter: Dani, Lets, Flá, Fê, Mi, Juju, Ziza, Nina, Marcelete, Paulistano, Pedro, Dri, Gabi, Fê Carolina, Schiber, Sacha e Carlão!

Ao professor Baião, por permitir que esse sonho se concretizasse através dos ensinamentos, confiança, exemplo de ética, profissionalismo e amizade.

À Julia, essencial e imprescindível. Guia, mentora, guru, orientadora, amiga! Obrigada por me sustentar em todos os momentos, dentro e fora da escola!

Ao professor Leo, por ter me aberto as portas da avicultura, me proporcionando a realização no meu caminho profissional. Pelos conselhos fundamentais e decisivos em todas as etapas deste caminho!

À professora Vanessa, pelo apoio, colaboração, ensinamentos, amizade e contribuição na correção desta dissertação e participação na banca.

Ao professor Nelson Martins, pela disponibilidade, ajuda e direcionamentos.

À equipe *best* de avicultura: Mari, Paulinha Cardeal, Luiz, Maurício, Kamilla, Marilane, Rodrigo, Winnie, Marília, Ed, Cadu, Teo... Obrigada é pouco! Vocês fizeram tudo valer a pena!

À Pif Paf, em especial ao Rodrigo Diniz, Leonardo Ruiz, Cléver, Ricardo e toda a equipe do incubatório e granja Sapezal, pelo comprometimento e envolvimento com este experimento.

Ao Juan Ruiz e Bruno Wernick, da Basf, que doaram a vitamina E e viabilizaram a realização das análises de alfa-tocoferol na gema, órgãos e rações.

A todos do departamento de nutrição da Vaccinar, pelo auxílio e compreensão nos momentos finais.

À EV/UFMG e a Capes, por viabilizarem este mestrado.

---

**SUMÁRIO**


---

	RESUMO	10
	ABSTRACT	10
1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.	Radicais livres e espécies reativas de oxigênio	13
2.2.	Peroxidação lipídica: uma reação iniciada por radicais livres	15
2.3.	Consequências da peroxidação lipídica: efeitos do estresse oxidativo	16
2.3.1.	Na fertilidade	16
2.3.2.	No pinto recém eclodido	17
2.4.	As defesas antioxidantes	19
2.5.	Biomarcadores: mensurando o dano oxidativo	21
2.6.	Amenizando o dano oxidativo: a estratégia da utilização da vitamina E	22
2.6.1.	A vitamina E	22
2.6.1.1.	Papel metabólico	23
2.6.1.2.	Inter-relação com a vitamina A	25
2.6.1.3.	Absorção, estocagem e transporte da vitamina E para a gema do ovo	27
2.6.2.	Suplementação de vitamina E em dietas de matrizes pesadas	28
2.6.3.	Efeitos da vitamina E na gema do ovo, eclosão e progênie	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1.	Local	34
3.2.	Galpão e aves	34
3.3.	Manejo das matrizes e rações	35
3.4.	Ovos	36
3.5.	Tratamentos	37
3.6.	Dados obtidos	37
3.6.1.	Porcentagem dos componentes dos ovos	37
3.6.2.	Níveis de vitamina A e E na gema do ovo fértil e tecidos da progênie	38
3.6.3.	Rendimento de incubação	38
3.6.3.1.	Fertilidade e mortalidade embrionária	38
3.6.3.2.	Taxa de eclosão em relação ao número de ovos incubados	39
3.6.3.3.	Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos férteis	39
3.6.3.4.	Mortalidade embrionária	39
3.6.4.	Peso do pinto no momento da eclosão	40
3.6.5.	Peso do saco vitelino, fígado e coração	40
3.6.6.	Indicadores do estresse oxidativo	41
3.6.6.1.	Capacidade antioxidante total do soro	41
3.6.6.2.	Estabilidade oxidativa do soro	41
3.7.	Delineamento experimental	42
3.8.	Comitê de ética em experimentação animal	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1.	Componentes dos ovos	44
4.2.	Nutrientes da gema do ovo: vitaminas A e E	44
4.3.	Fertilidade e rendimento de incubação	47
4.4.	Avaliações relativas ao pinto	50
4.5.	Concentração de vitamina E no fígado e saco vitelino da progênie	52
4.6.	Biomarcadores do estresse oxidativo	53
5.	CONCLUSÃO	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

---

---

**ANEXOS**

---

- |    |  |    |
|----|--|----|
| 1. | Quadro 1. Período de monitoramento da fertilidade, eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados dos galpões dos núcleos que constituíram os tratamentos com dois níveis de vitamina E.                       | 66 |
| 2. | Quadro 2. Fertilidade, eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados dos galpões dos núcleos que constituíram os tratamentos com dois níveis de vitamina E durante o período de adaptação das aves às dietas. | 67 |

---

**LISTA DE TABELAS**

---

- |            |  |
|------------|--|
| Tabela 1.  | Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações das matrizes  |
| Tabela 2.  | Parâmetros de qualidade dos ovos de acordo com os tratamentos  |
| Tabela 3.  | Concentração de vitamina E (mg/kg) e de vitamina A (UI/kg) na gema do ovo liofilizada  |
| Tabela 4.  | Correlação de Pearson entre as concentrações de vitamina A e E na gema do ovo liofilizada  |
| Tabela 5.  | Porcentagem de fertilidade em matrizes pesadas com 59 semanas de acordo com os tratamentos   |
| Tabela 6.  | Eclosão sobre ovos totais e ovos férteis incubados de acordo com as dietas em matrizes pesadas com 59 semanas  |
| Tabela 7.  | Mortalidade embrionária de zero a sete dias, oito a 14 e 15 a 18 dias, calculada sobre ovos férteis incubados  |
| Tabela 8.  | Mortalidade embrionária de 19 a 21 dias, incluindo ovos bicados e mortalidade embrionária em função de contaminação e desidratação, calculada sobre ovos férteis incubados |
| Tabela 9.  | Peso do pinto ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E  |
| Tabela 10. | Peso relativo do saco vitelino (SV) e fígado (FG) do pinto ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E   |
| Tabela 11. | Peso relativo do coração do pinto ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E  |
| Tabela 12. | Concentração de vitamina E (mg/kg) no saco vitelino e fígados liofilizados de pintos ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E.                                  |
| Tabela 13. | Correlação de Pearson entre as concentrações de vitamina E presentes na gema, saco vitelino e fígado dos pintos ao nascimento  |
| Tabela 14. | Estabilidade oxidativa (TBARS) e capacidade antioxidante total (CAT) do soro de pintos ao nascimento de acordo com os níveis de suplementação de vitamina E                |
-



---

**LISTA DE FIGURAS**


---

Figura 1.	Reação em cadeia da peroxidação lipídica.
Figura 2.	Modo de ação da vitamina E

---



---

**LISTA DE ABREVIATURAS**


---

ABPM	Antioxidante de baixo peso molecular
AGPI	Ácido graxo polinsaturado
AGPICL	Ácido graxo polinsaturado de cadeia longa
CAT	Capacidade antioxidante total
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CuZn-SOD	Superóxido dismutase cobre zinco dependente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GSH-Px	Glutathione peroxidase
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido dismutase manganês dependente
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Se-GSH-Px	Glutathione peroxidase selênio dependente
SOD	Superóxido dismutase
SST	Túbulos de armazenamento de espermatozoides
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
UI	Unidade internacional
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLg	Lipoproteína de muito baixa densidade modificada

---

## RESUMO

Foi conduzido um experimento com o objetivo de avaliar a influência dos níveis de 40 e 150 ppm de suplementação de vitamina E em dietas de matrizes pesadas com idade avançada sobre a fertilidade, rendimento de incubação, qualidade e nutrientes dos ovos férteis, concentração de vitamina E nos tecidos da progênie, desenvolvimento do pinto recém-eclodido e indicadores do estresse oxidativo. Foram utilizados ovos de matrizes Cobb® com eclosão e fertilidade estatisticamente semelhantes. Os ovos foram provenientes de núcleos formados por quatro galpões, havendo em cada um dos mesmos, 9.250 fêmeas e 925 machos. Cada galpão foi dividido em dois boxes, com separação equivalente das aves, compondo uma repetição. Desta forma, cada núcleo foi constituído por oito boxes (repetição) com 4.625 fêmeas e 462 machos. O período experimental compreendeu a faixa etária das matrizes de 54 a 59 semanas, sendo que os ovos para a incubação (2304 por tratamento) foram coletados na 59<sup>a</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. A fertilidade, o rendimento de incubação, os indicadores do estresse oxidativo e os parâmetros de qualidade dos ovos não foram influenciados pelos tratamentos. A concentração de vitamina E na gema do ovo foi maior para o tratamento com 150 ppm de suplementação e a de vitamina A, menor neste tratamento, indicando antagonismo entre elas. Os pintos provenientes de matrizes alimentadas com o maior nível de vitamina E foram mais pesados. As concentrações de alfa tocoferol no saco vitelino e no fígado foram maiores para o tratamento com o maior nível de suplementação dietética da vitamina E.

Palavras-chave: alfa-tocoferol, antioxidante, fertilidade, eclodibilidade.

## ABSTRACT

*An experiment was conducted in order to evaluate the influence of two vitamin E levels, 40 and 150 ppm, in broiler breeders diets with advanced age on fertility, hatching yield, quality and nutrients from fertile eggs, concentration of vitamin E tissues of the progeny, development of newly hatched chick and indicators of oxidative stress. The eggs used at this experiment, were achieved from Cobb® broiler breeders with similar fertility and hatchability. Four warehouses composed the poultry houses, with 9250 females and 925 male birds. Each warehouse was divided into two sides, with equally distribution of the birds, constituting one replicate. Thus, there were eight replicates, with 4625 female and 462 male birds. The experimental period lasted eight weeks, when the broiler breeders' age was 54 to 59 weeks. The eggs for incubation (2304 per treatment) were collected in the 59<sup>th</sup> week of age. The experimental design was completely randomized. Fertility, incubation yield, indicators of oxidative stress and egg quality were not affected by treatments. The concentration of vitamin E in egg yolk was higher for the group supplemented with 150 ppm and vitamin A concentration was lower for this treatment, indicating an antagonism between them. The chicks from the higher level of vitamin E were heavier. The concentrations of alpha tocopherol in yolk sac and liver were higher for treatment with the highest level of supplementation of vitamin E.*

*Keyword: antioxidant, alpha tocopherol, hatchability, hen, rooster, lipid peroxidation.*

## 1. INTRODUÇÃO

A queda nos índices de eclosão e fertilidade em lotes de matrizes pesadas é uma condição fisiológica, iniciando-se com cerca de 40 semanas. Esta queda tem sido relacionada a uma condição de estresse oxidativo ocasionada pela redução das defesas antioxidantes no embrião (Surai et al., 1996) e nos sistemas reprodutores dos machos (Sikka et al., 1995; Brèque et al., 2003) e fêmeas (Agarwal et al., 2005). Segundo Halliwell e Gutteridge (1998), a peroxidação lipídica é caracterizada pela reação entre um radical livre com um ácido graxo poliinsaturado e é apontada como o principal evento citotóxico consequente do estresse oxidativo. A peroxidação lipídica causa alterações estruturais nas bicamadas lipídicas, desestabilização nas membranas biológicas e perda da função de barreira entre o meio intra e extracelular, colocando em risco a integridade de organelas e da própria célula.

A elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes nos tecidos dos embriões de galinhas predispõe aos efeitos da reação de peroxidação lipídica, alterando principalmente, a estrutura de membranas celulares. Para evitar tais danos, o pinto recém-eclodido possui linhas de defesas antioxidantes, entre elas, a vitamina E, que pode ser considerada o principal antioxidante lipossolúvel em tecidos animais (Sies, 1993). Com o processo de eclosão, os embriões também podem sofrer os danos do estresse oxidativo: marcado pela mudança da respiração corioalantoidea para a pulmonar que expõe o embrião a altos níveis de oxigênio, aumentando a necessidade de proteção contra o dano peroxidativo em tecidos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como o cérebro e o fígado (Surai et al. 1997).

Em dietas de matrizes pesadas, normalmente trabalha-se com níveis entre 25 ppm (Leeson e Summers, 1997) e 40 ppm de vitamina E (Rostagno et al. 1997). No entanto, sabendo-se que o alfa-tocoferol é responsável por 88% das defesas antioxidantes do sêmen e que a queda na fertilidade pode ser explicada por uma redução destas defesas, propõe-se o uso de 150 a 200 ppm para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo na fertilidade em galinhas. Essa suplementação deve ser realizada no momento em que a queda na fertilidade é mais pronunciada.

Diante do exposto, foi conduzido um experimento para avaliar a influência de dois níveis de suplementação de vitamina E em dietas de matrizes pesadas com idade avançada sobre a fertilidade, rendimento de incubação, qualidade e nutrientes dos ovos férteis, concentração de vitamina E nos tecidos da progênie, desenvolvimento do pinto recém-eclodido e indicadores do estresse oxidativo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Radicais Livres e Espécies Reativas do Oxigênio

Segundo Halliwell e Gutteridge (1998), radical livre é qualquer espécie reativa capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. São produzidos através de processos oxidativos normais do organismo, como a respiração celular, na qual a redução parcial do oxigênio gera metabólitos que coletivamente são denominados espécies reativas do oxigênio (ERO). Este termo inclui não somente as espécies radicalares, mas também as não radicalares, como o peróxido de hidrogênio. Por isso, se torna conveniente citar Halliwell (2006): “todo radical livre é uma ERO, mas nem toda ERO é um radical livre”.

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, nos processos de transferência de elétrons durante o metabolismo celular, ou pela exposição a fatores exógenos, como por exemplo, a radiação ultravioleta, podendo ocorrer no citoplasma, mitocôndrias ou nas membranas. As ERO são formadas por atividade enzimática intra e extracelular, sendo a xantina oxidase, a citocromo P450, a via da ciclooxygenase e a NADPH oxidase as principais enzimas envolvidas neste processo (Cerqueira et al., 2007).

As três principais EROs são o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). O radical superóxido é formado quando há adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental. A principal enzima formadora deste radical é a NADPH oxidase. Este ânion superóxido, ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio, forma o peróxido de hidrogênio através de um processo chamado dismutação. Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (CHAMPE et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, apresentando alta seletividade para reagir com outras moléculas biológicas. De acordo com Kanner (1994), sua importância reside na capacidade de se difundir através das membranas lipídicas e participar da reação de formação do radical hidroxil, este sim um elemento que reage com tudo a sua volta devido à sua curta meia-vida. Pode ser formado pela reação do  $H_2O_2$  com íons cobre ou ferro (Reação de Fenton), ou pela reação entre o peróxido de hidrogênio e o superóxido, catalisada por metais

de transição existentes nas células, principalmente o cobre e o ferro (Reação de Haber-Weiss) (Barreiros et al., 2006).

O radical hidroxil possui uma meia-vida curta, dificultando seu sequestro *in vivo*. Este fato faz com que altas quantidades de antioxidantes sejam necessárias para que sua ação deletéria seja suprimida. Há dois modos de defesa contra o radical hidroxil: reparação dos danos causados ou inibição de sua formação (Halliwell e Chirico, 1993), que serão discutidos mais adiante no tópico sobre defesas antioxidantes. O radical hidroxil causa danos ao DNA, a proteínas, lipídios e membranas celulares. De acordo com Halliwell (2006), os danos ao DNA são associados a mutações, erros na transdução e a falhas na síntese de proteínas. Danos às proteínas têm como consequência a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo de íons, citólise e morte celular (Barreiros et al., 2006). Já os danos aos lipídios podem ser percebidos principalmente pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), o que altera a composição, estrutura e propriedades da membrana, como a permeabilidade às moléculas (Surai et al., 2000). Barreiros et al. (2006) explicam que os ácidos graxos poliinsaturados são mais susceptíveis ao ataque por radicais livres, devido ao carbono metilênico bis-alílico, sendo que esse ataque às membranas celulares é o exemplo mais comum da ação do radical hidroxila aos lipídeos.

Apesar de todos os danos citados, as ERO não são geradas apenas por um “acidente químico”, essas também são produzidas intencionalmente, como por exemplo, por fagócitos ativados, fibroblastos e linfócitos, exercendo um importante papel de defesa contra microorganismos patogênicos, além de serem moléculas sinalizadoras para a regulação da fosforilação e dos mecanismos antioxidantes (Halliwell e Chirico, 1993; Sheu et al., 2006).

Estima-se que em condições fisiológicas normais, 3 a 5% do oxigênio utilizado pelas células, originam radicais livres ou ERO. Por outro lado, altas concentrações ou remoção inadequada das ERO por sistemas antioxidantes endógenos resultam em condição de estresse oxidativo, causando disfunções metabólicas severas e danos a macromoléculas biológicas (Halliwell, 2006).

## 2.2. Peroxidação Lipídica: uma reação iniciada por radicais livres

A peroxidação lipídica (LPO) é caracterizada pela reação entre um radical livre, com um ácido graxo insaturado e é apontada como o principal evento citotóxico consequente do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1998). Trata-se de um fenômeno químico complexo, envolvendo reações radiculares capazes de auto-propagação, que dependem de fatores catalíticos como temperatura, íons metálicos, radicais livres e pH.

A reação de LPO (figura 1) ocorre através do ataque de uma ERO, que abstrai um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, normalmente de um ácido graxo poliinsaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono. Esta é a etapa de iniciação. O radical hidroxil é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora mais importante da lipoperoxidação. O radical carbono formado na etapa de iniciação realiza um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, que pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ). A partir da formação desse radical, ocorre a fase de propagação, em razão da sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e posteriormente ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo radical peroxil, que reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cascata (Lima e Abdalla, 2001). Kühn (2002) relata que a LPO pode causar alterações estruturais nas bicamadas lipídicas, desestabilização nas membranas biológicas e perda da função de barreira entre o meio intra e extracelular, colocando em risco a integridade de organelas e da própria célula.

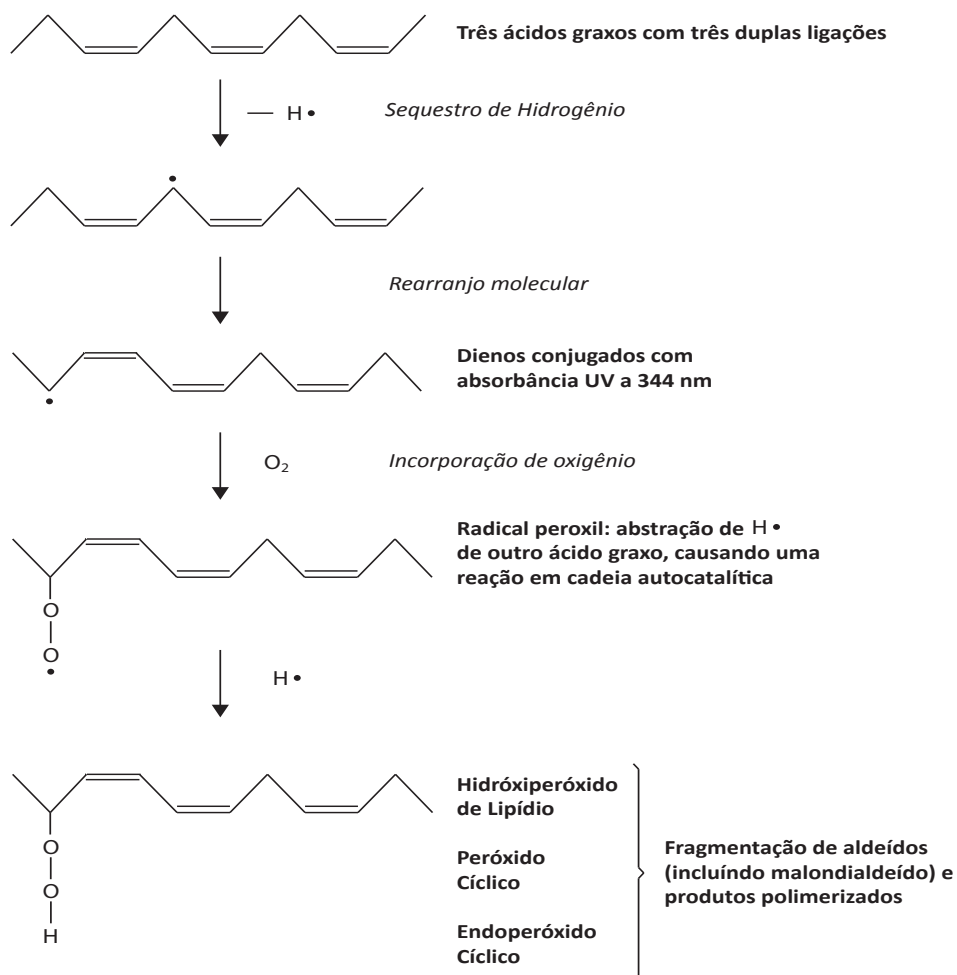


Figura 1. Reação em cadeia da peroxidação lipídica. Adpatado de Haliwell & Chirico (1993).

## 2.3. Consequências da peroxidação lipídica: efeitos do estresse oxidativo

### 2.3.1. Na fertilidade

A LPO é apontada como a principal causa da subfertilidade em galos sob condições de estresse oxidativo (Sikka et al., 1995; Surai et al., 1997). A composição lipídica da membrana espermática faz com que esta apresente elevada susceptibilidade à oxidação. Isso ocorre, pois a membrana dos espermatozoides das aves possui elevada quantidade de AGPI, principalmente das séries n-6 (aracdônico - 20:4n-6 e docosatetraenoico - 22:4n-6) (Kelso et



al., 1997). As ERO atacam abstraindo um hidrogênio da ligação entre carbono e hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado. Este hidrogênio dos AGPI, denominado bis-alílico é mais susceptível à abstração que o hidrogênio dos ácidos graxos saturados, devido à menor energia de dissociação entre as ligações duplas de carbono e hidrogênio (Barreiros et al. (2006).

Os metabólitos produzidos durante a LPO atuam principalmente nas membranas, tanto celular quanto de organelas nucleares e citoplasmáticas. Com isso, estruturas e funções celulares são afetadas, como os mecanismos de transporte, manutenção do gradiente de íons e metabólitos, sinalização da transdução mediada por receptores, além de danos ao DNA mitocondrial (Sikka et al., 1995). Brèque et al. (2003) ainda atribuem à LPO, as lesões nas membranas dos espermatozoides que reduzem sua motilidade e a capacidade de fertilização.

Nas fêmeas, o papel das ERO na infertilidade ainda é pouco elucidado, porém, acredita-se que o sistema reprodutor feminino também esteja exposto ao estresse oxidativo (Agarwal et al., 2005).

Para Livingston et al. (2009), fatores como o excesso de células leucocitárias, presença de espermatozoides, ativação oocitária e interferência luminosa, podem aumentar a produção das ERO. Como ocorre nos machos, o estresse oxidativo parece danificar os embriões por levar à peroxidação dos fosfolipídios das membranas e à alteração de grande parte de moléculas celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Segundo os autores, as consequências destes danos incluem a suspensão do desenvolvimento embrionário, morte celular programada e alterações em nível mitocondrial.

### 2.3.2. No pinto recém eclodido

As enzimas de defesa antioxidante possuem diferentes perfis de atuação durante o desenvolvimento embrionário e pós-eclosão. Um desequilíbrio entre as defesas e a produção de radicais livres pode resultar em graves danos. Para entender melhor a expressão específica dessas enzimas nos tecidos, Surai (1999) avaliou o fígado, cérebro, saco vitelino, rins, pulmão e músculos esqueléticos de embriões nos seguintes estágios de desenvolvimento entre dez e 21 dias, além do pinto com um dia de vida. O autor encontrou diversos valores para as atividades enzimáticas durante os diferentes momentos de desenvolvimento: no fígado, a atividade específica da glutathiona peroxidase (GSH-Px) se elevou durante todo o período

avaliado, enquanto que o cérebro apresentou elevada atividade da superóxido dismutase (SOD) principalmente nos últimos dias da incubação, indicando sua importância neste órgão. No saco vitelino, a máxima atividade enzimática foi detectada aos 15 dias de incubação. A concentração de GSH-Px gradualmente decresceu, atingindo valores de cinco a nove vezes menores em comparação aos demais tecidos estudados. No entanto, estudos de Gaal et al. (1995) e Surai et al. (1996) indicaram elevados níveis de vitamina A, E e carotenoides e redução da susceptibilidade à LPO no terço final da incubação. Estes achados indicam que aos 15 e 16 dias, este órgão está exposto ao estresse oxidativo, como mostra a elevação das enzimas antioxidantes neste período. No entanto, à medida que o saco vitelino começa a ser absorvido, as enzimas antioxidantes decresceram de forma semelhante. Nestes estudos, os autores concluíram que os tecidos expressam diferentes formas de defesa antioxidante para driblar os danos do estresse oxidativo em diversos momentos do desenvolvimento embrionário.

Surai et al. (1999a) avaliaram a susceptibilidade à lipoperoxidação nos tecidos de pintos recém eclodidos através da mensuração de enzimas antioxidantes, malondialdeído (MDA) e composição em ácido graxo de diversos órgãos. O cérebro foi o órgão que apresentou maior susceptibilidade à LPO, exibindo níveis elevados de MDA. Fígado, pulmão, rins, músculo esquelético e coração apresentaram concentrações de MDA estatisticamente semelhantes, enquanto que o saco vitelino foi o órgão com o menor nível de malondialdeído. O fígado apresentou elevados níveis de GSH-Px, catalase e ácidos graxos 20:4n-6 e 22:n6-3, além de uma máxima acumulação de vitamina E e carotenoides no momento após eclosão, fazendo com que a susceptibilidade à LPO seja reduzida neste órgão no momento supra citado. Este parece ser um mecanismo adaptativo para proteção tissular durante o estresse oxidativo no momento da eclosão devido à elevada concentração de AGPICL mensurada neste órgão.

Em continuidade ao estudo acima, Surai et al. (1999b), objetivando minimizar os danos do estresse oxidativo nos tecidos com maior susceptibilidade à LPO em pintos recém eclodidos, suplementaram a dieta de matrizes Ross com dois níveis de vitamina E: 147 mg/kg (controle) e 365 mg/kg de ração (nível alto). Os órgãos avaliados foram fígado, cérebro, pulmões e saco vitelino. Os pintos provenientes de matrizes alimentadas com o nível alto de alfa-tocoferol apresentaram reduzida susceptibilidade à peroxidação em relação ao grupo

controle. O cérebro foi o órgão com maior redução das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, um indicador da lipoperoxidação, se igualando aos demais órgãos avaliados.

#### **2.4. As defesas antioxidantes**

Pela clássica definição de Halliwell e Gutteridge (1998), antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, o regenera ou previne sua oxidação. Os sistemas de defesas antioxidantes podem ser enzimáticos ou naturais.

O sistema enzimático é composto pela GSH-Px, a catalase e a SOD, incluindo suas duas formas: a manganês dependente (Mn-SOD) e a cobre e zinco dependente (Cu,Zn-SOD). A primeira linha de defesa contra os íons superóxido são as SODs. No entanto, o peróxido de hidrogênio formado por uma reação de dismutação é altamente tóxico, devendo então ser removido pela GSH-Px e catalase. A GSH-Px, em sua forma selênio dependente, além de destruir o peróxido de hidrogênio, também inativa hidroperóxidos lipídicos, prevenindo a lipoperoxidação (Surai et al., 1998).

Dentre os antioxidantes naturais ou não enzimáticos, destacam-se os carotenoides, ubiquinonas (coenzima Q), bilirrubina, ácido úrico, a vitamina C e a vitamina E. Estas substâncias podem atuar removendo o agente oxidante, prevenindo lesões, ou reparando os danos celulares já causados (Andrade et al., 2010).

Rosa et al. (2010) alimentaram matrizes com 6 ppm de cantaxantina (um tipo de pigmento carotenoide) e verificaram aumento de 1,08% na fertilidade. Rocha (2011) suplementando a dieta de galos e galinhas de idade avançada (50 a 60 semanas) com 6 ppm de cantaxantina, verificou melhoria na fertilidade do lote, de acordo com os períodos de armazenamento dos ovos de 3 ou 7 dias. A melhoria da fertilidade foi atribuída aos efeitos da cantaxantina tanto no galo quanto na galinha. Os fatores relacionados ao galo seriam a proteção antioxidante dos espermatozoides e aumento da quantidade de vitamina A. O aumento da fertilidade nas fêmeas foi atribuído à melhoria do mecanismo antioxidante nos túbulos de armazenamento de espermatozoides (SST - sigla do inglês *sperm storage tubules*), localizados na junção útero-vaginal.

O sistema antioxidante presente no plasma seminal possui uma ação relativamente curta, permanecendo desde a ejaculação até sua transferência para o sistema reprodutor feminino; a partir daí, a membrana do espermatozoide assume a proteção antioxidante, mantendo sua atividade por períodos mais prolongados (Brèque et al., 2003). Esta proteção deve cobrir tanto o período de armazenamento nos ductos deferentes que vai de um a três dias quanto o tempo de estoque no trato genital da fêmea, que pode ser superior a três semanas (Rutz et al, 2005).

No oviduto, os espermatozoides são armazenados por longos períodos e sob temperaturas altamente propícias à LPO (Brillard et al., 1987). Segundo Surai et al. (2000) essa condição desfavorável à viabilidade espermática, faz com que estratégias antioxidantes sejam também desenvolvidas no sistema reprodutor feminino. Após a ejaculação, o plasma seminal ainda exerce função de proteção, porém é rapidamente substituído por um fluido secretado pelo oviduto, que tem a função de preservar a estabilidade da membrana e garantir a fertilização; neste fluido, há um complexo mecanismo no qual substâncias antioxidantes como as vitamina C e E, GSH-Px e SOD estão ativadas (Rutz et al., 2005).

Brèque et al. (2003) descobriram que a vitamina E exerce um papel de fundamental importância nos túbulos de armazenamento de espermatozoides. Os autores também afirmam que a queda de fertilidade em aves mais velhas se deve em parte à redução da eficiência da proteção antioxidante nos SST devido à diminuição nos níveis das vitaminas C e E.

No embrião, as defesas antioxidantes incluem enzimas, antioxidantes lipossolúveis naturais como as vitaminas A e E, carotenoides, ácido ascórbico e a forma reduzida da glutathione (Surai, 1996). O ácido ascórbico é sintetizado na membrana do saco vitelino e transportado a diversos órgãos, particularmente para o cérebro, que apresenta elevados níveis desta substância, em contraste aos baixos níveis de vitamina E e carotenoides (Wilson, 1990; Surai, 1996).

## 2.5. Biomarcadores: mensurando o dano oxidativo

A reação de LPO pode ser avaliada em sistemas biológicos e utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular, utilizando-se de metodologias que medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo (Lima e Abdalla, 2001).

Segundo Zwart et al. (1999), biomarcadores devem possuir características passíveis de avaliação e mensuração, indicando processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Ainda segundo os autores, o biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: alta especificidade para o efeito de interesse, não sofrer interferência de outras moléculas, possuir baixo coeficiente de variação, ser de fácil análise e apresentar baixo custo.

Para monitorar a peroxidação lipídica, uma das técnicas mais utilizadas segundo Lima e Abdalla (2001), devido à simplicidade e baixo custo, se baseia no princípio da quantificação colorimétrica dos produtos de decomposição dos hidroperóxidos, que são denominadas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pelo fato de se conjugarem ao ácido tiobarbitúrico (TBA).

A peroxidação lipídica origina produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos que podem ser utilizados para avaliar o status oxidativo de materiais biológicos. Entre os biomarcadores mais avaliados para a LPO, está o MDA, um dialdeído formado por cisão beta dos AGPI peroxidados (Lima e Abdalla, 2001). Vasconcelos et al. (2007) observaram que o ensaio para quantificação do TBARS baseia-se na reação do MDA com duas moléculas do TBA em meio ácido e com alta temperatura, formando um produto colorido que pode ser medido fluorometricamente ou espectrofotometricamente a 532 nm. Esse método possui a vantagem de poder ser empregado em diferentes tipos de amostras, como tecido, soro ou plasma, além da facilidade e baixo custo (Lima e Abdalla, 2001). No entanto, para Vasconcelos et al. (2007) a desvantagem desse método é que o TBA não é específico para o MDA: o complexo produzido pela ligação do MDA ao TBA não pode ser distinguido dos complexos produzidos a partir de sua ligação com outros aldeídos não oriundos da oxidação lipídica, podendo superestimar os resultados. O MDA pode ainda não reagir com o TBA se ocorrer prévia complexação com proteínas e aminas, o que subestima a

oxidação da amostra (Fellenberg e Speisky, 2006). Devido ao exposto, é preciso cuidado ao avaliar os resultados do teste de TBARS de forma a evitar conclusões equivocadas.

Como mencionado, o estresse oxidativo resulta de uma condição de desequilíbrio em favor dos radicais livres em relação aos níveis de moléculas do sistema de defesa antioxidante. Desta forma, avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra biológica pode nos dar uma boa indicação do dano oxidativo ocorrido. Nos anos 90, uma nova técnica para determinar tal capacidade foi desenvolvida e denominada Capacidade Antioxidante Total (CAT). Segundo Ferrari (2010) a principal vantagem deste teste é medir a capacidade antioxidante de todos os componentes de uma amostra biológica (sangue, urina, fezes), extrato vegetal ou alimento.

O sistema antioxidante não enzimático é constituído principalmente pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM), que desativam diretamente as ERO. Os ABPM podem ser sintetizados endogenamente, ser restos metabólicos, ou advir das dietas. Estão presentes no organismo em número e concentração muito maior que os antioxidantes enzimáticos. Como os ABPM podem ser hidrofílicos ou lipofílicos, estão presentes nos locais específicos em que ocorrem os danos causados por estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1998). A glutatona reduzida (GSH), o ácido úrico e a vitamina C são exemplos de ABPM hidrofílicos. A bilirrubina, o beta caroteno e a vitamina E são exemplos de ABPM lipofílicos.

## **2.6. Amenizando o dano oxidativo: a estratégia de utilização da vitamina E**

### **2.6.1. Vitamina E**

A vitamina E foi descoberta em 1922, sendo reconhecida como um fator lipossolúvel necessário para a reprodução em ratos. Mais tarde, verificou-se que a vitamina E era fundamental não somente para a gestação normal em ratas, mas também na prevenção da esterilidade em ratos machos (Mason, 1933) e em galos (Adamstone e Card, 1934). Estudos realizados no mesmo período também apontaram a vitamina E como um fator de prevenção da encefalomalacia em pintos, assim como da distrofia muscular em porcos da Índia (Scott, 1978).

O alfa-tocoferol é a forma mais ativa da vitamina E devido à sua alta afinidade pela alfa-tocoferol transferase hepática (Hosomi et al., 1997). Sete outras formas podem ser encontradas na natureza: beta-, gama- e sigma-tocoferol e alfa-, beta-, gama- e sigma-tocotrienol, as quais são diferentes das formas tocoferol por possuir três ligações duplas na cadeia lateral insaturada (Harris, 1972). Essas formas são encontradas quase que exclusivamente em plantas e apenas em pequenas quantidades em tecidos animais, prevalecendo a forma alfa-tocoferol. As principais fontes de tocoferóis são o gérmen de trigo, milho, sementes de algodão e girassol e óleo de soja.

A vitamina E pode ser natural (“d”) ou sintética (“dl”) sendo que a diferença entre as mesmas está na estrutura química. A forma “dl” necessita ser hidrolisada antes de ser absorvida, o que a torna menos ativa quando comparada à forma natural (Traber e Atkinson, 2007).

#### 2.6.1.1. Papel metabólico

As principais funções metabólicas da vitamina E podem ser resumidas em: auxílio ao sistema da citocromo *c* redutase (Nason e Lehman, 1956); participação na síntese do ácido ascórbico (Caputto et al., 1958; Kitabchi et al., 1960) e na síntese de ubiquinonas (Green et al., 1961) além do controle da permeabilidade e estabilidade de membranas celulares (Lucy, 1972). No entanto, todas estas funções se tornam secundárias ao seu principal papel: proteção de membranas celulares através da eliminação de radicais peroxil (*scavenger*) (Traber e Atkinson, 2007).

Wang et al. (1999) relatam que nas membranas celulares, o alfa-tocoferol ( $\alpha$ -TOC) é considerado o principal antioxidante lipossolúvel, sendo capaz de prevenir o dano oxidativo aos AGPICL, preservando a estrutura e integridade funcional de organelas sub-celulares. A vitamina E alivia os efeitos da LPO convertendo os agressivos radicais peroxil em formas menos reativas, como os hidroperóxidos (Figura 2).

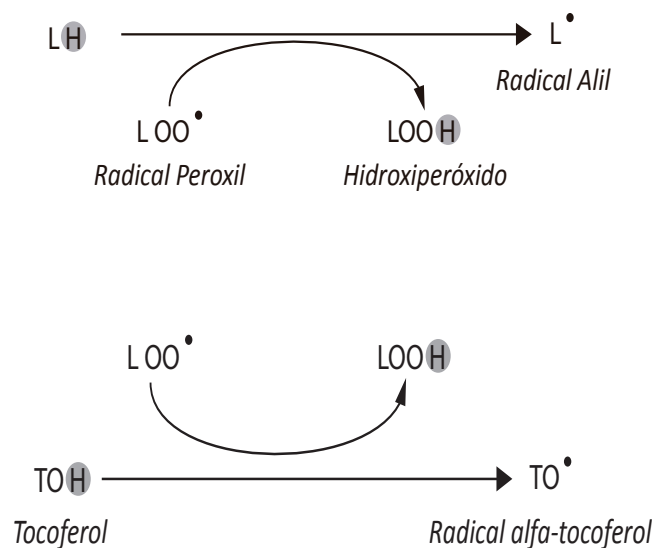


Figura 2. Modo de ação da vitamina E: o radical peroxil ( $\text{LOO}^\bullet$ ) abstrai um hidrogenio bisalilico de um lipidio polinsaturado (LH), formando um radical alil ( $\text{L}^\bullet$ ) e um hidroperoxido ( $\text{LOOH}$ ). A reação de LPO se propaga quando o radical alil (lipídico) reage com um oxigênio. Mas a vitamina E bloqueia essa propagação. Ela reage com o radical peroxil antes que ele reaja com o lipídio (bem mais rápido), formando produtos estáveis como o hidroperóxido e o radical alfa-tocoferol ( $\text{TO}^\bullet$ ), encerrando a reação em cadeia da LPO. Adaptado de Wang et al. (1999).

A ação antioxidante da vitamina E é complementar à enzima glutationa peroxidase selênio dependente (Se-GSH-Px). De forma semelhante à vitamina E, a Se-GSH-Px previne a destruição das membranas plasmáticas antes que ocorra elevação na permeabilidade de capilares, destruindo hidroperóxidos dos AGPI tão logo estes sejam formados (Scott et al., 1974). Desta maneira, o selênio pode ser considerado como uma substância poupadora da vitamina E, atuando como uma segunda linha de defesa na porção aquosa das células, protegendo organelas vitais como as mitocôndrias e lisossomos (Leeson e Summers, 1997).

Em um estudo de Thompson e Scott (1970), tanto o selênio quanto a vitamina E preveniu completamente a diátese exudativa em aves. A vitamina E atuou se ligando e protegendo as membranas microssomais, enquanto que a proteção do selênio está diretamente ligada à enzima GSH-Px. Os autores encontraram uma relação direta entre a lise mitocondrial hepática e a taxa de peroxidação lipídica, medida pela concentração do MDA através do



método TBARS. Para Scott et al. (1974) estes resultados demonstram a aplicabilidade do TBARS como um indicador do dano peroxidativo.

#### 2.6.1.2. Inter-relação com a vitamina A

A vitamina E possui um efeito poupador da vitamina A no fígado, como demonstrado por Sondergaard (1972). O autor relatou que a presença de vitamina E na dieta de ratos, resultou na preservação do retinol hepático durante o período com deficiência desta vitamina, apesar da presença ou ausência de suplementação dietética de AGPI (óleo de fígado de bacalhau). Desta forma, a função antioxidante da vitamina E estabelece um sinergismo à vitamina A, economizando-a.

Em contraste à ação sinérgica supracitada, o excesso de vitamina A pode interferir na absorção da vitamina E. Provavelmente, devido ao fato de ambas serem lipossolúveis e competirem pelo mesmo sítio de absorção (Bjorneboe et al., 1990). O antagonismo entre as vitaminas A e E ocorre no intestino, porém, ainda há dúvidas sobre o seu mecanismo de atuação. March e Biely (1963) sustentam que o antagonismo ocorre por meio do impedimento na formação da micela intestinal e interferência na absorção de substâncias lipossolúveis, como ocorre com o colesterol. Seward et al. (1964) afirmam que a vitamina A influencia na permeabilidade da mucosa intestinal ao tocoferol, e por último, Green et al. (1967) sugeriram que a altas concentrações de vitamina A promovem a oxidação da vitamina E.

Combs (1976) trabalhou com elevados níveis de vitamina A ( $1,5 \times 10^6$  UI) a fim de determinar a natureza da interação entre esta, a vitamina E e o selênio. Resultados indicaram que matrizes alimentadas com alta concentração de vitamina A, apresentaram deficiência de tocoferol plasmático, assim como baixos níveis de GSH-Px. De forma semelhante, a progênie também apresentou níveis muito baixos de vitamina E no plasma, indicando baixa deposição desta na gema dos ovos. O aumento da absorção do selênio com consequente uso na enzima GSH-Px também foi observado através da drástica redução da diátese exudativa nas aves. Já Surai et al. (2000) afirmaram que elevadas quantidades de vitamina A reduzem as enzimas GSH-Px e SOD no fígado e cérebro de pintos nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-eclosão, comprometendo o sistema de defesa antioxidante.

Sklan e Donoghue (1982) avaliaram a resposta da vitamina E frente a altos níveis de vitamina A na dieta de pintos de corte de acordo com os seguintes tratamentos: ausência de tocoferol e 2.776 UI/kg palmitato de retinil; grupo controle: 10 mg/kg tocoferol e 2.776 UI/kg palmitato de retinil; 100 mg/kg tocoferol e 2.776 UI/kg palmitato de retinil; 10 mg/kg de tocoferol e 12.000.000/kg palmitato de retinil e 100 mg/kg tocoferol e 12.000.000 UI/kg palmitato de retinil. Os autores verificaram redução na concentração de vitamina E no plasma e fígado das aves à medida que se elevava a vitamina A nas dietas. Estes pesquisadores concluíram também, que o aumento nos níveis de vitamina E causam elevação nos níveis de retinil, confirmando o efeito poupador pelo alfa-tocoferol.

Abawi e Sullivan (1989) estudaram os efeitos da interação entre as vitaminas lipossolúveis e verificaram que níveis mais elevados de vitamina E elevaram a concentração de vitamina A no plasma de frangos de corte. Os níveis estudados de vitamina E e A foram zero, 10 e 100 UI/kg e 1.000, 10.000 e 100.000 UI/kg, respectivamente.

O efeito da inter-relação entre a vitamina A e E também foi avaliado por Surai et al. (1998). Os autores suplementaram a dieta de galinhas Rhode Island Red<sup>®</sup> com níveis que variaram entre zero a 120 mg/kg de acetato de retinol e observaram uma significativa redução na concentração de vitamina E no fígado das aves, em contraste a uma elevada quantidade de vitamina A, diretamente proporcional à quantidade fornecida. O mesmo comportamento foi observado na gema do ovo, porém, além da redução da vitamina E, ocorreu também redução de pigmentos carotenoides. As quantidades de vitamina E, carotenoides e ácido ascórbico também foram reduzidas no fígado de embriões e pintos de um dia provenientes das galinhas alimentadas com os maiores níveis de retinol. Devido à redução dos níveis do alfa-tocoferol por ação do antagonismo com a vitamina A, a susceptibilidade à lipoperoxidação no fígado da progênie foi amplificada, comprometendo suas defesas antioxidantes.

Mori et al. (2003) investigaram os efeitos da suplementação da vitamina A (zero, 15.000 e 30.000 UI) e E (zero, 200, 400 e 600 mg/kg) sobre as concentrações de retinol e tocoferol na gema do ovo. Foi observado um decréscimo na concentração do alfa-tocoferol à medida que a vitamina A foi aumentada, indicando o efeito adverso do acetato de retinol dietético na deposição de vitamina E na gema.

### 2.6.1.3. Absorção, estocagem e transporte de vitamina E para a gema do ovo

Por ser uma substância lipossolúvel, o processo de absorção da vitamina E segue padrão semelhante à absorção dos lipídios nas aves, sendo dependente da ação dos sais biliares, formação de micelas e incorporação aos portomícrons (equivalente aos quilomícrons nos mamíferos) no interior dos enterócitos para o posterior transporte que será detalhado à frente. A eficiência de absorção da vitamina E parece ser maior quando solubilizada em micelas contendo triglicerídios com ácidos graxos de cadeia média, quando comparada aos de cadeia longa (Ball, 1998).

O alfa-tocoferol, juntamente com as demais vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos livres, colesterol e sais biliares sofre emulsificação, formando as micelas mistas. Estas, por possuírem uma superfície hidrofílica que envolve e protege a parte hidrofóbica, facilita o transporte dos lipídios e vitaminas lipossolúveis através da camada aquosa estacionária dos enterócitos. A vitamina E fornecida nas dietas para as aves, normalmente encontra-se sobre a forma de dl-alfa-tocoferil acetato. Para que sua absorção ocorra de maneira otimizada, a lipase pancreática é necessária para auxiliar na sua clivagem (Brigelius-Flohe e Traber, 1999).

Nos enterócitos, as substâncias lipossolúveis são empacotadas pelos portomícrons, além de se conjugarem a lipoproteínas, para serem liberadas na veia porta, seguindo diretamente ao fígado, sem passar pelo sistema linfático, que é pouco desenvolvido nas aves. No fígado, alguns portomícrons sofrem modificações para formar parte da fração da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Esta etapa é fundamental no transporte da vitamina E para os tecidos, pois as lipoproteínas são as substâncias capazes de manter os lipídios em solução aquosa durante o seu transporte (Champe et al., 2006). Desta forma, quando as VLDL atingem os tecidos, os triglicerídeos que a compõem sofrem hidrólise pela lipase lipoproteica, liberando ácidos graxos livres e as vitaminas lipossolúveis (Bjorneboe et al., 1990).

Para que o alfa-tocoferol possa ser transportado até a gema, uma lipoproteína ligeiramente diferente da VLDL é utilizada: a VLDLg. A principal e notável diferença entre elas, reside no fato da VLDLg ser resistente à ação da lipase lipoproteica, mesmo sendo rica em triglicerídeos e vitaminas lipossolúveis. Desta forma, a VLDLg é assertiva na entrega da vitamina E à gema do ovo, disponibilizando-a para o desenvolvimento adequado do embrião.

Esta resistência ocorre pelo fato da VLDLg ser composta pela VLDL-II, que é inibidora da lipase lipoproteica (Schneider et al., 1990; Elkim, 2006)

#### 2.6.2. Suplementação de vitamina E em dietas de matrizes pesadas

Recentemente tem sido proposto que as exigências de substâncias antioxidantes variam de acordo com a susceptibilidade à oxidação dos tecidos animais e não somente à necessidade de prevenção de sinais clínicos de deficiência (Wang et al., 1996). Por isso, o requerimento de vitamina E é muito variável e depende de fatores como a concentração e tipo de gorduras utilizadas nas dietas, temperatura ambiente a que as aves estão submetidas (Kirunda et al. 2001), estresse no momento da eclosão devido à mudança para respiração pulmonar (Surai et al. 1999b), além da presença de substâncias pró oxidantes ou antioxidantes (Leeson e Summers, 1997).

A ingestão inadequada de nutrientes envolvidos no sistema de defesa antioxidante, como a vitamina E, é considerada uma importante causa do estresse oxidativo. Por isso, a suplementação dietética desta vitamina tem sido utilizada como forma de aliviar os efeitos nocivos da LPO, tanto em aves adultas, melhorando a fertilidade e eclosão, quanto em sua progênie, minimizando o estresse oxidativo (Surai, 2000). A recomendação do NRC (1994) para galinhas em postura é de 5 UI/kg de ração, no entanto, para Surai (2006) este valor pode estar subestimado, pois no sistema de produção de matrizes pesadas, situações como flutuações de temperatura ambiente e umidade relativa do ar, incidência de doenças, reações vacinais, ingredientes de baixa qualidade nutricional, entre outros, podem levar ao desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade de proteção, elevando a demanda por antioxidantes.

A exigência de vitamina E nas aves de produção atuais já não pode ser suprida pela recomendação do NRC (1994). Em estudos para matrizes pesadas, Leeson e Summers (1997) e Rostagno et al. (2011) recomendaram 25 e 40 ppm de vitamina E, respectivamente. No entanto, sabendo-se que o alfa-tocoferol é responsável por 88% das defesas antioxidantes do sêmen, Surai et al. (1997) propõem o uso de 150 a 200 ppm para se obter redução dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. Para os autores, esta suplementação deve ser realizada no momento em que a queda na fertilidade é mais pronunciada, ou seja, a partir de 40 a 45 semanas.

Quanto aos valores para a concentração de vitamina E encontrados na gema, existem divergências na literatura. Frigg et al. (1992) reportaram uma concentração de vitamina E na gema do ovo de 700 mg/kg adicionando 320 mg/kg de dl-alfa-tocoferil à dieta. Surai et al. (1995), suplementando dietas de matrizes com 200 mg/kg de alfa-tocoferil acetato, obtiveram o valor de 1.200 µg/g de alfa-tocoferol na gema. Já Meluzzi et al. (1999) obtiveram a concentração de 210 µg/g de vitamina E na gema, quase seis vezes mais baixa que a obtida por Surai et al. (1995), com o mesmo nível de suplementação. Lin et al (2005) alcançaram a concentração de 97,8 mg/kg para a suplementação com 160 mg. Estas diferenças, que são expressivas, podem ser atribuídas a fatores como genéticas das aves utilizadas nos ensaios e o tipo de alfa-tocoferol fornecido (Galobart et al. 2002).

Eid et al. (2006) avaliaram o efeito da adição de vitamina E às rações de galos da linhagem Lohmann<sup>®</sup>, com 46 semanas de idade sob estresse oxidativo induzido pela dexametasona. As aves foram divididas em quatro grupos: dexametasona + solução salina; 200 mg/kg de vitamina E + solução salina; 200 mg/kg de vitamina E + dexametasona e grupo controle com solução salina. A qualidade do sêmen (contagem, motilidade e viabilidade espermática) foi superior no grupo suplementado com vitamina E quando comparado ao grupo que recebeu apenas a dexametasona. Este resultado pode ser justificado pela menor atividade de peroxidação lipídica nas aves alimentadas com o alfa-tocoferol, indicada pelo TBARS. Observou-se também, que a atividade da GSH-Px aumentou nos grupos suplementados com a vitamina E, sugerindo um sinergismo entre as duas substâncias na proteção espermática.

Khan et al. (2012) forneceram rações com o nível de 100 UI/Kg de vitamina E a galos velhos da linhagem Hubbard<sup>®</sup> (65 semanas de idade) e avaliaram os efeitos na qualidade do sêmen após os mesmos serem submetidos ao processo de muda com óxido de zinco. Motilidade espermática e volume de sêmen foram superiores no grupo alimentado com o alfa-tocoferol, enquanto que a porcentagem de espermatozoides mortos foi significativamente reduzida.

Em contradição aos resultados supracitados, Santos et al. (2009) suplementaram a dieta de machos e fêmeas Cobb<sup>®</sup> (50 semanas de idade) com níveis crescentes de vitamina E (0, 150, 250 e 350 mg/kg de ração) e não observaram influência nas medidas testiculares e no número de espermatozoides no momento da fertilização no oócito. Porém, não foram feitas

avaliações das defesas antioxidantes e também do grau do dano oxidativo ocasionado pela lipoperoxidação no sêmen.

### 2.6.3. Efeitos nos componentes do ovo, fertilidade, eclosão e progênie

Os componentes e a qualidade dos ovos podem ser influenciados pela suplementação de vitaminas. Segundo Kirunda et al. (2001) as unidades Haugh e o pH do albúmen podem ser alteradas com a suplementação de vitamina E. Os autores observaram aumento nas unidades Haugh e decréscimo do pH do albúmen a partir de 60 mg/kg de fornecimento nas dietas para aves em estresse calórico. A alcalinização do albúmen está relacionada à deterioração da qualidade devido à instabilidade do complexo ovomucina-lisozima, que se dissocia, promovendo a liquefação do albúmen (Kato & Sato, 1972). A melhoria da qualidade interna dos ovos mensurada pela unidade Haugh também foi observada por Andi et al. (2006), fazendo com que os autores concluíssem que níveis superiores a 20 mg/kg de vitamina E são capazes de influenciar positivamente a qualidade dos ovos.

Barreto et al. (1999) avaliaram o efeito da suplementação de dois níveis de vitamina E, 25 e 250mg/kg sobre o desempenho e composição do ovo de matrizes pesadas, entre 24 e 54 semanas de idade e sobre o desempenho de suas progênies. Os autores concluíram que os parâmetros de produção de ovos, número de ovos/ave alojada, peso do ovo, viabilidade, peso corporal das fêmeas no final do experimento e a porcentagem de gema no ovo não foram influenciados pelos tratamentos. Maior concentração de alfa-tocoferol na gema foi obtida em ovos de matrizes que receberam dieta suplementada com 250 mg de vitamina E /kg. O rendimento de incubação não foi influenciado pelos tratamentos ( $p>0,05$ ). Porém, maior peso ao nascer foi encontrado na progênie proveniente de reprodutoras com 32 semanas de idade, que receberam dieta com maior nível de vitamina E.

Surai et al. (1995) observaram que a deposição de alfa-tocoferol nos ovos de galinhas alimentadas com 200, 2.000 e 20.000 mg/kg se elevou de maneira dose dependente até 20 dias após o início do fornecimento das dietas experimentais. Após este período, a concentração permaneceu constante por duas semanas. Durante as quatro semanas seguintes, a concentração se reduziu para aproximadamente 50%, permanecendo desta maneira durante o restante do período de suplementação. Meluzzi et al. (1999) verificaram o pico máximo na deposição de alfa-tocoferol (330  $\mu$ /g de gema) com três semanas após suplementação de 200

mg/g. A redução ocorreu durante a quarta semana e se estabilizou no nível de 210  $\mu$ /g de gema, permanecendo constante deste então.

Para evitar os danos causados pela lipoperoxidação, o pinto recém eclodido possui várias linhas de defesas antioxidantes. Entre as quais, se encontra a vitamina E, que pode ser considerada como o principal antioxidante lipossolúvel em tecidos animais (Sies, 1993; MacPherson, 1994).

A vitamina E fornecida via dieta materna é “pré-empacotada” na gema durante a maturação do ovócito (Griffin et al., 1984). Após a fertilização e o início da embriogênese, esta é distribuída aos tecidos em desenvolvimento do embrião via saco vitelino e circulação sanguínea (Noble et al., 1993; Gaal et al., 1995; Speake et al., 1996). Desta maneira, a quantidade de vitamina E presente na gema e conseqüentemente disponível para o desenvolvimento do embrião, depende do seu fornecimento na dieta materna (Cherian e Sim, 1997).

Os tocoferóis são transportados pela circulação através de lipoproteínas, mais precisamente pela VLDL. A liberação destas lipoproteínas no embrião ocorre através de hidrólise pela lipase lipoproteica, localizada nos capilares de tecidos embrionários (Shand et al., 1994). O fígado é um dos tecidos com maior capacidade de expressão da lipase lipoproteica, e por isso, capaz de acumular grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis provenientes da gema, como o alfa-tocoferol (Speake et al. 1993). Este fato faz com que o fígado seja o órgão com maior deposição de vitamina E durante o desenvolvimento embrionário (Gaal et al., 1995).

Durante o desenvolvimento embrionário, cerca de 80% dos lipídios da gema são absorvidos e transformados pelo fígado em AGPICL (C<sub>20</sub> e C<sub>22</sub> - ácido aracdônico e docosahexanoico) (Noble e Cochi, 1990). O processo de eclosão, marcado pela mudança da respiração corioalantoidea para a pulmonar, expõe o embrião a um ambiente rico em oxigênio. Desta forma, a taxa de metabolismo oxidativo se eleva em cerca de 60% (Visschedijk, 1968), o que pode aumentar a necessidade de proteção contra o dano peroxidativo em tecidos ricos em AGPI, como o cérebro e o fígado devido à alta produção de radicais livres (Cherian e Sim, 1997). Surai et al. (1997), com o objetivo de elucidarem esta questão, incubaram ovos provenientes de galinhas da linhagem Ross<sup>®</sup> alimentadas com

concentrações crescentes de alfa-tocoferol (60, 155, 272 e 376  $\mu\text{g/g}^{-1}$ ) e mensuraram os níveis de vitamina E no fígado, cérebro, coração e rins. O fígado dos pintos recém-eclodidos foi o órgão que apresentou a maior concentração desta vitamina em comparação aos demais, sendo proporcional à quantidade inicial na gema. O cérebro foi o órgão que apresentou o menor nível de alfa-tocoferol, com apenas 1% do valor encontrado para o fígado, porém diretamente proporcional aos níveis encontrados inicialmente na gema. Com estes resultados, os autores afirmaram que a concentração da vitamina E na gema teve efeito direto nos níveis desta nos tecidos do pinto. Os autores também acreditam que o fígado pode funcionar como um liberador de alfa-tocoferol para outros tecidos através da circulação por meio das VLDL. Desta forma, a elevada acumulação de vitamina E no fígado pode melhorar a capacidade antioxidante de outros órgãos da ave.

Trabalhando com matrizes pesadas de 17 a 35 semanas de idade, Lin et al. (2005), utilizaram os níveis de zero, 40, 80 120 e 160 mg/kg de vitamina E na ração destas galinhas. Os níveis de suplementação dietética de vitamina E afetaram a concentração desta na gema, sendo diretamente proporcional à quantidade fornecida. O cérebro dos pintos recém eclodidos, por ser altamente susceptível ao estresse oxidativo devido a elevada quantidade de AGPI, foi avaliado para se verificar o grau de lipoperoxidação através da quantificação do MDA, que decresceu linearmente com o aumento dos níveis de vitamina E. Houve também uma elevação da atividade da SOD, da catalase no cérebro e da catalase no fígado a partir do nível de 120 mg/kg, sugerindo aumento das defesas das membranas celulares contra os radicais livres. Este estudo indicou que o fígado e o cérebro são órgãos que podem ter o sistema antioxidante alterado através da suplementação dietética com a vitamina E. No entanto, Combs (1981), fornecendo 100 mg/kg de acetato de alfa-tocoferol à galinhas, afirmou que as enzimas GPx, catalase e SOD não foram afetadas em pintos recém eclodidos.

O estresse oxidativo tem influência direta sobre a função reprodutiva (Sikka et al., 1995). Durante a eclosão e o período pós natal, Surai et al. (1996) observaram que este evento pode levar a privação de nutrientes para o embrião e gerar danos tissulares irreversíveis. Com o objetivo de aliviar estes efeitos, Tsai et al. (2008), avaliaram cinco níveis de suplementação de vitamina E (zero, 40, 80, 120 e 160 mg/kg) para matrizes. A dieta basal continha 16,1 mg/kg de vitamina E. O fornecimento teve início com 17 semanas e os ovos foram coletados com 28 semanas de idade, após as aves serem inseminadas artificialmente. O nível de 40 mg/kg apresentou os melhores resultados para fertilidade e eclosão e o nível de 160 mg/kg foi



semelhante ao tratamento controle, com os piores resultados. Os autores também observaram que a transferência do alfa-tocoferol para gema do ovo atingiu um platô no nível de 120 mg/kg. Neste nível, os autores verificaram maiores níveis de alfa-tocoferol no cérebro da progênie e menores níveis dos indicadores do estresse oxidativo, MDA e ROS neste mesmo órgão.

An et al. (2010), suplementaram a dieta de matrizes pesadas de 36 semanas de idade com os níveis de 20 e 100 mg/kg de vitamina E. Os autores observaram redução significativa do peso do ovo, peso da casca e peso do albúmen para o nível de 100 mg/kg, além de redução da concentração do MDA na gema do ovo. A eclosão sobre os ovos totais e férteis não foi influenciada pelos níveis de vitamina E. No entanto, a fertilidade foi menor com a suplementação de 100 mg/kg. Foram também avaliados o peso do pinto, que não foi afetado pelos níveis e os pesos relativos do coração e fígado, estes sim aumentados pelo nível de 100 mg/kg.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Local**

O experimento foi realizado no período de 21 de agosto a 01 de novembro de 2012.

A coleta dos ovos foi realizada na granja de matrizes da empresa Rio Branco Alimentos, localizado no município de Pitangui, MG.

A incubação e avaliações das taxas de eclosão, mortalidade embrionária e fertilidade foram realizadas no incubatório da mesma empresa, localizado no município de São José da Varginha, MG.

As avaliações de vitamina A e E na gema do ovo, fígado, saco vitelino e rações foram realizadas no Laboratório CBO, localizado em Campinas.

As avaliações das características dos ovos foram realizadas no Laboratório de Metabolismo Animal da UFMG e as avaliações dos indicadores do estresse oxidativo foram realizadas na Faculdade de Farmácia desta mesma universidade.

#### **3.2. Galpões e Aves**

O experimento foi conduzido em dois núcleos distintos compostos pelo mesmo lote de matrizes Cobb<sup>®</sup>, localizados em posição geográfica semelhante. Estes núcleos foram escolhidos após serem submetidos a um período de monitoramento das taxas de fertilidade e eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados, na 52<sup>a</sup> a 53<sup>a</sup> semana de idade das aves. As médias das taxas de fertilidade e eclosão foram comparadas pelo teste F e não apresentaram diferenças significativas. Este período de monitoramento foi necessário para garantir a semelhança estatística entre os núcleos antes do início do fornecimento das dietas experimentais.

Cada núcleo tinha quatro galpões, havendo em cada um dos mesmos, 9.250 fêmeas e 925 machos. Cada galpão foi dividido em dois boxes, com separação equivalente das aves, visando o objetivo de compor uma repetição. Desta forma, cada núcleo foi composto por oito boxes com 4.625 fêmeas e 462 machos.

O período experimental compreendeu a faixa etária das matrizes de 52 a 59 semanas.

### 3.3. Manejo das matrizes e rações

As dietas experimentais foram oferecidas de 54 a 59 semanas de idade, compreendendo os períodos de adaptação e coleta de resultados, que foram de quatro e duas semanas, respectivamente. O período de adaptação corresponde à duração da espermatogênese por 17 dias, somado ao período de estocagem do espermatozoide no ducto deferente por mais cinco dias. Além disso, os espermatozoides podem permanecer viáveis por até 32 dias nos túbulos de armazenamento de espermatozoides no oviduto (Sesti, 2003). Desta forma, garante-se que o efeito é devido somente aos tratamentos, sem influência de outras variáveis.

As rações foram isonutritivas, exceto pela adição de vitamina E conforme os tratamentos (A ou B, com a suplementação de 40 ou 150 ppm de vitamina E, respectivamente). As rações foram as mesmas para os galos e as galinhas.

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações.

<b>Composição Percentual</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Farelo de soja 46,5%	11,639
Sorgo grão	70,725
Farelo de trigo 15,5%	5,6805
Farinha de carne 43%	3,2882
Sal branco comum	0,3198
Calcário 38%	6,3907
DL-Metionina 98%	0,1057
L-Lisina 80%	0,0881
Treonina 98%	0,0468
Colina 60%	0,0525
Enramicina	0,0125
Vitamina E*	0,0220
Suplemento vitamínico mineral**	0,1500
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>
<b>Níveis Nutricionais calculados</b>	
Energia (kcal/g)	2.750
Proteína bruta (%)	13,90
Cálcio (%)	3,000
Fósforo total (%)	0,554
Fósforo disponível (%)	0,340
Lisina total (%)	0,637
Met + Cis total (%)	0,510
Metionina total (%)	0,307

Sódio (%)	0,160
Vitamina E (mg/kg)*	150,00***

\*Lutavit<sup>®</sup> E 50 contém 50% de vitamina E e foi utilizado na dieta das matrizes do tratamento B para complementar o nível de vitamina E em 150 mg/kg.

\*\*Cada kg de Suplemento Vitamínico Mineral contém: Vitamina A – 8.000 UI; Vitamina D – 2.500 UI; Vitamina E – 40 mg; Vitamina K3 – 2,2 mg; Vitamina B1 – 2,5 mg; Vitamina B2 – 8 mg; Vitamina B6 – 3,5 mg; Vitamina B12 – 15 mcg; Niacina – 35 mg; Ácido Pantotênico – 13 mg; Ácido Fólico – 1,2 mg; Biotina – 150 mcg; Cobre – 10 mg; Ferro – 30 mg; Manganês – 90 mg; Zinco – 80 mg; Iodo – 2,0 mg; Selênio – 0,3 mg; Etoxiqum – 0,167 mg.

\*\*\*Nível de 150 ppm apenas no tratamento B.

Foram coletadas amostras de cada batida das rações experimentais fornecidas as aves, no período de 54 a 59 semanas de vida das aves. Posteriormente feito um pool para as análises da concentração de vitamina E, que foram de 28,5 e 113 ppm para os tratamentos A e B, respectivamente.

### 3.4. Ovos

Os ovos utilizados para compor as bandejas de incubação e para análises laboratoriais foram coletados à 59<sup>a</sup> semana de idade das aves. Para tal, um total de 4.800 ovos foi coletado de cada tratamento, sendo duas caixas com 300 ovos para cada uma das oito repetições (boxes). Todos os ovos foram provenientes de coletas matinais (2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> do dia), eliminando-se os da primeira coleta. O objetivo desta prática foi evitar a influência dos ovos postos no dia anterior nas respostas analisadas.

Foram usados apenas os ovos incubáveis coletados nos ninhos e sem presença de sujidades ou excretas. Imediatamente após a coleta, os ovos foram acondicionados em caixas plásticas limpas, desinfetadas e identificadas de acordo com cada tratamento e repetição. Em seguida foram submetidos ao processo de fumigação com paraformaldeído na concentração de 10g/m<sup>3</sup> e transportados ao incubatório.

Foram montadas 24 bandejas com 96 ovos por tratamento. Os ovos trincados, quebrados, redondos, deformados ou com tamanhos extremos foram descartados. Os ovos incubáveis não foram classificados por faixa de peso, visto que segundo Rocha (2008), a uniformidade obtida no primeiro dia de vida do pinto não se mantém aos 44 dias.

Os ovos foram mantidos na sala de armazenamento por um período de dois dias, com médias de temperatura e umidade relativa do ar (UR) de 19,85°C e 83,1 % respectivamente.

As bandejas com os ovos que compunham os dois tratamentos foram incubadas em uma mesma máquina (marca Casp<sup>®</sup>, modelo CM125) e alocadas de maneira aleatória.

### **3.5. Tratamentos**

Os tratamentos foram definidos pela quantidade de vitamina E suplementada na dieta das aves, da seguinte maneira:

A – ração contendo 40 ppm de suplementação de vitamina E.

B – ração contendo 150 ppm de suplementação de vitamina E.

### **3.6. Dados obtidos**

#### **3.6.1. Porcentagem dos componentes dos ovos**

Para as avaliações da porcentagem dos componentes dos ovos foram avaliados 84 ovos, no dia da incubação, sendo 42 ovos de cada um dos dois tratamentos. Cada ovo foi considerado uma repetição.

Para a determinação da porcentagem dos componentes dos ovos, utilizou-se uma balança eletrônica da marca Marte<sup>®</sup>, modelo AS2000C, com precisão de 0,01g. Os ovos foram pesados individualmente e em seguida foram quebrados, para realizar a separação manual das gemas. A remoção do resíduo de albúmen foi realizada com o auxílio de um papel absorvente. Após este procedimento, as gemas foram pesadas individualmente. As cascas foram lavadas em água corrente, para retirada de resíduos do albúmen, e secas em temperatura ambiente por 24 horas antes da pesagem individual. O peso do albúmen foi obtido pela diferença entre o peso do ovo inteiro e o peso da gema e da casca. As porcentagens de gema, casca e albúmen foram obtidas dividindo-se os valores pelo peso do ovo e multiplicando por 100.

### 3.6.2. Níveis de vitamina A e E na gema dos ovos

Para as avaliações dos níveis de vitamina A e E na gema dos ovos, foram utilizados 60 ovos do dia da incubação, sendo 30 de cada tratamento. Estes ovos foram quebrados para obtenção da gema. As amostras para estas análises foram constituídas por um *pool* de cinco gemas as quais foram congeladas a  $-40^{\circ}\text{C}$ , liofilizadas por 72 horas e armazenadas até o momento das análises. Cada *pool* foi considerado uma repetição e cada tratamento foi constituído por seis repetições.

A análise das vitaminas foi através da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) pelo método descrito por Strohecker (1966). O princípio da análise das vitaminas A e E baseia-se na digestão enzimática das películas de gelatina e extração das vitaminas usando uma mistura de solvente de acetona e tetraidrofurano. O extrato centrifugado é analisado pela CLAE de fase reversa usando a detecção UV a 326nm para vitamina A e 285nm para vitamina E.

### 3.6.3. Rendimento de incubação

Para as avaliações de rendimento de incubação (eclosão e mortalidade embrionária) foram utilizadas 24 bandejas com 96 ovos por tratamento, sendo a média de três bandejas considerada uma repetição.

Os ovos foram transferidos para o nascedouro aos 19 dias e a retirada dos pintos nascidos foi realizada com 504 horas de incubação. Os ovos não eclodidos foram separados e identificados de acordo com as repetições e tratamentos e posteriormente quebrados para realização do embriodiagnóstico.

#### 3.6.3.1. Fertilidade e mortalidade embrionária

A fertilidade e a mortalidade inicial foram avaliadas através de ovoscopia, aos 14 dias e ao final dos 21 dias de incubação, através da quebra dos ovos não eclodidos. No 14º dia de incubação, todas as 48 bandejas utilizadas no experimento passaram por ovoscopia, sendo retirados os ovos claros, os quais foram posteriormente identificados como inférteis ou com

embriões mortos. Ao final dos 21 dias de incubação, os ovos não eclodidos foram quebrados e os inférteis que permaneceram após a ovoscopia foram registrados.

A taxa de fertilidade foi calculada pela equação:  $100 - \% \text{ ovos inférteis}$ .

#### 3.6.3.2. Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos incubados

A taxa de eclosão em relação ao número total de ovos incubados foi calculada a partir do número de pintos nascidos sobre o número total de ovos incubados. A taxa de eclosão total foi calculada pela equação:  $\text{total de pintos nascidos} / 96 \times 100$  (96 foi n° de ovos incubados em cada bandeja).

#### 3.6.3.3. Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos férteis

A taxa de eclosão em relação ao número total de ovos férteis foi calculada a partir do número de pintos nascidos sobre o número total de ovos férteis observado na ovoscopia aos 14 dias de incubação. A taxa de eclosão sobre ovos férteis foi calculada pela equação:  $\text{pintos eclodidos} / (96 - \text{n}^\circ \text{ ovos inférteis}) \times 100$ .

#### 3.6.3.4. Mortalidade embrionária

A taxa de mortalidade embrionária foi avaliada em dois períodos: o primeiro com 14 dias de incubação, conforme explicado no item 3.6.3.1 e o segundo ao final dos 21 dias de incubação. No 14º dia de incubação, todos os ovos passaram por ovoscopia, quando foram retirados os ovos inférteis e aqueles com embriões mortos. Ao final do período de incubação, todos os ovos não eclodidos foram abertos para determinar em que fase ocorreu a mortalidade embrionária. Estes dados foram expressos em relação ao total de ovos férteis incubados, de acordo com o seguinte critério:

- ovos com embriões que morreram no início da incubação (zero a sete dias),
- ovos com embriões que morreram entre oito e 14 dias,
- ovos com embriões que morreram entre 15 e 18 dias,
- ovos com embriões que morreram entre 19 e 21 dias,
- ovos bicados com embriões vivos e mortos,
- contaminados,
- desidratados.

A taxa de mortalidade embrionária foi calculada pela equação:  $n^\circ$  de embriões mortos na fase /  $(96 - n^\circ$  de ovos inférteis)  $\times 100$ . As fases embrionárias foram determinadas conforme critérios estabelecidos por Barbosa (2011).

#### 3.6.4. Peso do pinto no momento após a eclosão

Após as 504 horas de incubação, os pintos eclodidos foram alocados em 48 caixas identificadas de acordo com cada tratamento e repetição. Os pintos foram contados e pesados no interior da caixa utilizando-se uma balança com precisão de 0,5 g. O peso médio dos pintos foi determinado dividindo-se o peso da caixa (menos a tara) pela quantidade de aves da mesma.

#### 3.6.5. Peso do saco vitelino, fígado e coração e concentração de vitamina E no fígado e saco vitelino

Para a obtenção do peso do saco vitelino, fígado e coração, 60 pintos, sendo 30 de cada tratamento, foram coletados de forma aleatória nas bandejas de acordo com os tratamentos. Os pintos foram sacrificados por deslocamento cervical de acordo com procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, sob protocolo 250/11. Os mesmos foram pesados em balança com precisão de 0,01g, assim como seus órgãos. Os pesos absolutos foram registrados. Além do peso absoluto, foram realizadas as avaliações da relação percentual do peso dos órgãos com o peso dos pintos, calculadas através das seguintes fórmulas:

\_ peso relativo do saco vitelino = peso absoluto do saco vitelino/peso do pinto  $\times 100$

\_ peso relativo do fígado = peso absoluto do fígado/peso do pinto  $\times 100$

\_ peso relativo do coração = peso absoluto do coração/peso do pinto  $\times 100$ .

O fígado e saco vitelino destas mesmas aves foram utilizados para as análises da concentração de vitamina E. Para estas avaliações, foram utilizados 60 fígados e 60 sacos vitelinos, sendo 30 de cada tratamento. As amostras para estas análises foram constituídas por um *pool* de cinco órgãos, as quais foram congeladas a  $-40^\circ\text{C}$ , liofilizadas por 72 horas, sendo armazenadas até o momento das análises. Cada *pool* foi considerado uma repetição e cada tratamento foi constituído por seis repetições.



### 3.6.6. Indicadores de estresse oxidativo

Para avaliar os indicadores do estresse oxidativo do soro dos pintos logo após a eclosão, foram utilizadas 14 aves, sete para cada tratamento, sendo cada ave considerada uma repetição. A coleta foi realizada através de punção cardíaca pelo lado esquerdo do coração, sendo retirado cerca de 0,5 mL de sangue com agulha 30G em seringa de 3 mL. O sangue foi colocado em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL e posteriormente centrifugados no aparelho Mini-Centrífuga, da marca Mini Star® em velocidade fixa de 6.200 rpm para a separação do soro. Estes soros foram então identificados de acordo com cada tratamento e repetição e refrigerados em freezer com temperatura de -80° C.

#### 3.6.6.1. Capacidade antioxidante total do soro

Foram incubados (ao abrigo de luz, a 37°C por 60 minutos), 100 µL de soro, 50 µL de PBS e 12,5 µL de solução de MTT (0,5 g de MTT em 100 mL de PBS). O MTT é um sal tetrazólico que pode ser reduzido por antioxidantes como o ascorbato, urato,  $\alpha$ -tocoferol, albumina e o grupo das sulfidril proteínas, formando cristais de formazana que possuem cor púrpura e são solúveis em isopropanol. Em seguida, foram adicionados aos tubos, 750 µL da solução de isopropanol: HCL (0,04 M) e estes foram agitados no vórtex por 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e a absorvância do sobrenadante foi medida a 570 nm em um leitor de microplacas ELISA Versa Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### 3.6.6.2. Estabilidade oxidativa do soro

Foram utilizadas amostras de 100 µL de soro de 14 pintos, sendo sete por tratamento, para a quantificação do malondialdeído (MDA) através do método TBARS. Para esta análise, cada pinto foi considerado uma repetição.

O seguinte protocolo foi utilizado: 100 µL de soro foram adicionadas à 100 µL de uma solução gelada de TBA (TBA 1%, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) e 100 µL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) concentrado. As amostras foram incubadas no banho-seco por 25 minutos a 98°C e, em seguida, acondicionadas no freezer por 10 minutos. Posteriormente, 375 µL de butanol foram adicionados aos tubos que foram agitados no vórtex, por 10 segundos e em

seguida, centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm e 600 nm em um leitor de microplacas ELISA Versa Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A concentração do TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156/ (mM x cm).

Para o cálculo da concentração de TBARS, pelo coeficiente de extinção molar, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\text{TBARS} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times 10^3 \times 625}{156 \times 100}$$

Onde:

A532 – absorvância no comprimento de onda de 532 nm;

A600 – absorvância no comprimento de onda de 600 nm;

Para transformar os resultados de mM para  $\mu\text{M}$  a absorvância foi multiplicada por  $10^3$ ;

625  $\mu\text{L}$  se referem ao volume final em cada *ependorf*;

100  $\mu\text{L}$  correspondem ao volume de soro pipetado;

156 / mM x cm é o coeficiente de extinção molar do TBARS.

### 3.7. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Para as avaliações dos componentes dos ovos (casca, gema e albúmen), foram avaliados 84 ovos no dia da incubação, sendo 42 ovos de cada tratamento. Cada ovo foi considerado uma repetição. Para as análises de fertilidade e rendimento de incubação foram utilizadas oito repetições. Os valores para cada repetição foram obtidos através da média aritmética de três bandejas com 96 ovos cada. Para avaliar o peso do pinto no momento após a eclosão, 24 repetições foram utilizadas, sendo a caixa com 100 pintos nascidos considerada a repetição (peso da caixa menos a tara). Na determinação da concentração de vitamina A e E na gema foram utilizadas seis repetições, sendo o *pool* de cinco gemas considerada a repetição. Para a avaliação da concentração de vitamina E no fígado e saco vitelino, foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição constituída por um *pool* de cinco órgãos liofilizados. Na obtenção dos indicadores do estresse oxidativo (CAT e TBARS), foram utilizadas sete repetições, sendo o

soro de um pinto (logo após o nascimento) considerada a repetição. Os pesos do saco vitelino, fígado e coração foram determinados utilizando-se 30 repetições por tratamento, sendo uma unidade de cada órgão proveniente dos pintos recém eclodidos, considerada a repetição.

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas pelo teste de Lilliefors e Cochran. Os dados das variáveis “ovos contaminados + desidratados”, “mortalidade de 15 a 18 dias” e “concentração de vitamina E no saco vitelino” foram transformados pela equação raiz (variável +1) e analisados pelo teste F.

Os dados normais e homogêneos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste F (Sampaio, 2002).

### **3.8. Comitê de Ética em Experimentação Animal**

A metodologia utilizada neste experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo de número 250/11.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Componentes dos ovos

Os resultados referentes aos componentes dos ovos estão apresentados na tabela 2. Os componentes avaliados não foram afetados pelos níveis de vitamina E das dietas. Estes resultados estão em de acordo com Barreto et al. (1999), que não encontraram diferenças para o peso do ovo e porcentagens de gema, albúmen e casca, utilizando os níveis de 25 e 250 mg/kg de vitamina E. Kirunda et al. (2001) também, não verificaram aumento no peso do ovo de galinhas de postura com 36 semanas de idade suplementadas com os níveis de 20, 60 e 120 mg/kg. De forma semelhante, Mori et al. (2003), não constataram alterações no peso da casca e outros parâmetros de qualidade avaliados, com a suplementação de vitamina E que variou de zero a 600 mg/kg da dieta. Já An et al. (2010), observaram redução significativa do peso do ovo, peso da casca e peso do albúmen quando suplementaram a dieta de matrizes pesadas com o nível de 100 mg/kg.

Tabela 2. Parâmetros de qualidade dos ovos de acordo com os tratamentos.

Vitamina E (ppm)	Peso do ovo (g)	Casca (%)	Gema (%)	Albúmen (%)
40	70,97	9,14	29,84	61,01
150	72,28	9,19	30,21	60,60
CV	6,16	7,71	6,22	3,30

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p > 0,05$ ).

### 4.2. Nutrientes da gema do ovo: vitaminas E e A

Os resultados das concentrações das vitaminas E e A na gema do ovo encontram-se na tabela 3.

Para mensurar a concentração da vitamina E na gema, as aves deste experimento foram alimentadas com as dietas suplementadas por um período de seis semanas antes da coleta dos ovos. Este manejo alimentar, além de garantir que os resultados obtidos para fertilidade, rendimento de incubação e concentrações das vitaminas A e E na gema e tecidos da progênie se devesse apenas aos tratamentos, sem efeitos residuais das dietas anteriores ao

ensaio, visou também garantir que os resultados fossem obtidos após a estabilização da concentração do alfa-tocoferol.

Tabela 3. Concentrações de vitamina E (mg/kg) e de vitamina A (UI/kg) na gema do ovo liofilizada.

Vitamina E (ppm)	Conc. vit. E (mg/kg)	Conc. vit. A (UI/kg)
40	232,80 b	26.095,92 a
150	642,22 a	21.089,92 b
CV (%)	12,85	7,08

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas nas colunas são diferentes pelo teste F ( $p \leq 0,0001$ ).

A concentração de vitamina E na gema do ovo foi maior para o tratamento com o maior nível de suplementação de dl-alfa tocoferil acetato. Este resultado já era esperado e encontra-se de acordo com Surai et al. (1999b), Grobas et al. (2002) e Lin et al. (2005). A concentração de vitamina E na gema é diretamente proporcional ao seu fornecimento na dieta (Frigg et al. 1992).

Os resultados de vitamina E encontrados no presente estudo estão de acordo com Frigg et al. (1992) e Surai et al. (1995) e em desacordo com Lin et al (2005), que alcançaram a concentração de 97,8 mg/kg para a suplementação com 160 mg. Galobart et al. (2002) relatam que estas diferenças podem ser atribuídas a fatores como genéticas das aves utilizadas nos ensaios e o tipo de alfa-tocoferol fornecido. A dieta das aves também pode responder por grande parte destas divergências nos resultados: quantidades basais de alfa-tocoferol (dependente dos tipos de matéria-prima utilizados); fontes de gorduras (saturadas ou insaturadas) e a presença de antioxidantes como o BHT ou etoxiquim, que podem poupar a vitamina E, elevando a quantidade disponível para o depósito na gema. Além destes aspectos, é importante ressaltar que os diferentes métodos analíticos podem gerar grande parte desta variação.

O maior nível de suplementação com alfa-tocoferol reduziu a concentração da vitamina A na gema em 19,18%. ( $p \leq 0,0001$ ). A literatura descreve o efeito antagônico entre as vitaminas A e E, no qual o excesso de retinol, leva à redução do alfa-tocoferol, por três possíveis mecanismos: impedimento na formação da micela intestinal e interferência na absorção de substâncias lipossolúveis (March e Biely, 1963); a vitamina A pode influenciar

na permeabilidade da mucosa intestinal ao tocoferol (Seward et al. 1964) ou altas concentrações de vitamina A podem promover a oxidação da vitamina E (Green et al. 1967). No presente experimento, em que a concentração de vitamina A foi menor para o tratamento com a maior suplementação de vitamina E, o efeito pode ser explicado pelo fato de ambas as vitaminas possuírem características similares relacionadas à difusão entérica e à absorção e transporte no lúmen intestinal (Wang et al. 1999), podendo levar à redução da concentração da vitamina A nos tecidos (Demacker et al. 1998). Mori et al. (2003) forneceram 30.000 UI de acetato de retinil à galinhas da linhagem Hy Line<sup>®</sup> e observaram redução ( $p < 0,05$ ) na deposição de vitamina A na gema de 3,9% à medida que se elevaram os níveis de suplementação dietética da vitamina E entre 0 a 600 ppm. De forma contrária, Sondergaard (1972) e Sklan e Donoghue (1982), observaram um efeito poupador da vitamina A pela vitamina E avaliando as concentrações destas no fígado de ratos e frangos de corte, respectivamente. No entanto, este efeito não foi comprovado no presente ensaio, no qual se trabalhou com uma suplementação de acetato de retinil de 8.000 UI/kg de dieta.

No presente experimento, o maior nível de vitamina E, 150 ppm, foi capaz de reduzir a concentração de vitamina A na gema do ovo, como indicado pela correlação forte e negativa apresentada na tabela 4. Desta forma, com o nível de 8.000 UI/kg de vitamina A utilizado nas dietas, a vitamina E pode levar a um efeito adverso na deposição do retinol na gema.

Tabela 4. Correlação de Pearson entre as concentrações de vitamina A e E na gema do ovo liofilizada.

	Vitamina A	P
Vitamina E	-0,82	0,0005

Este efeito adverso pode também ser devido à competição pela absorção entre as vitaminas A e E. Bieri e Tolliver (1982) afirmaram que existe competição pelos mesmos sítios de absorção na borda em escova dos enterócitos entre o retinol e o alfa-tocoferol, podendo esta ser uma hipótese que explica o resultado encontrado. Outra hipótese que explicaria a menor concentração de vitamina A obtida na gema, seria a oxidação da vitamina A pela E ainda no lúmen intestinal: efeito prooxidante da vitamina E através do excesso de radical alquil gerado na própria reação antioxidante do alfa-tocoferol com outros radicais livres (Nagaoka et al., 1990).

Abawi e Sullivan (1989), Surai et al. (1998) e Grobas et al. (2002) verificaram a existência do antagonismo entre as vitaminas A e E, de modo que o aumento do retinol reduz a concentração do alfa-tocoferol. Os primeiros autores realizaram o experimento em frangos de corte, mensurando a vitamina E no plasma. Já Grobas et al. (2002) avaliaram a interação entre as vitaminas em galinhas vermelhas em fase de postura, variando os níveis de vitamina E entre zero, 40, 160 e 640 UI/kg de ração em função de dois níveis de vitamina A: 4.000 e 40.000. Os autores avaliaram a concentração do alfa-tocoferol na gema do ovo, porém não mensuraram a vitamina A. Desta maneira, com os resultados de ambos os ensaios, somente é possível afirmar que a elevação dos níveis de vitamina A nas dietas afeta negativamente a concentração de vitamina E na gema e no plasma. Este fato provavelmente ocorre devido à ação oxidativa da vitamina A sobre o alfa-tocoferol antes que este alcance os sítios de absorção intestinal, reduzindo sua biodisponibilidade, conforme descrito por Sklan e Donoghue (1982).

### **4.3. Fertilidade e rendimento de incubação**

Os resultados de fertilidade e rendimento de incubação estão expressos nas tabelas 5 a 8.

A fertilidade não apresentou diferença entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). Com o avanço da idade dos lotes de matrizes pesadas, observou-se uma redução fisiológica neste parâmetro, que é atribuída à diminuição das defesas antioxidantes nos sistemas reprodutores tanto do macho (Sikka et al. 1995), quanto da fêmea (Brèque et al. 2003).

A membrana dos espermatozoides das aves é bastante susceptível à reação de LPO devido à elevada quantidade de AGPI (Kelso et al. 1997). Segundo Sikka et al. (1995) e Surai et al. (1997) a LPO é a principal causa da subfertilidade em machos sob condições de estresse oxidativo. No tocante à fêmea, Brèque et al. (2003) afirmam que a queda de fertilidade em aves mais velhas se deve em parte à redução da eficiência da proteção antioxidante nos túbulos de armazenamento de espermatozoides devido a diminuição nos níveis das vitaminas E. Desta forma, esperava-se que a fertilidade fosse superior no tratamento com 150 ppm de vitamina E, em resposta à melhoria das defesas antioxidantes proporcionadas pelo alfa tocoferol nos sistemas reprodutores do macho e da fêmea. No entanto, este efeito não foi observado, estando de acordo com Barreto et al. (1999), que utilizaram os níveis de 25 e 250

mg/kg de vitamina E. Já An et al. (2010) verificaram piora na fertilidade com o nível de 100 mg/kg em comparação ao nível de 20 mg/kg, atribuindo este efeito à piora na qualidade dos ovos para o tratamento com a maior suplementação.

Tabela 5. Porcentagem de fertilidade em matrizes pesadas com 59 semanas de acordo com os tratamentos.

Vitamina E (ppm)	Fertilidade (%)
40	95,44
150	95,78
CV (%)	1,35

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p>0,05$ ).

Não houve diferença entre os tratamentos para a eclosão total e sobre ovos férteis (tabela 6).

Tabela 6. Eclosão sobre ovos totais e ovos férteis incubados de acordo com as dietas em matrizes pesadas com 59 semanas.

Vitamina E (ppm)	Eclosão total (%)	Eclosão férteis (%)
40	88,93	93,17
150	88,28	92,15
CV (%)	2,32	2,03

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p>0,05$ ).

O processo de eclosão é marcado pela mudança da respiração corioalantoidea para a respiração pulmonar, fato que eleva substancialmente o metabolismo oxidativo do embrião, que por possuir tecidos ricos em AGPI, é exposto aos efeitos danosos da lipoperoxidação. Estes efeitos podem resultar em alterações na permeabilidade de membranas e do DNA, reduzindo as taxas de eclosão (Surai et al. 1997). Com o exposto, esperava-se uma melhoria na eclosão para o tratamento com a maior suplementação, no entanto, esta foi semelhante para ambos os níveis. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Andi et al. (2006), Tsai et al. (2008) e An et al. (2010).



A mortalidade embrionária nos períodos iniciais e intermediários de incubação não foi influenciada pelos tratamentos (tabela 7), assim como a mortalidade entre 19 a 21 dias (tabela 8).

Tabela 7. Mortalidade embrionária de zero a sete dias, oito a 14 e 15 a 18 dias, calculada sobre ovos férteis incubados de acordo com os tratamentos.

Vitamina E (ppm)	zero a 7 dias (%)	8 a 14 dias (%)	15 a 18 dias (%)
40	3,05	0,50	0,92
150	3,50	0,81	0,57
CV (%)	35,66	100,73	15,00

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p > 0,05$ ).

Com a adição de vitamina E na dosagem de 150 ppm, era esperada uma redução na mortalidade embrionária a partir dos 15 dias de incubação, como resposta à melhoria das defesas antioxidantes do embrião. Nesta fase há uma intensa demanda energética em função do aumento do metabolismo do embrião, gerando uma maior oxidação de lipídios (Latour et al. 2000). Desta maneira, o embrião fica exposto à peroxidação e necessita de um bom sistema de defesa antioxidante para driblar o estresse oxidativo. Rocha (2011), observou redução da mortalidade embrionária a partir dos 15 dias de incubação, com a suplementação de cantaxantina na dosagem de 6 ppm à dieta de matrizes pesadas com idade avançada. A autora atribuiu esta melhoria ao aumento na quantidade de antioxidantes na gema, que foram capazes de proteger os tecidos embrionários. Neste experimento, no entanto, o maior nível de suplementação com vitamina E não conferiu melhoria das defesas antioxidantes no embrião a ponto de reduzir a mortalidade durante o desenvolvimento embrionário em comparação ao nível de 40 ppm.

No presente experimento, é importante frisar que o ingrediente utilizado como fonte energética nas dietas das matrizes foi o sorgo, que substituiu o milho em 100%. O sorgo é deficiente em xantofilas e, por conseguinte, em pigmentos carotenoides que são potentes antioxidantes naturais. Este fato poderia influenciar negativamente os índices de fertilidade, eclosão e mortalidade embrionária nas fases mais adiantadas da incubação, no entanto, não foi o que aconteceu. Mesmo com a substituição total do milho pelo sorgo e a drástica redução dos pigmentos carotenoides nas dietas, o nível de 40 ppm foi suficiente para conferir proteção antioxidante tanto no sistema reprodutor dos machos e fêmeas, quanto no embrião.

Tabela 8. Mortalidade embrionária de 19 a 21 dias, incluindo ovos bicados e mortalidade embrionária em função de contaminação e desidratação, calculada sobre ovos férteis incubados de acordo com os tratamentos.

Vitamina E (ppm)	19 a 21 dias+bicados (%)	Contaminados+desidratados(%)
40	1,72	0,54
150	2,44	0,35
CV (%)	50,60	8,39

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p>0,05$ ).

A porcentagem de ovos contaminados e desidratados foi semelhante ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos (tabela 8). Este resultado para a mortalidade embrionária em função de contaminação era esperado, pois a vitamina E não é capaz de interferir na resistência ou resposta imunitária do embrião a bactérias ou fungos que poderiam elevar este índice. Apesar da utilização de ovos de matrizes velhas, que notadamente são mais susceptíveis à contaminação devido à menor espessura e resistência da casca (Barbosa, 2011), no presente experimento os índices foram reduzidos devido à seleção dos ovos na granja que foram coletados somente nos ninhos, sendo descartados aqueles com sujidades de excretas e outros contaminantes.

#### 4.4. Avaliações relativas ao pinto

Os resultados do peso corporal, assim como os pesos absolutos e relativos do saco vitelino, fígado e coração dos pintos ao nascimento estão expressos nas tabelas de 9 a 11.

Os pintos oriundos do tratamento com suplementação de 150 ppm apresentaram maior peso corporal ao nascimento (tabela 9). Este resultado está de acordo com Barreto et al. (1999), que utilizaram os níveis de 25 e 250 mg/kg porém em discordância com Lin et al. (2005), que suplementaram com 20 e 100 mg/kg de vitamina E. Os ovos deste experimento não foram separados por faixa de peso, visto que, segundo Rocha (2008), a uniformidade obtida no primeiro dia de vida do pinto não se mantém aos 44 dias.

Tabela 9. Peso do pinto ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E.

Vitamina E (ppm)	Peso do pinto (g)
40	47,67b
150	48,71a
CV (%)	2,00

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas são diferentes pelo teste F ( $\leq 0,01$ ).

Os pesos absoluto e relativo do saco vitelino (tabela 10) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Esperava-se que a relação percentual entre o peso do saco vitelino/peso do pinto se mostrasse reduzida, o que poderia indicar a oxidação dos lipídios da gema em função do estresse oxidativo no tratamento com o menor nível de suplementação com vitamina E. De acordo com Burnham et al. (2001), deficiências de nutrientes na gema ou ineficiência na transferência de lipídios e utilização destes pelo embrião, podem levar à maior absorção do saco vitelino, reduzindo o seu peso relativo. No entanto, este fato não foi observado e demonstra que não houve diferença na oxidação dos lipídios da gema entre os tratamentos.

Tabela 10. Peso relativo do saco vitelino (SV) e fígado (FG) do pinto ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E.

Vitamina E (ppm)	Peso SV (%)	Peso FG (%)
40	12,72	2,51 a
150	12,97	2,39 b
CV (%)	22,10	10,98

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas são diferentes pelo teste F ( $\leq 0,06$ ).

O peso relativo do fígado (tabela 10) foi superior para o tratamento com o nível de 40 ppm de vitamina E. An et al. (2010) obtiveram resultado contrário, com maior peso relativo do fígado para o tratamento com o maior nível de suplementação. Os autores atribuem este resultado a um melhor desenvolvimento do órgão, proporcionado pela melhoria nas defesas antioxidantes.

No presente experimento, o peso do coração (tabela 11) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, resultado que difere de An et al. (2010). Estes autores encontraram peso superior para o maior nível de suplementação. De maneira análoga ao peso

relativo do fígado, os autores atribuem o achado a um melhor desenvolvimento do coração proporcionado pela ação antioxidante do alfa-tocoferol.

Tabela 11. Peso relativo do coração do pinto ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E.

Vitamina E (ppm)	Peso relativo (%)
40	0,75
150	0,76
CV (%)	13,96

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p>0,05$ ).

#### 4.5. Concentração de vitamina E no fígado e saco vitelino da progênie

Os resultados da concentração de vitamina E no saco vitelino e fígado dos pintos ao nascimento estão expressos na tabela 12.

Tabela 12. Concentração de vitamina E (mg/kg) no saco vitelino e fígados liofilizados de pintos ao nascimento de acordo com os níveis de vitamina E.

Vitamina E (ppm)	Vitamina E (mg/kg)	
	Saco Vitelino*	Fígado
40	655,99 b	720,19 b
150	1.212,22 a	1.481,41 a
CV (%)	11,48	18,81

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras nas colunas são diferentes pelo teste F ( $\leq 0,0001$ ).

As concentrações de alfa tocoferol no saco vitelino e no fígado foram maiores para o tratamento com o maior nível de suplementação dietética da vitamina E. Estes resultados eram esperados devido à quantidade de vitamina E presente na gema, e conseqüentemente disponível para o desenvolvimento do embrião, que depende do seu fornecimento na dieta materna, segundo Cherian e Sim (1997).

Houve correlação positiva e mais forte para a deposição de vitamina E no fígado, paralelamente ao saco vitelino, apresentada na tabela 13. A liberação do alfa tocoferol das

lipoproteínas transportadoras ocorre através de hidrólise pela lipase lipoproteica, localizada nos capilares dos tecidos embrionários (Shand et al., 1994). O fígado é um dos tecidos com maior capacidade de expressão da lipase lipoproteica, sendo capaz de acumular grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis provenientes da gema, como o alfa-tocoferol (Speake et al. 1993). Este fato faz com que o fígado seja o órgão com maior deposição de vitamina E durante o desenvolvimento embrionário (Gaal et al. 1995). Tal ocorrência parece ser um mecanismo adaptativo para proteção tissular durante o estresse oxidativo no momento da eclosão, devido à elevada concentração de AGPI neste órgão (Surai et al. 1999), reduzindo a susceptibilidade à LPO.

Tabela 13. Correlação de Pearson entre as concentrações de vitamina E presentes na gema, saco vitelino e fígado dos pintos ao nascimento.

Gema	Saco vitelino	Fígado
	0,76	0,84

Correlações significativas a  $p < 0,002$ .

De acordo com Surai et al. (1997), o fígado pode funcionar como órgão liberador de alfa tocoferol para outros tecidos através da circulação, por meio das VLDL. Desta forma, segundo os autores, elevando-se as reservas de vitamina E neste órgão através da dieta materna, a capacidade antioxidante dos outros órgãos pode melhorar, evitando os efeitos da peroxidação lipídica no embrião como um todo.

#### 4.6. Biomarcadores do estresse oxidativo

Os resultados da capacidade antioxidante total e estabilidade oxidativa do soro de pintos ao nascimento estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Estabilidade oxidativa (TBARS) e capacidade antioxidante total (CAT) do soro de pintos ao nascimento de acordo com os níveis de suplementação de vitamina E.

Vitamina E (ppm)	TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ )	CAT (absorvância)
40	12,42	0,42
150	11,84	0,45
CV (%)	6,77	13,05

Médias não seguidas de letras são semelhantes pelo teste F ( $p > 0,05$ ).

Não houve diferença entre os tratamentos para os valores de TBARS obtidos no soro dos pintos. Estes achados indicam que o maior nível de vitamina E não reduziu a susceptibilidade à LPO no pinto à eclosão e estão coerentes com os resultados de rendimento de incubação obtidos no presente experimento, que não diferiram entre os níveis. No entanto, estes valores de TBARS não estão de acordo com os achados de Lin et al. (2005), que observaram redução do MDA no cérebro de pintos à medida que se elevaram os níveis de vitamina E nas dietas (zero a 160 mg/kg). An et al. (2010) também verificaram redução nos teores de MDA mensurados na gema, indicando que a suplementação de 100 mg/kg foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em comparação ao nível de 20 mg/kg.

O valor de TBARS é um indicador do estresse oxidativo sofrido pela amostra e, portanto, esperava-se um menor valor para o grupo suplementado com 150 ppm de vitamina E. Todavia, este método pode levar a interpretações equivocadas: superestimar os resultados pelo fato da ligação do TBA não ser específica para o MDA (Vasconcelos et al., 2007), além do MDA poder não reagir com o TBA se ocorrer prévia complexação com proteínas e amins, o que subestima a oxidação da amostra (Fellenberg e Speisky, 2006).

O teste CAT realizado no presente experimento teve como objetivo avaliar se o aumento da suplementação da vitamina E na dieta da matriz seria capaz de elevar a capacidade antioxidante de sua progênie. Pelos resultados demonstrados na tabela 14, a capacidade antioxidante total da progênie não foi influenciada pelos níveis de alfa tocoferol. Apesar de ser esperado um aumento da absorvância para o nível de 150 ppm, o que poderia ser interpretado como um efeito de melhoria nas defesas antioxidantes do pinto, este resultado não é capaz de afirmar que tal efeito não ocorreu pelos seguintes fatos: a vitamina E é um antioxidante com características lipofílicas e está presente nos locais específicos em quem ocorrem danos por estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2006); desta forma, conseguir detectar a vitamina E no soro se torna mais difícil, já que a mesma tende a se acumular em órgãos, notadamente o fígado (Gaal et al., 1995).

## **5. CONCLUSÃO**

A suplementação com 40 ppm de vitamina E foi suficiente para manter os parâmetros de fertilidade em matrizes pesadas com idade avançada. O rendimento de incubação, os componentes dos ovos e o status oxidativo da progênie em matrizes pesadas não foram afetados pelos tratamentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, F.G.; SULLIVAN, T.W. Interactions of vitamins A, D3, E, and K in the diet of broiler chicks. *Poultry Science*, v.68, p.1490-1498, 1989.
- ADAMSTONE, F.B.; CARD, L.E. The effects of vitamin E deficiency on the testes of the male fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Morphology*, v. 56, p. 339-359, 1934.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.3, p.28-40, 2005.
- AN, S. Y.; GUO, Y. M.; MA, S. D.; YUAN, J. M.; LIU, G. Z. Effects of Different Oil Sources and Vitamin E in Breeder Diet on Egg Quality, Hatchability and Development of the Neonatal Offspring. *Asian-australasian journal of animal sciences*, v. 23, n. 2, p. 234-239, 2010.
- ANDI, M. A.; SHIVAZAD, M.; POURBAKHS, et al. Effects of vitamin E in broiler breeder diet on hatchability, egg quality and breeder and day old chick immunity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 9, n. 5, p. 789-794, 2006.
- BALL, G. F. M. Vitamin B12. In: *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods*. Springer US, 1998. p. 497-515.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, 2010.
- BARBOSA, V. M. *Efeitos do momento de transferência para o nascedouro e da idade da matriz pesada sobre o status fisiológico de embriões e pintos, rendimento da incubação e desempenho da progênie*. 2011. 118 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php>>. Acesso em 02 de fevereiro 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.
- BARRETO, S. L. T.; FERREIRA, W. M.; GONCALVES, T. M.. Níveis de proteína e de vitamina E para matrizes de frango de corte. 1. Efeito sobre o desempenho das matrizes, composição do ovo e desempenho da progênie. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, Apr. 1999.



- BERRIDGE, M.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use terazolium salts. *Biochemica*, v.4, 1996.
- BIERI, J.G. E TOLLIVER, T.J. Reversal by bile acid on the inhibition of alfa-tocopherol absorption by retinole acid. *The Journal of Nutrition*, v. 112, n.2, p. 401-403, 1982.
- BJØRNEBOE, A.; BJØRNEBOE, G. E.; DREVON, C. A. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *The Journal of nutrition*, v. 120, n. 3, p. 233, 1990.
- BRÈQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J.P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v.66, n.3, p.314–323, 2003.
- BRIGELIUS-FLOHE, R.; M. G. TRABER. Vitamin E: function and metabolism. *The Faseb journal*, v. 13, p. 1145-1155, 1999.
- BRILLARD, J.P.; GALUT, O.; NYS, Y. Possible causes of subfertility in hens following insemination near the time of oviposition. *British Poultry Science*, v.28, n.2, p.307–318, 1987.
- BURNHAM, M. R.; PEEBLES, E. D.; GARDNER, C. W. et al. Effects of incubation humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. *Poultry Science*, v.80, p.1444-1450, 2001.
- CAPUTTO, R.; McCAY, P.B.; CARPENTER, M.P. Requirements of Mn<sup>++</sup> and Co<sup>++</sup> for the synthesis of ascorbic acid by liver extracts of animals deprived of tocopherol. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 233, n. 5, p. 1025–1029, 1958.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AGUSTO, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n.2, p.441.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Bioquímica Ilustrada. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 533p.
- CHERIAN, G.; SIM, J. S. Egg Yolk Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E Content Alters the Tocopherol Status of Hatched Chicks. *Poultry Science*, v. 76, p. 1753–1759, 1997.
- COMBS JR., G.F. Differential Effects of High Dietary Levels of Vitamin A on the Vitamin E Selenium Nutrition of Young and Adult Chickens. *Journal of Nutrition*, v. 106, p. 967-975, 1976.
- COMBS JR., G. F. Influences of dietary vitamin E and selenium on the oxidant defense system of the chick. *Poultry Science*, v. 60, p. 2098–2105, 1981.

- DEMACKER, P.N.; BREDIE, S.J.; HECTORS, M.P.; STALENHOF, A.F.. Fat loading experiments with the vitamins A and E suggest that in postprandial lipemia transfer/diffusion of chylomicron lipids to VLDL contributes to beta-VLDL formation. *Atherosclerosis*, v.141, n. 1:S, p. 109-13, 1998.
- EID, Y.; EBEID, T.; YOUNIS, H. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *Br. Poult. Sci.*, v.47, n.3, p.350–356, 2006.
- ELKIM, R.G. Shell egg cholesterol reduction. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, p. 665-687, 2006.
- FELLENBERG, M.A.; SPEISKY, H. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, p. 53-70, 2006.
- FERRARI, C. K. B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. *Journal of the Health Sciences Institute*, v. 28, n. 4, p. 307-310, 2010.
- FRIGG, M.; WHITEHEAD, C. C.; WEBER, S. 1992. Absence of effects of dietary  $\alpha$ -tocopherol on egg yolk pigmentation. *British Poultry Science.*, v. 33, p. 247–353, 1992.
- GAAL, T.; MEZES, M.; NOBLE, R. C.; et al.. Development of antioxidant capacity in tissues of the chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, v. 112, n. 711-716, 1995.
- GALOBART, J.; BARROETA, A. C.; CORTINAS, L.; et al.. Accumulation of alpha-tocopherol in eggs enriched with omega3 and omega6 polyunsaturated fatty acids. *Poultry science*, v. 8, n. 12, p. 1873-1876, 2002.
- GREEN, J.; DIPLOCK, A.T.; BUNYAN, J. Ubiquinone (coenzyme Q) and the function of vitamin E. *Nature*. 1961 Apr v. 22, p. 190:318–325, 1961.
- GREEN, J.; MUTHY, I. R.; DIPLOCK, A. T. et al. Vitamin E and stress. 7. The interrelationships between polyunsaturated fatty acid stress, vitamin A and vitamin E in the rat and the chick. *British Journal of Nutrition*, v. 21, p. 845-864, 1967.
- GRIFFIN, H. D.; PERRY, M. M.; GILBERT, A. B. Yolk formation. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, ed Freeman B M. Academic Press, London, UK, 1984. pp 345-380.
- GROBAS, S.; MENDEZ, J.; LOPEZ, B. C. et al.. Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk alpha-tocopherol concentration. *Poultry Science*, v. 81, n.3, p. 376-381, 2002.

- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v.141, n.2, p. 312–322, 2006.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *The American Journal of Clinical Nutrition.*, v. 57, p. 715S –725S, 1993.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed., Oxford: University Press, Cap. 1-3, 1-245.
- HARRIS, R.S. Tocopherols: Nomenclature and Formulas. In: Sebrell, W.H., Harris, R.S. *The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Methods*. New York: Academic Press, p. 166-214, 1972.
- HOSOMI, A.; ARITA, M.; SATO, Y. et al. Affinity for alphas-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Letters*, v. 409, n.1, p. 105–108, 1997.
- KANNER, J. Oxidative process in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science* v.36, n.1/2, p.169-189, 1994.
- KATO, A.; SATO, Y. The release of carbohydrate rich compound from ovomucin gel during storage. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 36, p. 831–833, 1972.
- KELSO, K.A.; CEROLINI, S.; NOBLE, R.C.; et al. The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 118, n.1, p. 65–9, 1997.
- KHAN, R. U.; RAHMAN, Z.; JAVED, I. et al. Effects of vitamins, probiotics, and protein level on semen traits and some seminal plasma macro- and microminerals of male broiler breeders after zinc-induced molting. *Biological Trace Element Research*, Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/y3060245872545r9>>. Acessado em: 9 fev. 2012.
- KIRUNDA, D. F. K.; S. E. SCHEIDELER; S. R. MCKEE. The Efficacy of Vitamin (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate) Supplementation in Hen Diets to Alleviate Egg Quality Deterioration Associated with High Temperature Exposure. *Poultry Science*, v. 80, n. 9, p. 1378-1383, 2001.
- KITABCHI, A.E.; MCCAY, P.B.; CARPENTER, M.P. et al. Formation of malonaldehyde in vitamin E deficiency and its relation to the inhibition of gulonolactone oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v.235, p. 1591–1598, 1960.

- KÜHN, H; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33, n. 2, p. 154-172, 2002.
- LATOUR, M. A.; DEVITT, A. A.; MEUNIER, R. A.; STEWART, J. J.; WATKINS, B.A. Effects of conjugated linoleic acid. 2. Embryonic and neonatal growth and circulating lipids. *Poultry Science*, v. 79, n. 6, p. 822-826, 2000.
- LEESON, S., SUMMERS, J.D. *Commercial poultry nutrition*. Guelph: University Books, 1997. 350p.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, p. 293-303, set/dez. 2001.
- LIN, Y. F.; TSAI, H. L.; LEE, Y. C.; CHANG, S. J. Maternal vitamin E supplementation affects the antioxidant capability and oxidative status of hatching chicks. *Journal of Nutrition*, v. 135, n. 10, p. 2457-61, 2005.
- LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S.; GODKIN, J. D. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.116, n.3, p.265-273, 2009.
- LUCY, J. A. Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 203, p. 4–11, 1972.
- MACPHERSON, A. Selenium, vitamin E and biological oxidation. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*, eds Cole D J A & Garnsworthy P. Butterworth and Heinemann, Oxford, UK, 1994. p 3-30.
- MARCH, B. E.; BIELY, J. Vitamin A and cholesterol absorption in the chick. *Journal of Nutrition*, v. 79, p. 474-478, 1963.
- MASON, K.E. Differences in testis injury and repair after vitamin A deficiency, vitamin E deficiency and inanition. *American Journal of Anatomy*, v. 52, p. 153, 1933.
- MELUZZI, A.; SIRRI, F.; TALLARICO, N.; VANDI, L. Dietary vitamin E in producing eggs enriched with n-3 fatty acids. In: *Proc. VIII Eur. Symp. Quality of Eggs and Egg Products*. WPSA Italian Branch, Bologna, 1999. p. 153-159.
- MORI, A.V.; MENDONCA, C.X.; ALMEIDA, C.R.M.; et al. Supplementing hen diets with vitamins A and E affects egg yolk retinol and alpha-tocopherol levels. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 12, p. 106–114, 2003.

- NASON, A.; LEHMAN, I.R. The role of lipides in electron transport. II. Lipide cofactor replaceable by tocopherol for the enzymatic reduction of cytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 222, n. 1, p. 511–530, 1956.
- NAGAOKA, S., et al. Kinetic and ab initio study of the prooxidant effect of vitamin E. Hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 24, p. 8921-8924, 1990.
- NOBLE, R. C., COCCHI, M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Progress in Lipid Research*, v. 29, p.107–140, 1990.
- NOBLE, R. C.; COCCHI, M.; BATH, H. M. A-tocopherol absorption and polyunsaturated fatty acid metabolism in the developing chick embryo. *British Poultry Science*, v. 34, p. 815-818, 1993.
- NRC - National Research Council, Nutrient requirements of poultry, Washington: National Academy Press, 9th revised ed., 1994.
- ROCHA, J.S.R.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C. et al. Efeito da classificação dos ovos sobre o rendimento de incubação e os pesos do pinto e do saco vitelino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n. 4, p.979-986, 2008.
- 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. 80 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- ROSA, A. P.; SCHER, A.; DUARTE, V. et al. Supplementation of canthaxanthin to broiler breeders diet on broiler chick hatchery parameters and egg yolk TBARS. In: *International Poultry Scientific Forum*, 2010, Atlanta. Abstracts... Atlanta: Georgia World Congress Center, 2010, p. 39.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. et al. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; PAN, E.A. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. In: MACARI, M.; MENDES, A.A. *Manejo de matrizes de corte*. 1. ed. Campinas: Facta, 2005. p. 76-143.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002, 265p.

- SANTOS, T.C.; MURAKAMI, A.E.; FERNANDES, J.; CARVALHO, L.S. Efeito da vitamina E em dietas suplementadas com óleo sobre parâmetros de fertilidade de galos reprodutores. In: Conferência Facta de Ciência e Tecnologia Avícolas, 27a, 2009, Porto Alegre, Anais... Campinas: FACTA, 2009, v.1.
- SCOTT, M. L. Lesions of vitamin E and selenium deficiencies in poultry and their pathogenesis. *Folia Vet Lat*, v. 4, n. 1, p. 113-34, 1974.
- SCOTT, M. L. Vitamin E. In: DeLuca, H.F. Handbook of lipid research. Volume 2. The fat-soluble vitamins. New York: Plenum Press, p.133-210, 1978.
- SCOTT, M. L.; NOGUCHI, T.; COMBS, G.F. JR. New evidence concerning mechanisms of action of vitamin E and selenium. *Vitamins & Hormones*, v. 32, p. 429–444, 1974.
- SCHNEIDER, W. J.; CARROLL, R.; SEVERSON, D. L., NIMPF, J. Apolipoprotein VLDL-II inhibits lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins in the laying hen. *Journal of Lipid Research*, v. 31, p. 507-513, 1990.
- SEWARD, C. R.; VAUGHAN, G.; HOVE, E. L. Respiratory activities of hypo- and hypervitaminotic-A rat liver homogenates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 177, p. 477-480, 1964.
- SESTI, L. A. C. Órgão reprodutivos e reprodução da aves domésticas. In: MACARI, M.; GONZÁLES, E. *Manejo da incubação*. Jaboticabal: FACTA, 2003. cap. 1, p. 8-33.
- SHAND, J. H.; WEST, D. W.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The esterification of cholesterol in the liver of the chick embryo. *Lipids*, v. 28, p. 621–625, 1994.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*, v.16 p. 464-468, 1995.
- SHEU, S. S.; NAUDURI, D.; ANDERS, M.W. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1762, p. 256–265, 2006.
- SKLAN, D.; DONOGHUE, S. Vitamin E response to high dietary vitamin A in the chick. *The Journal of Nutrition*, v.112, p.759-765, 1982.
- SONDERGAARD, E. The influence of vitamin E on the expenditure of vitamin A from the liver. *Experientia*, v. 28, n. 7, p. 773-774, 1972.

SPEAKE, B. K.; MCCARTNEY, R. J.; NOBLE, R. C. Tissue-specific changes in the lipid composition and lipoprotein lipase activity during development of the chick embryo. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1165, n. 3, p. 263–270, 1993.

SPEAKE, B. K.; SURAI, P. F.; GAAL, T.; MEZES, M.; NOBLE, R. C. Tissue-specific development of antioxidant systems during avian embryogenesis. *Biochemical Society Transactions*, v. 24, n.2, p.182, 1996.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M.; LIBMAN, D. (1965). Vitamin assay. Tested methods. *Vitamin assay. Tested methods*.

SURAI, P. F., I. IONOV, A. BUZHIN, N. BUZHINA. Vitamin E and egg quality. In: Proc. VI Eur. Symp. Quality of Eggs and Egg Products. WPSA Spanish Branch, 1995, Zaragoza. p. 387-394.

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*, v. 1304, n. 1, p. 1–10, 1996.

SURAI, P. F.; GAAL, T.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The relationship between the alpha-tocopherol content of the yolk and its accumulation in the tissues of the newly hatched chick. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 75, n. 2, p. 212-216, 1997.

SURAI, P. F.; IONOV, I. A.; KUKLENKO, T. V.; et al. Effect of supplementing the hen's diet with vitamin A on the accumulation of vitamins A and E, ascorbic acid and carotenoids in the egg yolk and in the embryonic liver. *British Poultry Science*, v. 39, n. 2, p., 257-263, 1998.

SURAI, P. F. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *British Poultry Science*. v. 40, n. 3, p. 397-405, 1999.

SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H. Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biological Trace Element Research*, v. 68, n.1, p. 63-78, 1999 a.

SURAI, P. F.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Relationship between vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. *British Poultry Science*, v. 40, n.3, p. 406-10, 1999 b.

- SURAI, P. F. Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *British Poultry Science*, v. 41, n.2, p. 235–243, 2000.
- SURAI, P. F.; KUKLENKO, T. V.; IONOV, I. A.; et al. Effect of vitamin A on the antioxidant system of the chick during early postnatal development. *British Poultry Science*, v. 41, n. 4, 2000.
- SURAI, P. F. Natural antioxidants in Poultry nutrition: New developments In: 16<sup>TH</sup> European Symposium on Poultry Nutrition, p. 669-675, 2006.
- THOMPSON, J. N.; SCOTT, M. L. Impaired lipid and vitamin E absorption related to atrophy of the pancreas in selenium-deficient chicks. *Journal of Nutrition*, v. 100, n. 7, p. 797-809, 1970.
- TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Free Radical Biology and Medicine*, v.43, n.1, p. 4-15, 2007.
- TSAI, H. L.; CHANG, S. K. C.; LIN, Y. F.; CHANG, S. J. Beneficial Effects of Maternal Vitamin E Supplementation on the Antioxidant System of the Neonate Chick Brain. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v. 21, n.2, p. 225 – 231, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. D. F.; et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 3, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VISSCHEDIJK, A. H. J. The air space and embryonic respiration. 1. The pattern of gaseous exchange in the fertile egg during the closing stages of incubation. *British Poultry Science*, v. 9, n.2, p.173-184, 1968.
- WANG, Y. H.; LEIBHOLZ, J.; BRYDEN, W. L.; FRASER, D. R. Lipid-peroxidation status as an index to evaluate the influence of dietary fats on vitamin E requirements of young pigs. *British Journal of Nutrition*, v. 75, n.1, p. 81–95, 1996.
- WANG, X.; QUINN, P. J. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, v. 38, n. 4, p. 309-336, 1999.
- WILSON, J. X. Regulation of ascorbic acid concentration in embryonic chick brain. *Developmental Biology*, v. 139, n.2, p. 292–298, 1990.
- YU, B.P. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, v. 74, n.1, p. 139–162, 1994.
- ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN,



N.P. E. Biomarkers of free radical damage - markers for atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* v. 26, n.1-2, p. 202-226, 1999.

### Anexo 1

Quadro 1. Período de monitoramento da fertilidade, eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados dos galpões dos núcleos que constituíram os tratamentos com dois níveis de vitamina E.

52 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade	Eclosão total	Eclosão sobre ovos férteis
40 ppm	95.86	90.30	94.20
150 ppm	96.14	89.58	93.19
CV (%)	1.48	1.75	1.22
53 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade	Eclosão total	Eclosão sobre ovos férteis
40 ppm	95.75	89.41	93.36
150 ppm	95.96	89.92	93.68
CV (%)	1.90	3.12	1.51

Os tratamentos são semelhantes entre si pelo teste F ( $p > 0,05$ )

## Anexo 2

Quadro 2. Fertilidade, eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados dos galpões dos núcleos que constituíram os tratamentos com dois níveis de vitamina E durante o período de adaptação das aves às dietas.

54 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade (%)	Eclosão total (%)	Eclosão sobre ovos férteis (%)
40 ppm	96,00	89,95	92,72
150 ppm	96,57	89,01	94,11
CV (%)	1,40	2,35	1,80
55 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade (%)	Eclosão total (%)	Eclosão sobre ovos férteis (%)
40 ppm	95,65	88,54	92,54
150 ppm	96,39	89,93	93,27
CV (%)	1,71	2,90	1,86
56 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade (%)*	Eclosão total (%)	Eclosão sobre ovos férteis (%)
40 ppm	95,65	88,54	92,54
150 ppm	96,39	89,93	93,27
CV (%)	1,13	2,23	2,05
57 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade (%)	Eclosão total (%)	Eclosão sobre ovos férteis (%)
40 ppm	95,91	90,05	93,89
150 ppm	95,87	89,57	93,43
CV (%)	1,37	1,97	1,57
58 semanas de idade			
Tratamento	Fertilidade (%)	Eclosão total (%)	Eclosão sobre ovos férteis (%)
40 ppm	95,61	89,23	93,30
150 ppm	96,55	89,64	92,82
CV (%)	1,51	2,59	1,55

\* Os tratamentos diferem entre si pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ).