

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

**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**

JÚLIA SAMPAIO RODRIGUES ROCHA

**BELO HORIZONTE
2011**

JÚLIA SAMPAIO RODRIGUES ROCHA

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

Tese 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 Doutor em Zootecnia, sob orientação do Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião e co-orientação da Profa. Dra. Ângela Maria Quintão Lana e Profa. Dra. Silvana de Vasconcelos Caçado

**BELO HORIZONTE
2011**

R672e Rocha, Júlia Sampaio Rodrigues Rocha, 1981
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 / Júlia Sampaio Rodrigues Rocha. 2011.
80 p.: il.

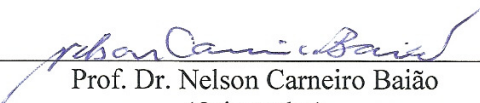
Orientador: Nelson Carneiro Baião

Co-orientadores: Ângela Maria Quintão Lana, Silvana de Vasconcelos Caçado
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

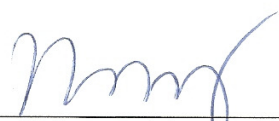
1. Ave doméstica – Alimentação e rações – Teses. 2. Dieta em veterinária – Teses.
3. Ovos – Armazenamento – Teses. 4. Ovos – Qualidade – Teses. 5. Ovos –
Eclodibilidade – Teses. I. Baião, Nelson Carneiro. II. Lana, Ângela Maria Quintão.
III. Caçado, Silvana de Vasconcelos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. V. Título.

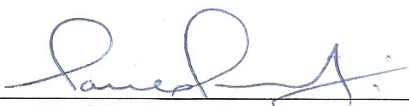
CDD – 636.508 5

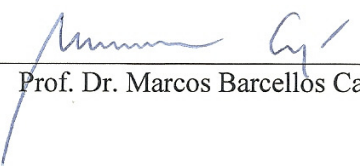
Tese defendida e aprovada em 28/02/2011, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião
(Orientador)


Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara


Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins


Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva


Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Neusa!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por estar sempre presente.

À minha vovó Neusa, por tudo!

À minha irmã Sílvia, pelo amor, incentivo e por ser meu grande exemplo.

Ao Dani, por estar sempre ao meu lado, alegrando a minha vida e sonhando comigo.

Aos meus tios, Sonia e Nilson, pelo amor incondicional.

Aos meus primos-irmãos, Cíntia, Isabella, Rachel e Guilherme, pelo carinho e torcida.

Ao Luiz Roberto, Olga, Kute, Thália e Duda, por me acolherem e se tornarem parte da minha família.

À Dara e Hanna, por existirem!

Ao Professor Baião, pelos ensinamentos, paciência, confiança, oportunidade, incentivo e amizade.

Ao Leo, pela amizade, conselhos e disponibilidade.

À Professora Ângela, pelos ensinamentos estatísticos e confiança!

À Professora Silvana, pelo apoio nesta caminhada e por disponibilizar o laboratório!

Ao Miguel, pela generosidade e credibilidade!

Pelas alegrias e companheirismo, agradeço aos amigos: Preta, Mara, KK, Marina, Pezão, Fê, Carol,

Pró, Lá, Very, Grá, Bel, Lu, Scarpelli, Zica, Lidi, Flavinha, Dodô, Alícia e D. Júlia.

À Ly, pela amizade, pela Viali e por seguirmos juntas na vida profissional!

À Fê, pela Viali e aprendizado!

Pela convivência maravilhosa, agradeço à turma antiga da pós, representada pelos amigos: João Luis, Rubão, Myriam, Pedro, Tati, Carlos, Luiza, Érika, Thiago, João Felipe, Gal, Letícia, Brunão, Bruninha, Cris, Clarinha, Douglas, Marcela, Daniela e Tadeu.

Aos amigos da melhor equipe de avicultura: Vanessa, Roberta, Mariana, Marília, Daniel, André, Chris, Paulinha, Paula, Diogo, Juliana, Luiz, Cadu, Kamila, Raquel, Ana, Gustavo... Muito obrigada! Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido!

À Rio Minas, especialmente ao Luiz, Elácio, Alvino e Grazi, por viabilizarem este experimento.

Ao Renato Souza, pela confiança e por intermediar as negociações com a DSM.

À DSM, especialmente Marli e Leonardo, pelo Carophyll Red® e análises laboratoriais.

Ao Tércio e André, por garantirem o abastecimento de Carophyll Red® na Rio Minas, mesmo aos finais de semana.

Ao Renato Grimaldi, do Laboratório de Óleos e Gorduras da Unicamp, por se desdobrar para realizar as análises de CG da gema.

À EVUFMG, Fapemig e CNPq por viabilizarem este doutorado.

Aos Professores da banca, Nelson, Paulo Lourenço e Marcos Café, pela importante contribuição nesta tese!

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	11
1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	TRANSPORTE DE LIPÍDIOS E VITAMINAS PARA A GEMA DO OVO	14
2.1.1.	Lipoproteínas dos galos e das aves fora de postura	14
2.1.2.	VLDLg – lipoproteína modificada para deposição na gema	15
2.1.3.	Mudanças no metabolismo da LDL e HDL durante a postura e a formação de VLDL genérica	17
2.1.4.	Absorção e transporte das vitaminas A, E e carotenóides para a gema do ovo	17
2.2.	ANTIÓXIDANTES NA DIETA DAS MATRIZES	20
2.2.1.	Formação dos radicais livres nos alimentos e em sistemas vivos	20
2.2.2.	Oxidação lipídica	21
2.2.3.	Oxidação protéica	22
2.2.4.	Sistema enzimático de defesa antioxidante	23
2.2.5.	Antioxidantes naturais	25
2.2.5.1.	Cantaxantina – carotenóide precursor de vitamina A?	25
2.2.6.	Antioxidantes sintéticos	26
2.2.7.	Utilização de antioxidantes nos ingredientes das rações das aves	27
2.2.8.	Suplementação das dietas de matrizes pesadas com vitamina E	28
2.2.9.	Suplementação da dieta das galinhas com vitamina A	28
2.2.10.	Utilização de carotenóides na dieta de matrizes e relação entre estes e a vitaminas A e E	29
2.2.11.	Lipídios dos ovos de consumo também oxidam	30
2.3.	ARMAZENAMENTO DE OVOS FÉRTEIS	31
2.3.1.	Desenvolvimento embrionário e “zero fisiológico”	31
2.3.2.	Condições ambientais de armazenamento	31
2.3.3.	Mudança nas características dos ovos durante o armazenamento	32
2.3.4.	Perda de peso dos ovos no armazenamento e na incubação	33
2.3.5.	Viabilidade embrionária durante o armazenamento	33
2.3.6.	Influência do armazenamento sobre o metabolismo embrionário e o período de incubação	34
2.3.7.	Influência do armazenamento sobre o rendimento de incubação	35
2.3.8.	Peso do pinto em função do armazenamento dos ovos férteis	36
2.4.	FERTILIDADE DAS MATRIZES PESADAS EM IDADE AVANÇADA	37
2.4.1.	Estresse oxidativo como causa da infertilidade	37
2.4.2.	Mecanismos antioxidantes de proteção dos espermatozóides	38
2.4.3.	Efeito da idade sobre a fertilidade	39
2.4.4.	Efeito da suplementação de vitaminas antioxidantes na dieta dos galos sobre a fertilidade	39
3.	METODOLOGIA	40
3.1.	Local	40
3.2.	Galpões e aves	40
3.3.	Manejo das matrizes	40
3.4.	Ovos	41
3.5.	Tratamentos	42
3.5.1.	Experimento I	42
3.5.2.	Experimento II	42
3.6.	Dados obtidos no Experimento I	42
3.6.1.	Qualidade dos ovos	42
3.6.1.1.	Porcentagem dos componentes dos ovos e altura de albúmen	42
3.6.1.2.	Cor e índice da gema	43
3.6.1.3.	pH da gema e albúmen	43
3.6.2.	Composição da gema dos ovos	43

3.6.2.1.	Níveis de cantaxantina, vitamina E e vitamina A da gema dos ovos	43
3.6.2.2.	Níveis de extrato etéreo, proteína bruta e índice de peróxido na gema dos ovos	43
3.6.2.3.	Composição em ácidos graxos da gema dos ovos	44
3.6.3.	Rendimento de incubação	44
3.6.3.1.	Perda de peso dos ovos	44
3.6.3.2.	Fertilidade	44
3.6.3.3.	Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos incubados	45
3.6.3.4.	Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos férteis	45
3.6.3.5.	Mortalidade embrionária	45
3.6.4.	Avaliações dos embriões e pintos	45
3.6.4.1.	Peso absoluto e matéria seca dos embriões com 18 dias	45
3.6.4.2.	Peso do pinto e saco vitelino à eclosão	45
3.6.4.3.	Estabilidade oxidativa do saco vitelino dos pintos	45
3.7.	Delineamento do experimento I	46
3.8.	Dados obtidos no experimento II	46
3.8.1.	Fertilidade	46
3.9.	Delineamento do experimento II	46
3.10.	Comitê de Ética em Experimentação Animal	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1.	Experimento I	48
4.1.1.	Qualidade dos ovos	48
4.1.2.	Composição das gemas dos ovos	50
4.1.3.	Rendimento de incubação	54
4.1.4.	Avaliações relativas aos embriões e pintos	59
4.2.	Experimento II	61
5.	CONCLUSÃO	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ANEXOS		
Anexo 1.	Quadro 1. Monitoramento da fertilidade, eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados, em porcentagem, dos galpões que constituíram os tratamentos COM e SEM adição de cantaxantina*	71
Anexo 2.	Determinação de apoester e cantaxantina na gema do ovo	72
Anexo 3.	Determinação de vitamina a e dl- α -tocoferol nos premixes	76
Anexo 4.	Quadro 2. Composição em ácidos graxos da gema liofilizada em função das dietas e dos períodos de armazenamento dos ovos	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações das matrizes	41
Tabela 2.	Porcentagem de gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	48
Tabela 3.	Porcentagem de albúmen de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	48
Tabela 4.	Porcentagem de casca de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	48
Tabela 5.	Índice de gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	49
Tabela 6.	Altura (mm) de albúmen de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	49
Tabela 7.	Escore de cor da gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	49
Tabela 8.	pH da gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	50
Tabela 9.	pH do albúmen de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	50
Tabela 10.	Concentração de cantaxantina (ppm) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	50
Tabela 11.	Concentração de vitamina A (UI/kg) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	51
Tabela 12.	Concentração de vitamina E (ppm) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	52
Tabela 13.	Correlação de Pearson entre as vitaminas na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	52
Tabela 14.	Concentração de extrato etéreo (%) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	52
Tabela 15.	Concentração de proteína bruta (%) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	53
Tabela 16.	Composição em ácido graxos saturados (% m/m) da gema de ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	53
Tabela 17.	Composição em ácido graxos monoinsaturados (% m/m) da gema de ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	53
Tabela 18.	Composição em ácido graxos poliinsaturados (% m/m) da gema de ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	54
Tabela 19.	Perda de peso (%) dos ovos no armazenamento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	54
Tabela 20.	Perda de peso (%) dos ovos durante a incubação de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	55
Tabela 21.	Fertilidade (%) de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	55
Tabela 22.	Ecloração (%) sobre ovos totais incubados de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	56
Tabela 23.	Ecloração (%) sobre ovos férteis incubados de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	56
Tabela 24.	Mortalidade embrionária de zero a sete dias (%), calculada sobre ovos férteis incubados, de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	57
Tabela 25.	Mortalidade embrionária de oito a 14 dias (%), calculada sobre ovos férteis incubados, de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	57
Tabela 26.	Mortalidade embrionária de quinze a 21 dias, incluindo ovos bicados (%), calculada sobre ovos férteis incubados, de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	58
Tabela 27.	Mortalidade embrionária em função de contaminação e desidratação dos ovos (%), calculada sobre ovos férteis incubados, de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	58
Tabela 28.	Peso (g) do embrião aos 18 dias de incubação de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	59
Tabela 29.	Matéria seca (%) do embrião aos 18 dias de incubação de acordo com as dietas e	59

	os períodos de armazenamento dos ovos	
Tabela 30.	Peso (g) do pinto ao nascimento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	60
Tabela 31.	Peso absoluto (g) do saco vitelino do pinto ao nascimento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	60
Tabela 32.	Peso relativo (%) do saco vitelino do pinto ao nascimento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos	60
Tabela 33.	Valor de TBARS (mg de malondialdeído/kg de saco vitelino) do saco vitelino	61
Tabela 34.	Fertilidade (%) em função das dietas e da idade das matrizes	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Transporte dos lipídios e lipoproteínas nas aves	15
Figura 2.	VLDLg x VLDL	16
Figura 3.	O hepatócito das galinhas secreta apoB contendo VLDLg de pequeno diâmetro e coberta com apoVLDL-II que impede a hidrólise desta pela ação da lipase lipoprotéica	17
Figura 4.	Micela mista absorvida pelo enterócito no jejuno	18
Figura 5.	Formação do portomícron no enterócito	18
Figura 6.	Competição entre as vitaminas A e E pela absorção no intestino delgado segundo Bieri e Tolliver (1982)	19
Figura 7.	Formação do radical livre	20
Figura 8.	Peroxidação lipídica – uma reação em cadeia	21
Figura 9.	Oxidação protéica	23
Figura 10.	Enzimas que atuam em grupo contra os efeitos tóxicos dos RL	24
Figura 11.	Regeneração da vitamina E pela vitamina C	25
Figura 12.	Mecanismo de ação dos antioxidantes primários	27
Figura 13.	Defesa antioxidante do espermatozóide	38
Figura 14.	Fertilidade em função da idade das matrizes	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácido graxo
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ERO	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio/espécies reativas do oxigênio
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IP	Índice de Peróxido
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
RL	Radical livre
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Butil hidroquinona
TG	Triglicerídio
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLg	Lipoproteína de muito baixa densidade modificada

RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos. No experimento I avaliou-se a influência da adição de cantaxantina (Carophyll Red®) à dieta das matrizes pesadas e do período de armazenamento dos ovos sobre a qualidade dos ovos, nutrientes da gema, fertilidade, rendimento de incubação e desenvolvimento do embrião. No experimento II, foram avaliados os efeitos da cantaxantina dietética e do envelhecimento das matrizes sobre a fertilidade. Foram utilizados ovos de dois galpões de matrizes Cobb® de um mesmo lote, apresentando fertilidade e eclodibilidade semelhantes, monitoradas durante cinco semanas antes do início do experimento. No experimento I, os tratamentos foram definidos pelas dietas (com e sem adição de 6ppm de cantaxantina na dieta das matrizes) e períodos de armazenamento dos ovos (três e sete dias). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2 x 2 (duas dietas x dois períodos de armazenamento). No experimento II, os tratamentos foram definidos pelas dietas (com e sem adição de 6ppm de cantaxantina na dieta das matrizes) e idades das matrizes (50, 51, 55, 59 e 60 semanas de idade). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em parcela subdividida 2 x 5, sendo os fatores da parcela compostos pelas dietas e o das subparcelas compostos pelas idades das matrizes. No experimento I, a adição de cantaxantina à dieta de matrizes elevou as concentrações de cantaxantina e vitamina A e reduziu a quantidade de vitamina E na gema do ovo, melhorou a fertilidade e eclosão e reduziu a mortalidade embrionária a partir de 15 dias de incubação. O armazenamento por sete dias prejudicou a qualidade dos ovos, promoveu oxidação de lipídios e vitaminas da gema, retardou o desenvolvimento embrionário, reduziu a eclosão e aumentou a mortalidade embrionária após 15 dias de incubação. No experimento II, observou-se que após 50 semanas de idade, a fertilidade do lote de matrizes pesadas reduziu continuamente e a adição de cantaxantina à dieta minimizou parcialmente os efeitos negativos da progressão da idade sobre a fertilidade. A cantaxantina pode ser utilizada como antioxidante nas dietas das matrizes pesadas para minimizar os efeitos negativos do armazenamento sobre o rendimento de incubação e da idade sobre a fertilidade.

Palavras-chave: antioxidante, carotenóide, eclodibilidade, galinha, galo, peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Two experiments were conducted. In experiment I, were evaluated the effect of canthaxanthin (Carophyll Red®) added to the broiler breeders' diet and egg storage on egg quality, yolk nutrients, fertility, incubation yield and embryo development. In experiment II, were evaluated the effects of dietary canthaxanthin and aging on broiler breeder fertility. Eggs of two sheds of the same Cobb flock, age and lines, with similar fertility and hatchability monitored for five weeks before the start of the experiments. In experiment I, the treatments were defined by the diets (with and without 6ppm canthaxanthin added to broiler breeder diets) and periods of egg storage (three and seven days) in a completely randomized in a factorial design 2 x 2 (two diets x two periods of egg storage). In experiment II, the treatments were defined by the diets (with and without canthaxanthin added to broiler breeder diets) and broiler breeder ages (50, 51, 55, 59 and 60 weeks of age). The design was completely randomized design in 2 x 5 split plot arrangement (two diets x five ages). In experiment I, the addition of canthaxanthin to the diet increased concentrations of canthaxanthin and vitamin A and reduced the amount of vitamin E in egg yolk, improved fertility and hatchability and decreased embryonic mortality from 15 days of incubation. The egg storage for seven days reduced egg quality, promoted oxidation of yolk lipids and vitamins, delayed embryonic development, reduced hatchability and increased embryonic mortality after 15 days of incubation. In experiment II, it was observed that after 50 weeks of age, broiler breeder fertility continually reduced and the addition of canthaxanthin to the diet minimizes the negative impact aging on fertility. Canthaxanthin can be used as antioxidants in broiler breeder's diets to minimize the negative effects of storage on the incubation yield and of aging on fertility.

Keyword: antioxidant, carotenoid, hatchability, hen, rooster, lipid peroxidation.

1. INTRODUÇÃO

A reação de radicais livres (RL) com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica em sistemas vivos e rancidez oxidativa em alimentos. A peroxidação lipídica altera a estrutura das membranas celulares, provoca modificações na estrutura dos aminoácidos, mudanças nas atividades enzimáticas e ataca o DNA (Lima e Abdalla, 2001). A rancidez oxidativa tem como efeitos a imposição de sabores de ranço, alteração dos valores nutricionais e formação de produtos tóxicos (Guedes, 2006).

Considerando que os tecidos embrionários são caracterizados por alta concentração de PUFA (Surai et al., 1997) e que a taxa metabólica aumenta significativamente na segunda metade do período de incubação (Wilson et al., 1992), pode-se dizer que os embriões estão susceptíveis à peroxidação.

Os ovos em casca são considerados resistentes à oxidação lipídica, entretanto pesquisas com ovos comerciais demonstraram que os lipídios da gema sofrem oxidação durante o período de armazenamento. Esta oxidação aumenta com o maior período de armazenamento, tanto em condições refrigeradas (4°C) quanto em temperatura ambiente (25°C), sendo marcante o efeito da temperatura mais alta (Franchini et al., 2002; Cherian et al., 2007; Giampietro et al., 2008). Extrapolando este conceito para matrizes pesadas, sabemos que o armazenamento de ovos férteis é prática comum e necessária na incubação comercial, podendo resultar em aumento da mortalidade embrionária e consequente queda na eclodibilidade dos ovos. O efeito negativo do maior período de armazenamento dos ovos férteis sobre o rendimento de incubação está bem documentado na literatura e as explicações se baseiam nas mudanças físicas que ocorrem no ovo. Entretanto, a oxidação dos lipídios da gema de ovos férteis armazenados poderia resultar em redução da energia disponível para desenvolvimento do embrião, além da presença de compostos tóxicos que poderia provocar morte embrionária.

A queda da fertilidade de matrizes pesadas inicia com 40 semanas de idade, sendo mais pronunciada após 50 semanas (Hocking, 1989; Lake, 1989). O plasma seminal e os espermatozoides contêm enzimas e vitaminas antioxidantes que protegem a membrana espermática, rica em PUFA, da peroxidação (Makker et al., 2009). Esta atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides se torna menor com o envelhecimento dos galos. Além disto, é uma proteção temporária já que ao serem armazenados nas glândulas hospedeiras, os espermatozoides passam a ser protegidos por um mecanismo enzimático complexo, no qual participam as vitaminas C e E (Rutz et al., 2005). Aparentemente este mecanismo é menos eficiente em galinhas com idade avançada, o que pode contribuir para o declínio na fertilidade.

Apesar dos carotenóides serem conhecidos como precursores de vitamina A, esses possuem importante papel antioxidante, pois removem RL, absorvem e dissipam o excesso de energia destes e reciclam a vitamina E (Böhm et al., 1997). A cantaxantina está incluída no grupo dos carotenóides e, adicionada à dieta dos galos e galinhas, pode exercer seu papel antioxidante de três formas: 1) no embrião – protegendo os tecidos embrionários na incubação, 2) no ovo – protegendo os nutrientes da gema durante o armazenamento para o embrião em desenvolvimento e, 3) nas matrizes pesadas – auxiliando nos mecanismos antioxidantes do sêmen e oviduto e reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides.

Baseados nestes aspectos, foram conduzidos dois experimentos. No experimento I, os objetivos foram avaliar a influência da adição de cantaxantina (Carophyll Red®) à dieta das matrizes pesadas e do período de armazenamento dos ovos sobre a qualidade dos ovos, nutrientes da gema, fertilidade, rendimento de incubação, desenvolvimento do embrião e do pinto à eclosão. No experimento II foram avaliados os efeitos da cantaxantina dietética e da progressão da idade das matrizes sobre a fertilidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. TRANSPORTE DE LIPÍDIOS E VITAMINAS PARA A GEMA DO OVO

2.1.1. Lipoproteínas dos galos e das aves fora de postura

As lipoproteínas plasmáticas são complexos macromoleculares esféricos de lipídios e proteínas específicas, apolipoproteínas ou apoproteínas, cuja função é manter os lipídios em solução durante o seu transporte entre os tecidos (Stryer, 1996). As principais lipoproteínas das aves são: portomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Os portomícrons, responsáveis por transportar os lipídios dietéticos do intestino, são análogos aos quilomicra dos mamíferos, porém as aves empacotam uma fração significativamente baixa de lipídios da dieta em portomícrons quando comparada aos quilomicra dos mamíferos (Walzem, 1996). Os portomícrons receberam esta denominação porque, como as aves não possuem o sistema linfático bem desenvolvido, estes passam através da veia porta e são entregues diretamente ao fígado antes de entrarem no plasma (Tarugi et al., 1990). Ao passo que nos mamíferos, os quilomicra chegam ao plasma via circulação linfática, passando pelos tecidos extra-hepáticos, antes de chegarem ao fígado (Gurr et al., 2002; Nelson e Cox, 2002).

Diferentemente dos mamíferos, cujas VLDL transportam apenas triglicerídios (TG) endógenos, as VLDL das aves transportam TG exógenos, provenientes do metabolismo hepático de parte dos portomícrons, e TG endógenos, sintetizados no fígado, para serem metabolizados nos tecidos periféricos (Stevens, 1996; Pál et al., 2002). O metabolismo típico das VLDL nos galos e nas aves fora de postura é a hidrólise dos TG pela enzima lipase lipoprotéica. Esta enzima é sintetizada pelos tecidos, muscular e adiposo, que podem utilizar os ácidos graxos como fonte de energia. Após sua síntese, a enzima é secretada do tecido e migra para o endotélio vascular, onde possui acesso imediato ao substrato. A hidrólise e a remoção de TG pela lipase lipoprotéica reduzem o tamanho do núcleo da VLDL e cria um relativo excesso de lipídios na superfície (Champe et al., 2006). Estes fosfolipídios e colesterol livres estão disponíveis para participar das reações de superfície e movem-se para HDL. Várias proteínas agem na transferência de lipídios entre VLDL e HDL e nem todas estão bem caracterizadas. A remoção de TG do núcleo pela ação da lipase e a perda de lipídios para HDL converte progressivamente a VLDL em partículas menores e mais densas. O primeiro produto do processo é denominado lipoproteína de densidade intermediária (IDL). A fração IDL é remodelada em LDL rica em colesterol e ésteres de colesterol. A figura 1 ilustra o metabolismo das lipoproteínas nas aves (galos e galinhas fora de postura).

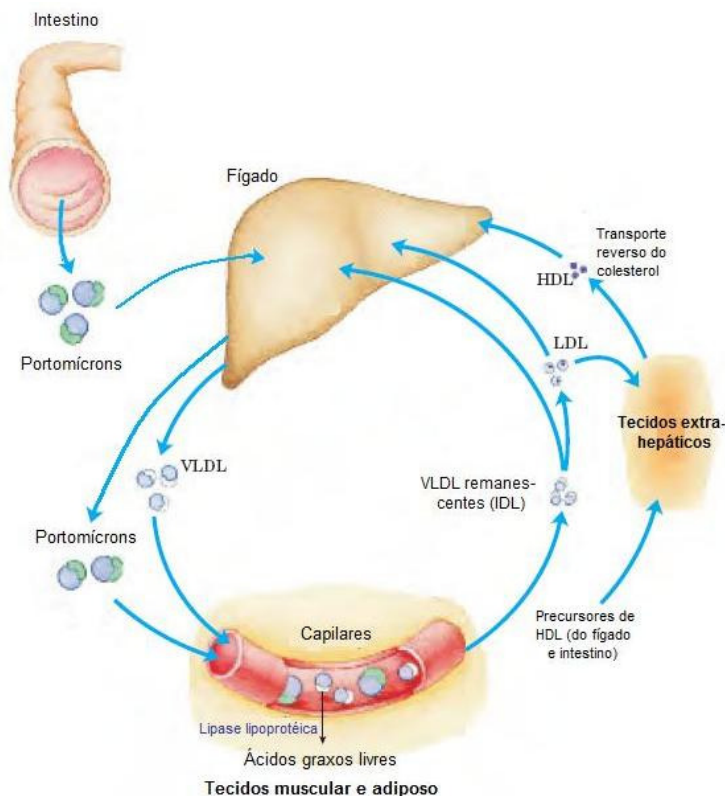


Figura 1. Transporte dos lipídios e lipoproteínas nas aves. Os lipídios exógenos, principalmente TG, colesterol e ésteres de colesterol, são absorvidos no intestino e transportados como portomícrons pelo sistema portal até o fígado. Alguns portomícrons sofrem transformações para formar parte da fração VLDL e o restante sofre metabolismo intravascular rapidamente. As VLDL são formadas por lipídios exógenos, portomícrons modificados, e por lipoproteínas contendo lipídios endógenos, sintetizados no fígado. As VLDL atingem os tecidos periféricos, os TG são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e os ácidos graxos são captados pelos tecidos muscular e adiposo. A extração de lipídios das VLDL converte gradualmente parte delas em LDL e os remanescentes das VLDL são captados pelo fígado. As LDL transportam o colesterol para os tecidos extra-hepáticos ou são captadas de novo pelo fígado. O excesso de colesterol nos tecidos periféricos é transportado de volta ao fígado como HDL. Parte do colesterol é transformada em sais biliares no fígado. Adaptado de Stevens (1996), Nelson e Cox (2002) e Pál et al. (2002)

2.1.2. Lipoproteína modificada para deposição na gema (VLDLg)

Durante a fase de postura, são encontradas lipoproteínas de muito baixa densidade modificadas no plasma das galinhas, conhecidas como VLDLg. Esta VLDLg é produzida por ação do estrógeno e é diferente da VLDL encontrada no plasma de frangas e de galos (Gornall e Kuksis, 1973; Griffin et al., 1982).

No folículo ovariano, o oócito é cercado de várias camadas de tecidos (Griffin et al., 1984). A camada mais externa, composta pela teca externa e teca interna, é bem vascularizada, com capilares estendendo-se até a camada granulosa, localizada logo abaixo. As moléculas plasmáticas – VLDLg e vitelogenina – têm que cruzar três barreiras para serem incorporadas aos oócitos: parede capilar; lâmina basal, que envolve a camada granulosa; e camada granulosa, que envolve o oócito. A lâmina basal, além de prover suporte mecânico, age como um filtro que impede VLDL com grandes diâmetros e portomícrons de atravessarem esta barreira e serem depositados no oócito em desenvolvimento (Griffin e Perry, 1985).

Segundo Walzem et al. (1995), Walzem (1996) e Speake et al. (1998), as partículas de VLDL são maiores em frangas e galos, possuindo diâmetro entre 50 e 70 nm, e contêm de seis a

nove apoproteínas diferentes, incluindo o maior componente estrutural, a apoproteína B (apoB). Em contraste, as partículas VLDLg secretadas pelo fígado de galinhas em postura são pequenas, com tamanho regular em torno de 30 nm, e contêm apenas duas apoproteínas, apoB e apoVLDL-II (figura 2). Esta última parece ser a responsável pela limitação do diâmetro da VLDLg durante a sua formação. O pequeno tamanho das VLDLg é aparentemente uma modificação para facilitar a incorporação destas ao oócito, já que a lâmina basal permite a transferência somente de menores VLDL ricas em TG e vitelogenina (Walzem et al., 1999). Galinhas que apresentam altas taxas de postura geralmente possuem elevados níveis de VLDLg com diâmetro entre 25 e 44 nm.

Outra importante característica da VLDLg é ser a única lipoproteína rica em TG resistente à ação da lipase lipoprotéica (figura 3). Esta resistência é garantida pela apolipoproteína VLDL-II, importante inibidora da ação da lipase lipoprotéica presente em grandes quantidades na VLDLg (Schneider et al., 1990; Barber et al., 1991; Nimpf e Schneider, 1991; Hermier, 1997; Elkim, 2006). A redefinição do metabolismo da VLDLg permite à galinha acertar na entrega de TG específicos ao oócito – gema – para posterior nutrição do embrião que se desenvolverá dentro do ovo.

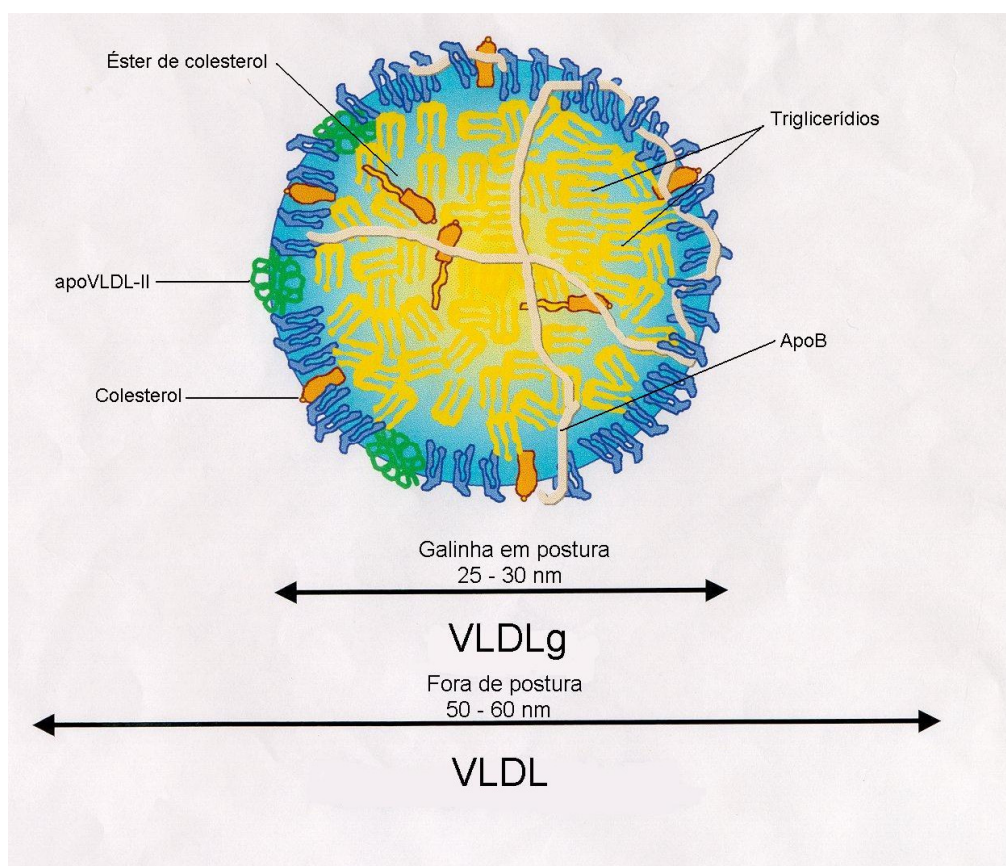


Figura 2. VLDLg x VLDL. A escala mostra a diferença entre os diâmetros da VLDLg e VLDL, observadas no plasma de galinhas em postura e galinhas fora de postura, respectivamente. Adaptado de Walzem (1996).

VLDLg - Via de deposição de lipídio na gema

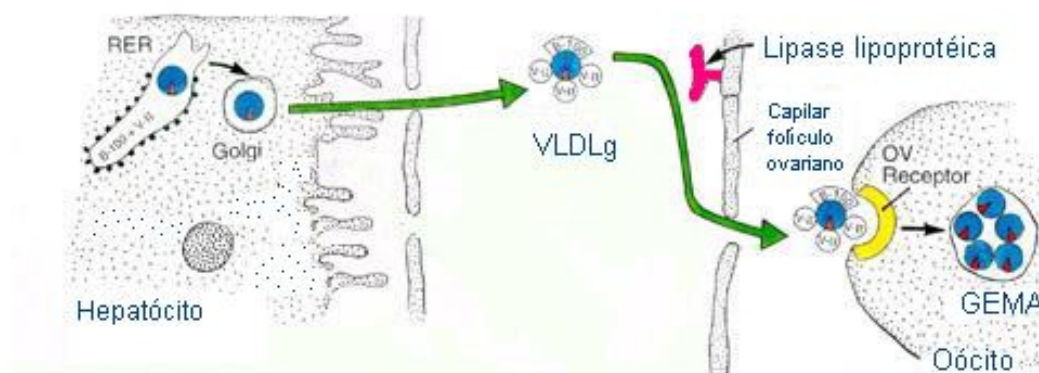


Figura 3. O hepatócito das galinhas secreta apoB contendo VLDLg de pequeno diâmetro e coberta com apoVLDL-II que impede a hidrólise desta pela ação da lipase lipoprotéica. Adaptada de Walzem et al. (1999).

2.1.3. Mudanças no metabolismo da LDL e HDL durante a postura e a formação de VLDL genérica

Nas aves em crescimento, a HDL representa a maior classe de lipoproteína e é a principal transportadora de colesterol no plasma, e em menores concentrações estão LDL e VLDL (Chapman, 1980; Banerjee e Redman, 1984; Hermier et al., 1984).

Ao iniciar a postura, a VLDL passa a ser a lipoproteína plasmática predominante das galinhas, seguida por HDL e LDL, estando a última em menores concentrações (Walzem et al., 1994). Os baixos níveis de LDL são facilmente explicados, já que esta lipoproteína é produto final do metabolismo intravascular da VLDL, que por sua vez está reduzido.

A concentração de HDL no plasma de galinhas em postura é duas a três vezes menor do que a concentração desta em frangas e galos (Walzem, 1996). O metabolismo de HDL durante a produção de ovos ainda é pouco compreendido, porém um fator que pode contribuir para esta mudança na concentração é a resistência da VLDLg ao metabolismo periférico, levando à redução na quantidade de fosfolipídios e colesterol não esterificado disponível para ser importada pela HDL.

Tarugi et al. (1998) demonstraram que as células tubulares proximais do rim da ave adulta são capazes de produzir VLDL contendo apenas apoB. Walzem et al. (1999) chamaram essa VLDL renal demonstrada pelos pesquisadores anteriores de VLDL genérica e afirmaram que a secreção dessa pelos rins durante a postura serviria para suprir com ácidos graxos livres os tecidos musculares, cardíaco e esquelético, e adiposo, já que a VLDLg é totalmente direcionada para a gema. Salvante et al. (2007) alertaram para o fato de que outros estudos demonstraram a susceptibilidade de uma pequena porcentagem de VLDLg plasmática à ação da lipase, e que dada as altas concentrações de VLDLg no plasma de galinhas em produção, essa pequena parte poderia ser metabolizada por outros tecidos, que não o ovariano, para atender às exigências energéticas da ave.

2.1.4. Absorção e transporte das vitaminas A, E e carotenóides para a gema do ovo

As pesquisas sobre o processo de absorção e transporte das vitaminas A, E e dos carotenóides em aves são escassas, entretanto parece ser semelhante ao que ocorre com os lipídios (Bjorneboe et al., 1990). Desta forma, estas vitaminas são transportadas pelos portomícrons aos tecidos e fígado, pela VLDL aos tecidos e pela VLDLg à gema do ovo, conforme apresentado nas Figuras 1 e 3. As Figura 4 e 5 demonstram a absorção dos lipídios e vitaminas lipossolúveis da dieta.

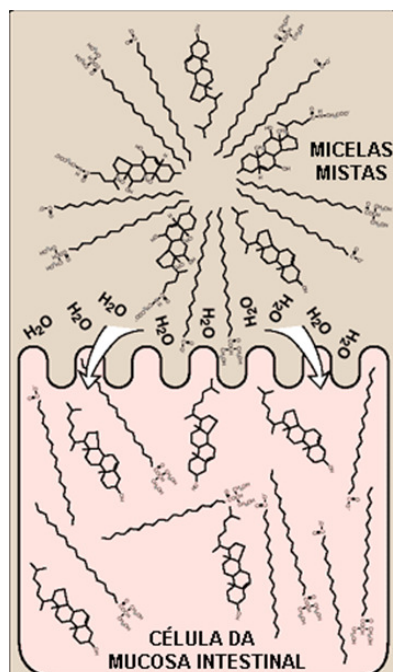


Figura 4. Micela mista absorvida pelo enterócito no jejuno. Os principais produtos da degradação dos lipídios (ácidos graxos livres, colesterol livre e 2-monoacilgliceróis) combinados com as vitaminas lipossolúveis e sais biliares formam as micelas mistas. Estas são agregados em forma de disco de lipídios anfipáticos que coalescem com os grupos hidrofílicos para o lado de fora e os grupos hidrofóbicos para o lado de dentro. A superfície hidrofílica das micelas facilita o transporte dos lipídios e vitaminas lipossolúveis através da camada aquosa estacionária da membrana com borda em escova dos enterócitos, onde eles são absorvidos. Adaptado de Champe et al. (2006).

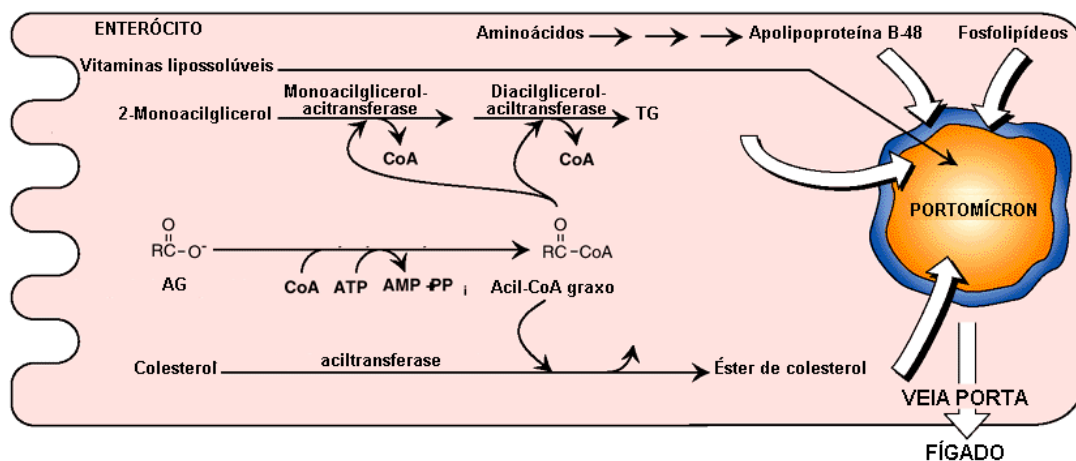


Figura 5. Formação do portomícron no enterócito. A mistura de lipídios, absorvida pelo enterócito, migra para o retículo endoplasmático para a biossíntese de lipídios complexos. Os ésteres de colesterol, triglicerídeos e vitaminas lipossolúveis são bastante hidrofóbicos, necessitando, portanto, serem embalados em portomícrons que são liberados pelos enterócitos na veia porta e seguem para o fígado. Adaptado de Champe et al. (2006).

Combs (1976) demonstrou que a vitamina A adicionada em excesso à dieta de aves reduz a quantidade de vitamina E depositada na gema do ovo. De acordo com o autor, a redução da absorção da vitamina E ocorre ainda no intestino, devido à competição entre estas vitaminas.

Os carotenóides não precursores de vitamina A não competem com a vitamina E pela absorção no enterócito e alguns autores ressaltam a sinergia que ocorre entre estes e a vitamina E, conforme descrito mais adiante nesta revisão de literatura. Entretanto, quando se tratam de

carotenóides pró-vitâmicos, a conversão destes em vitamina A ocorre na mucosa intestinal (Goodman et al., 1966; Surai et al.; 2001). De acordo com Bieri e Tolliver (1982), a vitamina A na dieta reduz a absorção de vitamina E no intestino, aumentando a excreção desta última. A hipótese destes autores é que a vitamina A induz a alterações físico-químicas no lúmen intestinal, interferindo na absorção da vitamina E. A Figura 6 ilustra a competição entre as vitaminas A e E pela absorção intestinal.

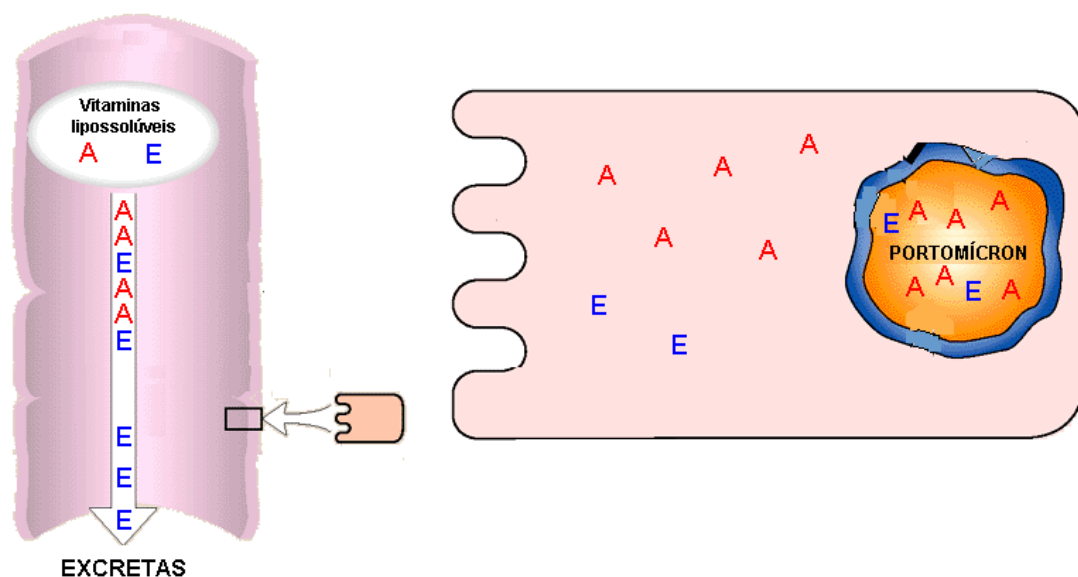


Figura 6. Competição entre as vitaminas A e E pela absorção no intestino delgado segundo Bieri e Tolliver (1982). Adaptado de Champe et al. (2006).

2.2. ANTIOXIDANTES NA DIETA DAS MATRIZES

2.2.1. Formação dos radicais livres nos alimentos e em sistemas vivos

Radicais livres são substâncias químicas que apresentam número ímpar de elétrons, sendo assim muito instáveis e altamente energéticos (Araújo, 2006). Para se tornarem estáveis, os radicais livres transferem a energia acumulada para as substâncias próximas a eles, principalmente PUFA.

Em alimentos, a formação de RL ocorre pela ação direta de fontes externas de energia, como luz, calor e radiação (Figura 7). A oxidação dos lipídios é uma das mais importantes causas da deterioração dos alimentos, devido à formação de sabores e odores indesejáveis (rancidez oxidativa), bem como a formação de substâncias tóxicas potencialmente perigosas quando ingeridas pelas aves e pelo homem.

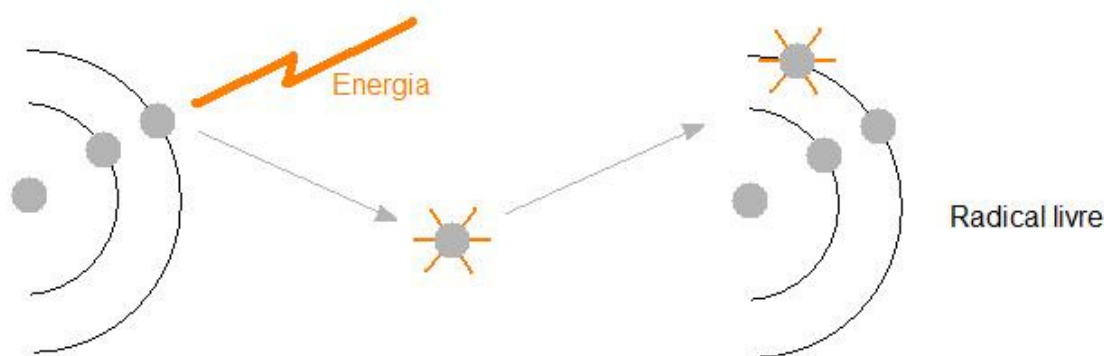


Figura 7. Formação do radical livre. A energia externa atinge o átomo removendo um elétron do seu orbital. Toda a energia absorvida é transferida ao elétron, tornando-o altamente energético e instável. Este elétron procura outro átomo e transfere sua energia inicial, mantendo-se instável devido à energia “extra” acumulada. Este novo átomo formado, contendo um elétron extra, é denominado radical livre. Adaptado de Araújo (2006).

A rancidez oxidativa envolve a reação do oxigênio com ácidos graxos, por mecanismos químicos e enzimáticos: a) autooxidação – reação química complexa de baixa energia de ativação que envolve a formação de RL, pode ocorrer na ausência de luz e não é inibida pelo abaixamento da temperatura de armazenamento do alimento; b) fotoxidação – mecanismo alternativo para formação de RL, iniciado pela exposição do alimento à luz na presença de moléculas fotossensores como mioglobina, riboflavina e clorofila; e c) lipoxigenase – enzima de ocorrência vegetal e animal que catalisa a oxigenação dos ácidos linoléico, linolênico e araquidônico para seus correspondentes peróxidos, durante o armazenamento e processamento (Araújo, 2006).

Não é objetivo nesta revisão, entretanto é importante conceituar outra alteração química que ocorre com óleos e gorduras: lipólise (Araújo, 2006). A lipólise também leva à formação de sabores e odores estranhos num processo conhecido como rancidez hidrolítica. Diferentemente da rancidez oxidativa, a rancidez hidrolítica é decorrente de hidrólise da ligação éster por enzimas, presentes naturalmente ou provenientes de microrganismos contaminantes, ou pela ação do calor e umidade causando liberação dos ácidos graxos. Neste evento não ocorre formação de produtos tóxicos, entretanto, aumenta a sensibilidade dos ácidos graxos à oxidação.

Em sistemas biológicos, a formação dos RL se dá pela ação da irradiação ionizante e luz ultravioleta, por reações catalisadas pelos metais de transição – ferro e cobre – ou por enzimas que fazem homólise da ligação química. Entretanto, durante o metabolismo normal ocorre produção de RL, como subprodutos da respiração e síntese de estruturas complexas. Portanto, o termo RL também engloba as espécies reativas do oxigênio e nitrogênio geradas no metabolismo de sistemas vivos, que quando superam a capacidade antioxidante biológica, causam estresse oxidativo.

2.2.2. Oxidação lipídica

Os lipídios são susceptíveis ao ataque dos RL e a oxidação ocorre como uma reação em cadeia. Os PUFA são mais susceptíveis à oxidação, resultando na formação de alcanos, aldeídos, alcoóis e hidroperóxidos, entre outros produtos (Hogg e Kalyanaraman, 1999). Esta maior susceptibilidade dos PUFA à oxidação deve-se ao fato de que os hidrogênios bis-alílicos do grupo metileno são mais susceptíveis à abstração pelos radicais oxidáveis do que os hidrogênios metilênicos dos lipídios saturados (Figura 8). Isso porque hidrogênio bis-alílico, hidrogênio ligado a um carbono adjacente a duas ligações duplas, possui menor energia de dissociação facilitando o processo de abstração.

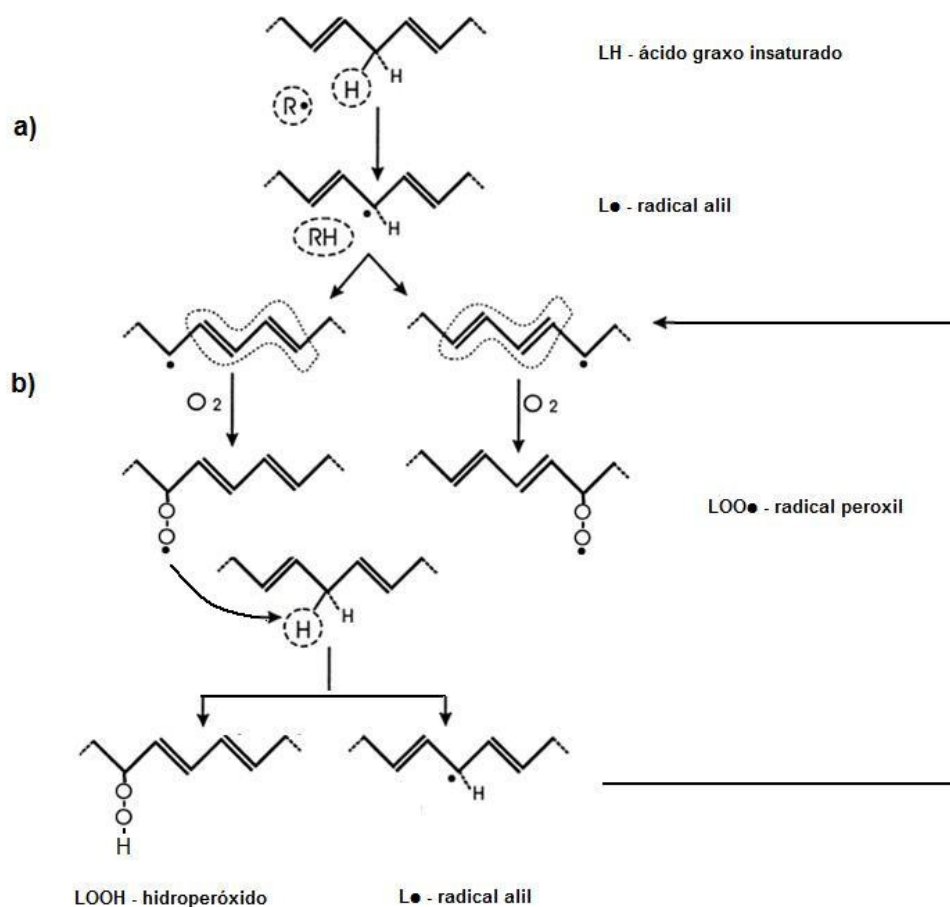


Figura 8. Peroxidação lipídica – uma reação em cadeia: a) iniciação: interação da espécie reativa com o AGPI tem como consequência a perda de um átomo de hidrogênio e a formação do radical alil; b) propagação: este radical incorpora rapidamente uma ou mais moléculas de oxigênio e transforma-se em radical peróxil. O radical peróxil é a espécie central da reação em cadeia da peroxidação lipídica. Esse pode abstrair um hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo adjacente formando um hidroperóxido e um radical lipídico secundário. Este radical lipídico secundário reagirá com o oxigênio, gerando o radical peróxil e propagando a reação. Os hidroperóxidos são instáveis e na presença de metais de transição podem decompor-se para produzir novos RL e aldeídos citotóxicos ($\text{LOOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LO}\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ ou $\text{LOOH} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{LOO}\cdot + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+$). Adaptado de Vannucchi et al. (1998); Hogg e Kalyanaraman (1999), Gurr et al. (2002) e Surai (2002).

Classicamente, a peroxidação é dividida em três etapas: iniciação e propagação, demonstradas na figura 8, e terminação. Nesta terceira e última etapa, dois radicais livres formados nas etapas anteriores – L• e LOO• – reagem originando produtos não radicais.

Segundo Silva et al. (1999), é possível distinguir estas três etapas de evolução oxidativa da seguinte forma: a) desaparecimento dos substratos de oxidação – lipídio insaturado, oxigênio; b) aparecimento dos produtos primários de oxidação – peróxidos e hidroperóxidos – cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes; e c) aparecimento dos produtos secundários de oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos. Os peróxidos são intermediários instáveis, especialmente se expostos a altas temperaturas ou em presença de metais de transição, portanto eles são decompostos pela interação com radicais livres, formando o radical peroxil ($\text{LOOH} + \text{R}\bullet \rightarrow \text{LOO}\bullet + \text{RH}$), ou pela ruptura da ligação oxigênio-oxigênio, que é relativamente fraca, formando os radicais alcóxil ($\text{LO}\bullet$) e hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Os produtos secundários são produzidos no decurso da decomposição dos primários. Dentre esses, um dos principais é o malondialdeído.

O malondialdeído (MDA) é formado durante a oxidação dos PUFA por cisão beta dos PUFA peroxidados, principalmente do ácido araquidônico (Lima e Abdalla, 2001). Este aldeído com três átomos de carbono ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$) é muito utilizado para avaliar a oxidação lipídica em alimentos e principalmente o estresse oxidativo em amostras biológicas, através do teste de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, conhecido como TBARS. O princípio do TBARS baseia-se na reação de uma molécula de MDA com duas de ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e sob altas temperaturas, formando um complexo vermelho, que pode ser determinado por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência.

Segundo Fellenberg e Speisky (2006), o TBARS tem sido criticado pela falta de especificidade, já que o MDA não é o único produto da oxidação dos lipídios que reage com o TBA e é por isso que o termo “substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico” é preferível. Outro problema é que quando a quantidade de MDA é baixa, outras substâncias reagem com o TBA, como aldeídos não provenientes de oxidação lipídica e açúcares como sacarose e glicose, o que pode levar a um resultado superestimado. Ainda o MDA pode se complexar com proteínas, amins e outros compostos, não reagindo com o TBA, subestimando a oxidação da amostra. Apesar das críticas o TBARS é muito utilizado, na prática e experimentalmente, por ser simples e útil na predição de peroxidação lipídica *in vitro*. Utilizá-lo em combinação com outros métodos, como índice de peróxido (IP) e cromatografia gasosa (CG) é recomendável para entender melhor o que está ocorrendo na amostra. O IP é um indicador sensível no estágio inicial da oxidação e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor está por ocorrer. O peróxido é um produto primário muito instável da oxidação, e sua variação ocorre de forma gaussiana, portanto baixos níveis deste podem indicar tanto a estabilidade oxidativa da amostra quanto ser indicativo de alteração pronunciada. A CG analisa os substratos da oxidação, portanto, ao serem oxidados os AG desaparecem e os AG residuais são quantificados nesta análise.

Os métodos para avaliar o grau de oxidação lipídica descritos acima possuem vantagens e desvantagens, portanto a utilização concomitante destes visa reduzir os erros de interpretação, já que cobrem as três etapas da oxidação: CG – desaparecimento dos substratos que são os ácidos graxos, IP – aparecimento dos produtos primários da oxidação, ou seja, dos peróxidos, e TBARS – aparecimento dos produtos secundários da oxidação, portanto, formação do malondialdeído.

2.2.3. Oxidação protéica

As proteínas são o segundo substrato susceptível à oxidação, entretanto, recebem menos atenção, pois o processo é mais lento e contido quando comparado à oxidação lipídica.

Os danos às proteínas causados por RL podem ser iniciados pela perda de elétron, por reações com metais de transição e pela autooxidação de lipídios e açúcares (Berlett e Stadtman, 1997). A continuação da oxidação é dependente de oxigênio e envolve vários radicais de propagação, especialmente o radical alcóxil (Figura 9).

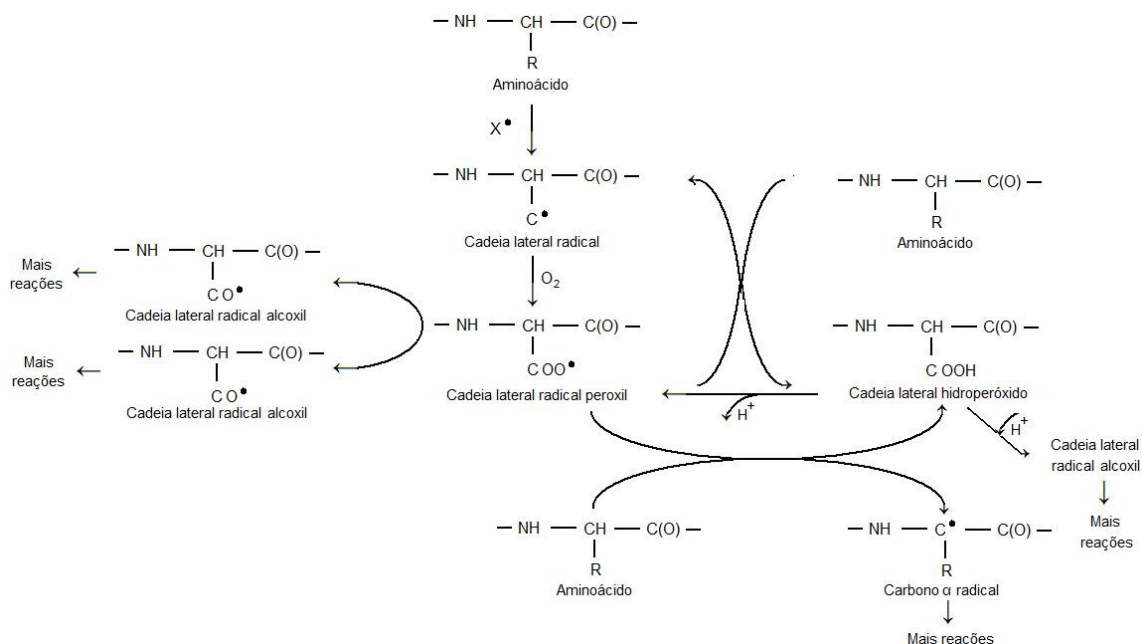


Figura 9. Oxidação protéica. Atuação dos radicais livres sobre a cadeia lateral do aminoácido e sobre o carbono alfa. Adaptado de Dean et al. (1997).

Segundo Fellenberg e Speisky (2006), a oxidação protéica pode ser aumentada em função de um processo de peroxidação lipídica, e dependendo do tipo de modificação estrutural induzida, a proteína atacada pode ter sua funcionalidade afetada in vivo (enzimas inativadas) e/ou suas características nutricionais e organolépticas modificadas nos alimentos.

2.2.4. Sistema enzimático de defesa antioxidante

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxirredutores, como RL, e o sistema de defesa antioxidante. Uma vez que os RL são gerados endogenamente no organismo como consequência do metabolismo, a maioria das espécies vivas possui eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos dessas espécies reativas. Neste processo, estão envolvidas enzimas como glutatona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase, cujos mecanismos de ação estão demonstrados na figura 10.

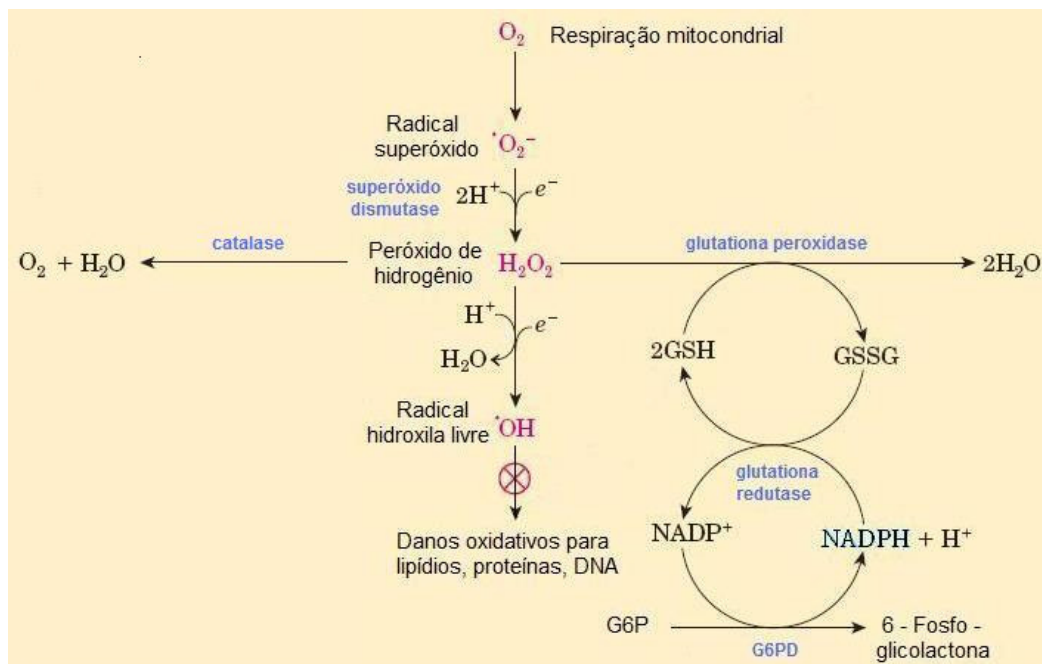


Figura 10. Enzimas que atuam em grupo contra os efeitos tóxicos dos RL. Os oxidantes reativos são gerados como produtos colaterais metabólicos (Nelson e Cox, 2002). O radical superóxido é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente, na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido. O radical hidroxila é considerado o mais reativo em sistemas biológicos e é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} ou Cu^{2+}), denominada de reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é extremamente danoso, pois tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas. Durante os processos normais de detoxificação, a enzima SOD converte o radical superóxido, proveniente da cadeia respiratória, em peróxido de hidrogênio. Tanto a catalase quanto a GSH-Px atuam removendo H_2O_2 da célula. O peróxido de hidrogênio é convertido em água pela glutatona peroxidase (GSH-Px) sob ação da glutatona reduzida (GSH) sob ação da glutatona oxidada (GSSG) é reciclada na forma reduzida pela glutatona redutase e NADPH. O H_2O_2 ainda pode ser quebrado em H_2O e O_2 pela ação da enzima catalase. Adaptado de Nelson e Cox (2002) e Champe et al. (2006).

A alta concentração de PUFA dos tecidos embrionários (Surai et al., 1997) combinada com o aumento do consumo de oxigênio desde a metade até o final do período de incubação (Wilson et al., 1992), faz com que estas modificações oxidativas sejam acompanhadas por mudanças nas concentrações das enzimas antioxidantes nos tecidos do embrião (Surai, 1999).

Segundo Surai et al. (1999b), as enzimas antioxidantes – SOD, GSH-Px e catalase – protegem os tecidos embrionários de forma específica contra a peroxidação lipídica durante a incubação e atuam como principal sistema de defesa antioxidante do pinto à eclosão.

Estas enzimas, também presentes no plasma seminal e nos espermatozoides, protegem a membrana espermática, rica em PUFA, da peroxidação (Makker et al., 2009). Entretanto, segundo Rutz et al. (2005) esta proteção é temporária, já que o plasma seminal é rapidamente substituído pelo fluido secretado pelo oviduto. Uma vez armazenados nas glândulas hospedeiras do oviduto, os espermatozoides passam a ser protegidos por um mecanismo complexo, no qual participam a GSH-Px, glutatona redutase, SOD e vitaminas C e E.

A suplementação mineral não é objetivo nesta tese, mas vale ressaltar que os minerais devem ser supridos adequadamente pela dieta, pois esses são essenciais ao funcionamento das enzimas antioxidantes. A SOD utiliza o cobre, ou zinco ou manganês como cofator, enquanto a GSH-Px utiliza o selênio.

2.2.5. Antioxidantes naturais

A ingestão de substâncias com propriedades antioxidantes, tais como: vitamina E, C e carotenóides, auxiliam o mecanismo de defesa enzimático no controle dos danos causados nas células pelos RL.

Nas membranas, o principal removedor de RL é o alfa-tocoferol ou vitamina E. As formas beta-, gama- e sigma-tocoferol são menos importantes por serem menos absorvidas. A diferença entre estas formas é estrutural. Os tocoferóis removem os radicais peroxil, doando seu átomo de hidrogênio para esse, convertendo-o em peróxido.

Do ponto de vista químico, a propriedade mais interessante da vitamina C ou ácido ascórbico é sua habilidade de atuar como agente redutor (doador de elétrons). Desta forma, reage rapidamente com os RL, além de atuar sinergicamente com a vitamina E, regenerando-a, em sistemas biológicos (Figura 11). Os estudos sobre a suplementação de vitamina C para aves são escassos, porque essas são capazes de sintetizá-la e a vitamina não é transferida ao ovo, como ocorre com a vitamina E e os carotenóides.

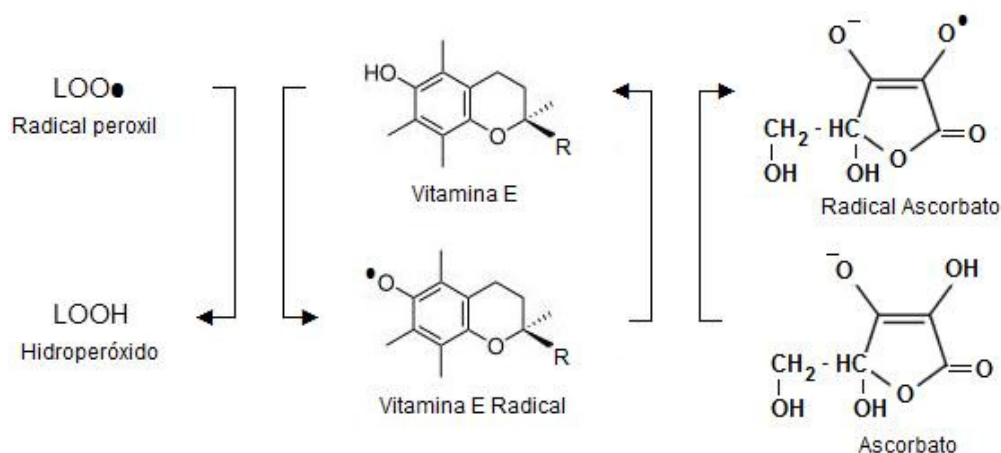


Figura 11. Regeneração da vitamina E pela vitamina C. Após doar o hidrogênio, a vitamina E ou tocoferol é convertida em vitamina E radical, pois o oxigênio da hidroxila passa a ter o elétron não pareado. Este radical migra para a superfície da membrana para ser reduzido pelo ácido ascórbico ou vitamina C, que é solúvel em água. O resultado desta interação é a formação do radical ascórbico, que é muito pouco reativo. Dois radicais ascórbico podem interagir ou outra fonte de redutor, como o NADH, pode regenerar o ascórbico. O hidroperóxido resultante da ação do antioxidante sobre o radical peroxil é removido pela ação das fosfolipases e metabolizado pela glutatona peroxidase que o reduz à álcool. Vale destacar que a vitamina E radical e a vitamina C radical não são reativas, pois seus elétrons não-pareado são estáveis energeticamente. Adaptado de Araújo (2006).

Apesar dos carotenóides serem conhecidos como precursores de vitamina A, esses possuem importante papel antioxidante, pois atuam como removedor de RL e atenuador físico, absorvendo e dissipando o excesso de energia de espécies químicas altamente reativas. Böhm et al. (1997) ainda demonstraram a possibilidade dos carotenóides reciclarem a vitamina E, uma vez que estes são capazes de doar elétrons ao radical alfa-tocoferoxil ($\text{TO}\bullet + \text{CAR} + \text{H}^+ \rightarrow \text{TOH} + \text{CAR}\bullet+$).

2.2.5.1. Cantaxantina – carotenóide precursor de vitamina A?

Em relação ao papel dos carotenóides como substâncias pró-vitamina A, Surai et al. (2001) afirmaram que menos de 10% desses podem ser convertidos em vitamina A, sendo que nas aves somente o alfa e beta-carotenos e a criptoxantina presentes nos alimentos naturais são capazes de contribuir com o suprimento desta vitamina, portanto a cantaxantina não está incluída neste grupo provitamínico. Ainda segundo estes autores, uma porção dos carotenóides com atividade pró-vitamina A

é convertida em vitamina A na mucosa intestinal e uma pequena parte escapa à conversão e entra na corrente sanguínea para ser depositada na gema ou na pele.

De acordo com European Commission (2002), a cantaxantina é absorvida no intestino delgado e transportada pelo sangue ao fígado, onde parte é transformada em substâncias intermediárias precursoras de vitamina A, como 4-oxoretinol, e o restante permanece íntegro transportado pelas lipoproteínas aos depósitos alvos.

Beardsworth e Henández (2003) relataram que a atividade pró-vitamina A da cantaxantina tem sido reconhecida e que esta pode ser transformada em vitamina A nas aves quando o nível desta última é limitado na dieta.

Surai et al. (2003) reafirmaram que as dietas das aves são suplementadas com retinol sintético e, portanto, a contribuição dos carotenóides derivados do alimento para a formação de vitamina A é mínima.

2.2.6. Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos têm sido largamente utilizados para preservação de alimentos devido à sua eficiência e baixo custo. Os mais utilizados são os derivados de estruturas fenólicas, como BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), TBHQ (butil hidroquinona), galatos e etoxiquim.

A cantaxantina e a vitamina E também podem ser sintéticas. No caso da vitamina E, a diferença entre a forma natural e a sintética está na sua origem. Para diferenciá-las, os nomes comerciais das vitaminas E iniciam com “d” ou “dl”, que referem-se a diferenças na estrutura química, e representam a forma natural e sintética, respectivamente. A forma natural é mais ativa e melhor absorvida. Segundo Acuff et al. (1994), a forma sintética precisa ser primeiramente hidrolisada no lúmen intestinal, para então ser absorvida. Diferentemente da forma natural, a vitamina E sintética só é encontrada na estrutura alfa.

Os carotenóides são substâncias bastante instáveis em função da presença de insaturações em sua composição, podendo oxidar facilmente na presença de fatores adversos como temperatura, luz e pH (Meléndez-Martínez et al., 2004). Desta forma, na produção da cantaxantina sintética são utilizados antioxidantes sintéticos, como etoxiquim para estabilizá-la. O Carophyll Red® é composto de no mínimo 10% de cantaxantina e aproximadamente 2,2% de etoxiquim.

Assim como a vitamina E natural, discutida anteriormente, os antioxidantes sintéticos atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-o em produtos estáveis através da doação de hidrogênio ou elétrons, além de reagirem com os radicais lipídicos, formando o complexo antioxidante-lipídio (Araújo, 2006). O mecanismo de ação está demonstrado na figura 12.

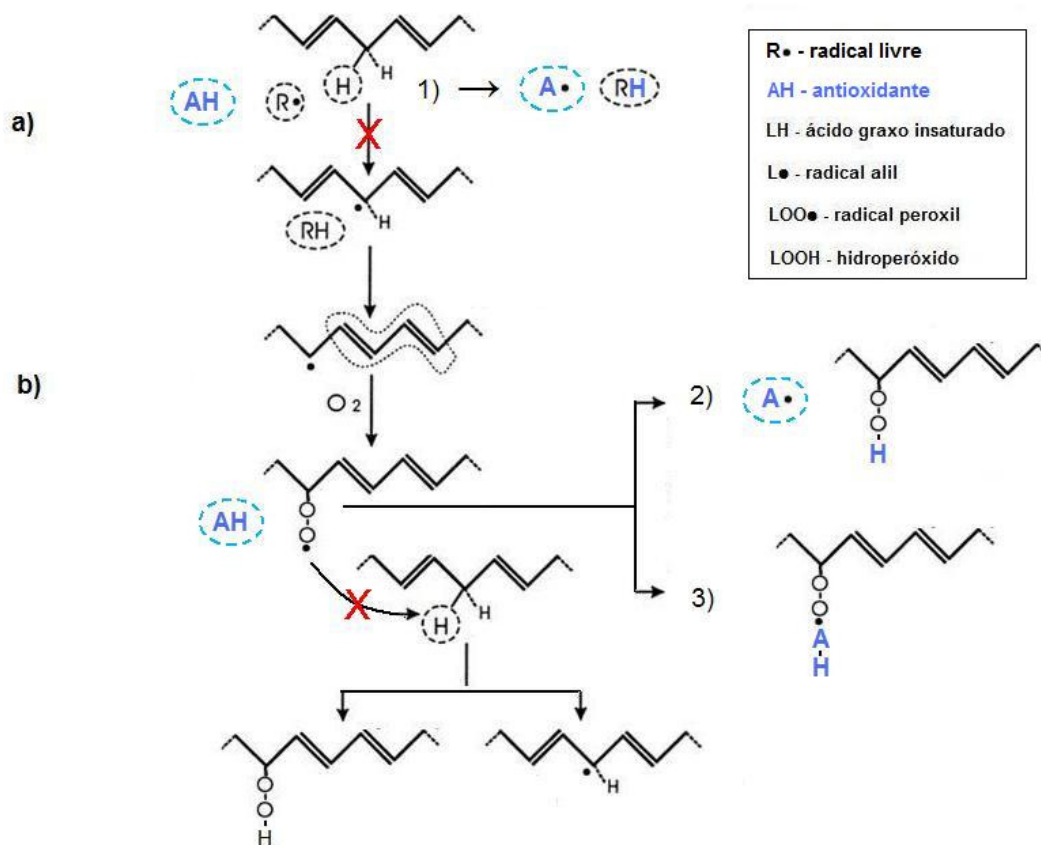


Figura 12. Mecanismo de ação dos antioxidantes primários. Neste grupo estão incluídos os antioxidantes sintéticos e o tocoferol. Estes podem atuar inibindo a fase inicial da reação, pela interação com os radicais livres (1), ou na inibição da etapa de propagação, reagindo com o radical peróxil (2) e/ou pela formação do complexo antioxidante-peróxil (3).

A escolha do antioxidante dependerá do tipo de produto que deseja-se estabilizar, pois o BHA e o BHT são eficientes na estabilização de gordura animal e apresentam pouca eficiência em óleos vegetais (Araújo, 2006). Já o galato estabiliza tanto a gordura animal quanto os óleos vegetais. O TBHQ é muito efetivo na estabilização de óleos e gorduras, especialmente em óleos vegetais poliinsaturados brutos e refinados.

A utilização combinada de dois ou mais antioxidantes pode ser feita a fim de explorar o sinergismo entre eles. O sinergismo ocorre quando a mistura de antioxidantes produz melhores resultados do que a utilização isolada de um deles, através de um mecanismo ainda desconhecido segundo Araújo (2006).

Na avicultura, a utilização dos antioxidantes como BHT, BHA, etoxiquim e galato, é limitada aos ingredientes das rações, para garantir sua conservação durante o armazenamento, e quando utilizados na dieta das aves, geralmente são adicionados às rações dos frangos de corte. Em matrizes pesadas e poedeiras comerciais, prefere-se utilizar antioxidantes como vitamina E e cantaxantina.

2.2.7. Utilização de antioxidantes nos ingredientes das rações das aves

A peroxidação lipídica nas aves é influenciada pela qualidade da matéria-prima (consumo de lipídios oxidados), alta presença de ácidos graxos insaturados nos tecidos e ingestão inadequada de nutrientes envolvidos no sistema de defesa antioxidante. Desta forma, a utilização de antioxidantes nos insumos e na ração das aves, visa preservar a qualidade e os níveis nutricionais do

alimento e consequentemente proteger os tecidos da ave viva e o produto final das matrizes que são os ovos férteis e pintos.

Dentre os ingredientes que compõem as rações, as farinhas de origem animal e as fontes de gordura constituem a principal preocupação dos nutricionistas em relação à rancificação. Isto porque os peróxidos e os produtos de sua degradação podem ser absorvidos pelo organismo, e mesmo na ausência de absorção representam riscos para a mucosa intestinal das aves, portanto, de maneira geral afetam negativamente o desempenho.

As farinhas de carne e ossos são utilizadas como fonte de fósforo, devido a sua disponibilidade e preço. Entretanto, estas ainda são fonte de proteína e energia, sendo a última fornecida principalmente pela gordura presente na farinha. Desta forma, a oxidação das gorduras das farinhas deve ser evitada para prevenir a formação de compostos tóxicos e a redução da energia metabolizável da mesma. Racanicci et al. (2000) observaram que a adição de 500 mg/kg de BHT à farinha de carne e ossos previne a rancidez oxidativa quando feita até sete dias da produção desta. Entretanto, a qualidade da mesma deve ser verificada ainda na compra, através de testes como índice de acidez e de peróxidos, já que o antioxidante consegue parar o processo de oxidação a partir de sua adição, entretanto não repara os danos causados anteriormente ao ingrediente.

2.2.8. Suplementação das dietas de matrizes pesadas com vitamina E

Para avaliar as concentrações de vitamina E na gema, nos tecidos do embrião e dos pintos recém eclodidos, bem como a susceptibilidade dos tecidos do pinto à peroxidação lipídica, Surai et al. (1999a) trabalharam com matrizes da linhagem Ross, as quais foram alimentadas com rações suplementadas com 30 e 250 mg de vitamina E/kg. Os autores observaram que a maior quantidade de vitamina E na dieta da matriz aumentou os níveis dessa na gema e nos tecidos embrionários e do pinto recém eclodido, reduzindo a susceptibilidade destes tanto à peroxidação espontânea quanto à estimulada pelo sulfato ferroso. Os autores concluíram que o aumento dos níveis de vitamina E na dieta de matrizes reduziu significativamente a susceptibilidade peroxidativa dos tecidos do pinto, especialmente do cérebro, que é o mais afetado, quando comparado aos outros tecidos, devido às altas quantidades de PUFA.

Surai (2000) avaliou o efeito de quatro níveis de suplementação de vitamina E na ração – zero, 40, 100, 200 mg/kg – para matrizes Cobb sobre a transferência dessa para a gema do ovo e tecidos embrionários e o desenvolvimento do sistema antioxidante do pinto até dez dias de idade. A ração basal continha 10,05 mg/kg de alfa-tocoferol. O acúmulo de vitamina E na gema do ovo refletiu a concentração dessa na ração das matrizes. A quantidade de vitamina presente no saco vitelino e no fígado dos pintos com um, cinco e dez dias de idade foi proporcional à concentração desta na gema do ovo. O maior nível de vitamina E, 200 mg/kg, apresentou efeito positivo na concentração hepática de GSH-Px – 631,1 e 721,1 µg/g com um e cinco dias de idade – quando comparado ao grupo controle – 482,9 e 563,1 µg/g nas mesmas idades ($P \leq 0,05$). Com um e cinco dias, o acúmulo de MDA no fígado resultante da peroxidação lipídica estimulada por ferro foi menor para os pintos provenientes de matrizes suplementadas com vitamina E quando comparado ao grupo controle, e no maior nível de suplementação esta diferença foi mantida até dez dias de idade. O autor concluiu que a eficiência da transferência de vitamina E da gema para o fígado do embrião depende da sua concentração no ovo e que o efeito benéfico desta adição está na proteção antioxidante do pinto recém eclodido e durante os primeiros dias de vida.

2.2.9. Suplementação da dieta das galinhas com vitamina A

A interferência da suplementação de vitamina A na dieta de matrizes sobre a redução da absorção entérica da vitamina E foi relatada por Combs (1976). Este autor ainda observou que este efeito prejudica a progênie, pois matrizes alimentadas com altos níveis de vitamina A, apresentaram baixos níveis plasmáticos de vitamina E e, portanto, reduzidas concentrações desta última na gema dos ovos.

Surai et al. (1998) observaram uma interrelação entre as concentrações de vitamina A, E, carotenóides e ácido ascórbico nos tecidos da galinha e do embrião e também na gema dos ovos produzidos por aves que receberam rações suplementadas com zero, 3, 30 e 120 mg/kg de vitamina A na forma de acetato de retinol. De maneira geral, os maiores níveis de vitamina A na ração reduziram significativamente tanto as concentrações de vitamina E e carotenóides na gema do ovo como as concentrações desses e de ácido ascórbico no fígado das galinhas e do embrião. Esta redução acarretou aumento na susceptibilidade do fígado do embrião à peroxidação lipídica espontânea e estimulada por sulfato ferroso. Os autores concluíram que o excesso de vitamina A na dieta da matriz está associado à redução da eficiência do sistema antioxidante do fígado do embrião em desenvolvimento e do pinto de um dia.

Grobas et al. (2002) também observaram efeito negativo da suplementação de vitamina A na dieta de galinhas sobre a concentração de alfa-tocoferol na gema dos ovos. Esse foi atribuído à competição entre estas vitaminas durante a absorção.

2.2.10. Utilização de carotenóides na dieta de matrizes e relação entre estes e a vitaminas A e E

Surai e Sparks (2001) compararam ovos, embriões e pintos produzidos por matrizes alimentadas com duas dietas: à base de milho, rica em carotenóides, especialmente luteína e zeaxantina – 11,8mg de carotenóides/kg, e à base de trigo – 5,6mg de carotenóides/kg. Os ovos provenientes de galinhas alimentadas com dieta à base de milho apresentaram maiores ($P \leq 0,01$) concentrações de beta + gama-tocoferol, carotenóides totais, luteína e zeaxantina, assim como os tecidos dos pintos nascidos destes ovos. Os autores concluíram que a dieta da matriz tem importante função na formação do sistema antioxidante durante o desenvolvimento embrionário e que a dieta à base de milho aumenta o potencial antioxidante da gema do ovo e dos tecidos embrionários quando comparada à dieta a base de trigo.

Para observar os efeitos da suplementação de cantaxantina (Carophyll Red®) na dieta de matrizes com 30 semanas de idade sobre o sistema antioxidante do embrião e pinto, Surai et al. (2003) utilizaram cinco dietas: controle – com menos de 2mg de carotenóides totais/kg de ração e sem cantaxantina, e 3, 6, 12 e 24 mg de cantaxantina/kg de ração. Os níveis de cantaxantina na gema do ovo, no fígado e no saco vitelino dos embriões com 16 dias e dos pintos com um dia e no fígado dos pintos com sete dias aumentaram ($P \leq 0,001$) de maneira crescente de acordo com o aumento na suplementação das dietas das matrizes com Carophyll Red®. No grupo controle, a cantaxantina não foi identificada em nenhuma das amostras acima citadas. A concentração de vitamina A na gema do ovo e nos tecidos embrionários e dos pintos não foi afetada pelas diferentes concentrações de cantaxantina. Isso porque a cantaxantina não é considerada um carotenóide precursor desta vitamina, a menos que a ave esteja com hipovitaminose A. A cantaxantina demonstrou efeito positivo sobre a concentração de vitamina E de três formas descritas a seguir: 1) aumentou a assimilação de gama-tocoferol da dieta e sua transferência para gema do ovo e consequentemente aumentou as concentrações desta substância no fígado do embrião e do pinto após a eclosão; 2) aumentou as concentrações de alfa-tocoferol nos tecidos e no plasma dos pintos com um dia de idade, pois a cantaxantina agiu como antioxidante durante o desenvolvimento embrionário sequestrando RL e deixando menos espécies reativas disponíveis para reagir com a vitamina E. Dessa forma, a vitamina E foi “economizada” e seus níveis aumentados; e 3) possivelmente auxiliou na regeneração da vitamina E, através da transferência de elétron dos carotenóides para o radical alfa-tocoferoxil. Os autores concluíram que os carotenóides podem modular o sistema antioxidante do embrião e pinto, ajudando a manter sua eficiência.

Koutsos et al. (2003) verificaram que a dieta materna rica em carotenóides influenciou a concentração desses nos tecidos dos frangos até 28 dias. Segundo Karadas et al. (2005) a dieta da matriz enriquecida com carotenóides é o principal fator que influencia a concentração de carotenóides no fígado dos pintos na primeira semana de vida e, que a partir desta idade a alimentação do pinto passa a influenciar estes níveis. Baseados no importante papel dos carotenóides como antioxidante imediatamente após a eclosão, estes autores concluíram que o consumo de carotenóides

pela matriz, além de influenciar a incorporação desses pelos tecidos da progênie, pode ser necessário para aumentar a viabilidade da mesma.

Em experimentos recentes, Souza et al. (2008) e Scher et al. (2009) adicionaram 6ppm de cantaxantina (60 g de Carophyll Red®/ton de ração) na dieta de matrizes e observaram redução do número de ovos inférteis e da mortalidade embrionária e melhora nas taxas de eclosão sobre ovos totais e ovos férteis incubados.

Rosa et al. (2010) alimentaram matrizes com 6ppm de cantaxantina (60 g de Carophyll Red®/ton de ração) e verificaram um aumento de 1,08% na fertilidade, 3,0% na eclosão total e 2,4% na eclosão sobre ovos férteis quando comparado ao grupo de matrizes que não receberam cantaxantina na dieta. Estes autores ainda armazenaram os ovos por zero, quatro, oito e doze dias e observaram que as gemas dos ovos das matrizes alimentadas com cantaxantina apresentaram menores valores de TBARS, medido em MDA por miligramas de proteína, nestes períodos, quando comparadas aos ovos das aves que receberam dieta sem cantaxantina.

2.2.11. Lipídios dos ovos de consumo também oxidam

Galobart et al. (2001a) avaliaram o efeito antioxidante da adição de vitamina E – 0 e 200 mg/kg – à ração de poedeiras contendo 5% de óleo de linhaça. A vitamina E foi eficiente como antioxidante, pois no grupo suplementado os valores de hidroperóxidos dos ovos foram significativamente menores quando comparado ao grupo não suplementado. Na oxidação induzida por ferro, a atuação da vitamina E como antioxidante ficou caracterizada, uma vez que o grupo suplementado apresentou baixos valores TBA quando comparado ao grupo não suplementado durante todo o período de incubação da amostra de ovos.

Em outro experimento, Galobart et al. (2001b) observaram novamente o efeito positivo da vitamina E, suplementada na ração em 200 mg/kg, sobre a estabilidade oxidativa dos ovos enriquecidos com PUFA ω -3. Estes pesquisadores ainda adicionaram cantaxantina à ração – 0 e 5 mg / kg, porém esta concentração foi muito baixa e não foi verificada ação antioxidante ou atividade sinérgica entre a cantaxantina e a vitamina E.

Botsoglou et al. (2005) avaliaram a capacidade antioxidante da vitamina E, suplementada na dieta de poedeiras, sobre os lipídios da gema de ovos armazenados por dois meses sob refrigeração a 4°C. Foi observado que o ovo em casca armazenado sob refrigeração é resistente à oxidação lipídica pois a concentração de MDA manteve-se relativamente constante durante o período de armazenamento, independente dos tratamentos – 0 e 200 mg/kg de acetato de alfa-tocoferil. A concentração de MDA diferiu estatisticamente entre os tratamentos ainda no dia zero, que levaram os autores a concluir que a vitamina E apresentou efeito antioxidante in vivo, reduzindo a reação em cadeia proveniente da oxidação dos lipídios consumidos, e, portanto, diminuiu a transferência dos produtos de oxidação, MDA, à gema do ovo. Outra explicação possível para este resultado seria o consumo de MDA pré-formado na ração, entretanto, as rações foram analisadas e não apresentaram diferenças nos valores de MDA, invalidando esta hipótese.

Trabalhos com ovos comerciais demonstraram que os lipídios da gema sofrem oxidação durante o período de armazenamento, e que esta oxidação aumenta com o maior período, tanto em condições refrigeradas – a 4°C – quanto em temperatura ambiente – 25°C –, sendo marcante o efeito da temperatura mais alta (Franchini et al., 2002; Cherian et al., 2007; Giampietro et al., 2008).

2.3. ARMAZENAMENTO DE OVOS FÉRTEIS

2.3.1. Desenvolvimento embrionário e “zero fisiológico”

O desenvolvimento embrionário se dá em duas etapas, antes da postura – quando o ovo ainda está em formação no oviduto – e após a postura – quando o ovo é incubado artificialmente sob temperatura e umidade de 37,5°C e 60%, respectivamente.

Aproximadamente três horas após fertilização no infundíbulo, o desenvolvimento embrionário inicia concomitantemente à formação do ovo no oviduto, assim no momento da postura os embriões estão em fase de pré-gástrula ou nos estágios iniciais da gastrulação.

O início do desenvolvimento do embrião se dá no oviduto porque a temperatura corporal da galinha é de 40 a 41°C. Entretanto, após a postura o ovo sofre influência direta da temperatura ambiente, e se esta estiver abaixo de 24°C, o desenvolvimento embrionário é paralisado. Por isso, considera-se a temperatura de 24°C o “zero fisiológico” do embrião, ou seja, temperatura abaixo da qual o desenvolvimento embrionário é paralisado. Desta forma, o período de armazenamento dos ovos é realizado em temperaturas abaixo do “zero fisiológico” e o desenvolvimento embrionário só é retomado quando os ovos são incubados à temperatura de 37,5°C.

Fasenko (2007) questionou a temperatura e a denominação “zero fisiológico”, pois a literatura relata ampla variedade de temperatura mínima para desenvolvimento embrionário, desde 21 até 28°C. Além disso, o pesquisador afirma que apesar do desenvolvimento embrionário não ser observado microscopicamente, processos metabólicos celulares podem ocorrer abaixo de certas temperaturas, desta forma o conceito “zero fisiológico” deveria ser revisto.

2.3.2. Condições ambientais de armazenamento

A temperatura de armazenamento deve ser ajustada de acordo com o período de armazenamento e a idade da matriz. Ovos de matrizes jovens suportam períodos de armazenamento mais longos em temperaturas mais altas e umidades mais baixas do que ovos de matrizes velhas.

Ovos armazenados por menos de quatro dias podem ser mantidos sob temperaturas entre 20 e 25°C, quando armazenados por quatro a sete dias a temperatura deve ser aproximadamente 16-17°C, e para ovos armazenados por mais de sete dias a temperatura deve baixar para 10-12°C (Meijerhof, 1992).

Em outro estudo, Meijerhof (1995) recomendou temperaturas de 18 a 20°C para períodos de armazenamento de até três a quatro dias e utilização de altas umidades, aproximadamente 80%, para evitar a perda de peso excessiva do ovo. Entretanto, o pesquisador ressaltou que baixas temperaturas também podem ser utilizadas para ovos armazenados por períodos curtos, reduzindo a necessidade de aumentar a umidade da sala de armazenamento, uma vez que em condições semelhantes de umidade relativa, a perda de peso dos ovos é menor em temperaturas mais baixas.

Ao avaliarem curtos períodos de armazenamento para ovos de matrizes jovens e velhas, Reis et al. (1997) recomendaram que deve-se dar preferência ao armazenamento de ovos de matrizes jovens quando se pode optar por estes.

Brake (1999) recomendou diferentes condições e períodos de armazenamento para ovos originados de matrizes com idades distintas. Ovos de matrizes com idade entre 25 e 35 semanas devem ser armazenados sob umidade de 50 a 60% por períodos de até quatro dias, já que nessa fase a casca do ovo é grossa e o albúmen é espesso sendo bastante resistente à degradação. Assim o armazenamento poderia melhorar o rendimento de incubação devido à liquefação do albúmen, favorecendo as trocas gasosas. Ovos originados de matrizes com 36 a 50 semanas de idade devem ser armazenados por dois a cinco dias, sob temperatura e umidade relativa de 18°C e 75%,

respectivamente. Para armazenar ovos de matrizes com idade entre 51 e 65 semanas, é recomendado que o período não ultrapasse dois a três dias. De maneira geral, quando períodos de armazenamento acima de quatro dias são necessários, deve-se reduzir a temperatura ambiente e aumentar a umidade relativa.

Ruiz e Lunam (2002) concluíram que a temperatura de armazenamento de 16,5°C ou 20°C não influencia a eclosão sobre ovos férteis armazenados por curtos períodos, um a três dias. Entretanto, acima de nove dias de armazenamento a temperatura de 10°C deve ser utilizada para reduzir a mortalidade embrionária inicial e aumentar a eclosão sobre ovos férteis, quando comparada a temperatura de 16,5°C.

Reijrink et al. (2008) afirmaram que mortes celulares e metabolismo celular ocorrem quando os ovos são armazenados sob temperaturas abaixo, porém próximas, do zero fisiológico, portanto para cessar ou reduzir o desenvolvimento embrionário, os ovos devem ser armazenados sob temperaturas de 10°C.

Nos incubatórios de ovos de matrizes pesadas, a sala de armazenamento geralmente é a mesma sala utilizada para classificação dos ovos, e as temperaturas praticadas oscilam em torno de 20°C e 80% de umidade relativa do ar.

2.3.3. Mudança nas características dos ovos durante o armazenamento

Ovos incubados imediatamente após a postura apresentam baixo rendimento de incubação (Benton e Brake, 1996). Isso ocorre porque a excelente qualidade do albúmen de ovos frescos dificulta a movimentação de nutrientes do albúmen para o blastoderma e a difusão de gases entre o embrião e o meio (Brake et al., 1997). Estes efeitos são ainda mais pronunciados em ovos de galinhas jovens, que por serem mais eficientes na deposição das proteínas da clara, formam uma rede estável e, conseqüentemente, um albúmen denso. Além disso, a melhor qualidade da casca dos ovos destas aves dificulta ainda mais a troca de gases durante a incubação. Desta forma, antes de serem incubados os ovos são armazenados para que aumente o pH do albúmen e ocorra a sua liquefação, a fim de garantir melhores taxas de crescimento embrionário e eclosão.

Por outro lado, ovos armazenados por longos períodos também apresentam quedas significativas na eclodibilidade, e estas são atribuídas às modificações que ocorrem no embrião, descritas adiante nesta revisão, e nas características dos ovos, principalmente no albúmen.

O pH do albúmen é aproximadamente 7,6 no momento da postura e aumenta para valores que variam de 9,2 a 9,7 quando os ovos são armazenados. Isso porque uma quantidade significativa de bicarbonato e gás carbônico está presente no albúmen dos ovos no momento da postura e, durante o armazenamento, ocorre perda de CO₂ e aumento do pH, desnaturando as proteínas do albúmen, que se torna mais liquefeito, reduzindo sua altura e Unidades Haugh (Lapão et al., 1999; Xavier et al., 2008).

Enquanto o pH do albúmen apresenta aumento na alcalinidade num curto período de tempo, a gema mantém-se levemente ácida, com pH em torno de 6,5, durante o armazenamento (Lapão et al., 1999, Bakst e Holm, 2003). Desta forma, um gradiente de concentração de íons de hidrogênio de 1000 vezes (3 unidades de pH) pode ocorrer entre o blastoderma e sua posição intermediária entre o albúmen e a gema. Isso significa que o blastoderma enfrenta um ambiente bastante alcalino na superfície dorsal do epiblasto enquanto sua superfície ventral está em contato com um ambiente levemente ácido. Esta posição intermediária, faz com que o pH do blastoderma seja intermediário, e de acordo com Ognabesan et al. (2007), o pH ótimo para gastrulação é de 8,2. Entretanto, o aumento do pH do albúmen em função do período de armazenamento pode alterar o pH do blastoderma, prejudicando o desenvolvimento inicial do embrião.

O armazenamento também influencia o índice de gema (IG), medida através da divisão entre a altura e o diâmetro da gema. Este índice reduz com o maior período de armazenamento, pois a membrana vitelina enfraquece, reduzindo a altura e aumentando o diâmetro da gema (Kirunda e McKee, 2000). Este enfraquecimento da membrana vitelina e piora no IG era creditada à movimentação da água do albúmen para a gema, que ocorre em função das diferenças de pressão osmótica. Entretanto, segundo Reijrink et al. (2008), o pH do albúmen é o fator mais importante que afeta a resistência da membrana vitelina e conseqüentemente o IG. Isto porque o pH do albúmen afeta a camada chalazífera, que circunda a gema, e a resistência da membrana vitelina depende da viscosidade desta camada. Uma vez que o aumento do pH do albúmen acarreta liquefação do albúmen, incluindo a camada chalazífera, a resistência da membrana vitelina reduz e o IG aumenta. Como a membrana vitelina e a camada chalazífera protegem o embrião no início da incubação, quando o âmnio ainda não está completamente formado, a desintegração destas estruturas durante o período prolongado de armazenamento pode afetar negativamente o desenvolvimento embrionário.

2.3.4. Perda de peso dos ovos no armazenamento e na incubação

Durante o armazenamento e a incubação, os ovos perdem peso devido à perda de água, que ocorre através de processos de difusão, pelos poros da casca. Segundo Tullet (1990), aproximadamente 12% de perda de peso deve ocorrer até 18 dias de incubação para melhores índices de eclosão. Esta perda de peso depende da temperatura, umidade relativa, período de armazenamento, idade e linhagem da matriz. Os dois últimos fatores influenciam diretamente a qualidade da casca e, a espessura da casca é negativamente correlacionada à perda de peso pelos ovos (Roque e Soares, 1994).

A perda de peso dos ovos durante o armazenamento resulta em aumento da câmara de ar, que é interessante especialmente em ovos de matrizes jovens. Os ovos frescos de aves jovens são menores e possuem menor câmara de ar. Estas características associadas à casca espessa e ao albúmen denso dificultam a troca de gases entre o embrião e o meio. A perda de peso durante o armazenamento aumenta a câmara de ar que, aliada às mudanças que ocorrem no albúmen, aumentam o aporte de oxigênio ao embrião destas matrizes durante a incubação.

Apesar da perda de peso durante o armazenamento ser pequena quando comparada à grande perda de peso que ocorre durante o período de incubação, Mayes e Takeballi (1984) recomendaram que esta deve ser mínima

Walsh et al. (1995) observaram que o armazenamento por 14 dias sob temperatura de 23,9°C levou a excessiva perda de peso dos ovos, afetando a sobrevivência do embrião. Estes autores relataram que a taxa de consumo de oxigênio é equivalente a taxa de perda de água pelo embrião durante a incubação. Portanto se a perda de peso é excessiva no armazenamento, menos água resta durante o período de incubação, reduzindo o aporte de oxigênio ao embrião durante este período e elevando as mortalidades embrionárias iniciais.

Tona et al. (2001) não encontraram correlação entre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária e a perda de peso dos ovos durante os primeiros 18 dias de incubação, apesar de terem observado melhores taxas de eclosão em ovos cuja perda de peso foi entre 10,9 e 11,1% aos 18 dias de incubação. Estes autores afirmaram que o excesso de perda de peso é ruim, pois a desidratação do embrião além de prejudicar o processo de eclosão, reduz as trocas gasosas durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, o ovo que perde pouca água também pode prejudicar a eclosão, pois o embrião pode “afogar” no líquido amniótico. Isso pode ocorrer porque próximo ao momento da eclosão, o albúmen que resta na ponta fina do ovo entra no saco amniótico, formando um composto. Por diferença de pressão devido ao crescimento embrionário contínuo, este composto é consumido oralmente (Moran Jr., 2007). Quando o ovo perde pouco peso, sobra mais albúmen e composto “albúmen-líquido amniótico” se torna mais volumoso, podendo causar afogamento do embrião durante o consumo deste.

2.3.5. Viabilidade embrionária durante o armazenamento

Meijerhof (1992) relatou que a redução na eclodibilidade em função do armazenamento deve-se à redução na viabilidade do embrião, causada por mudanças que ocorrem no embrião e/ou no ovo. Dentre estas, cita-se a ocorrência de necrose celular, demonstrada por Arora e Kosin (1968) que encontraram aumento no número de células com núcleo necrótico com o maior período de armazenamento e redução da taxa de crescimento do embrião.

Em estudo realizado por Bloom et al. (1998), foi observado aumento de células apoptóticas de 3,1% observado em ovos frescos para 13,9% em ovos armazenados por 14 dias a 12°C e 50% de umidade relativa. De acordo com os autores, estes achados demonstram a resistência das células do blastoderma durante o armazenamento prolongado em temperatura baixa, entretanto, também sugerem que quantidades relativamente modestas de morte celular (14%) podem influenciar a viabilidade de embriões.

Segundo Decuypere e Bruggeman (2007), ovos armazenados por períodos prolongados podem aumentar o número de células necróticas ou podem predispor as células à apoptose não programada. Isso acarreta aumento na taxa de células embrionárias não viáveis, resultando em embriões anormais ou mortos. Os autores ainda afirmaram que um número ótimo de células embrionárias viáveis é necessário para início do crescimento e desenvolvimento embrionário normal.

A literatura relata que ovos férteis podem ser estocados por até sete dias apresentando pouco ou nenhum efeito sobre a eclodibilidade (Fasenko, 2007). Entretanto, acima de sete dias, anormalidades e mortalidade embrionárias aumentam, reduzindo a taxa de eclosão.

2.3.6. Influência do armazenamento sobre o metabolismo embrionário e o período de incubação

O armazenamento prolongado atrasa o início do desenvolvimento embrionário e aumenta o período de incubação. Visschedijk (1968) demonstrou que o período de incubação é determinado pelas quantidades de O₂ e CO₂ presentes na câmara de ar, portanto, a bicagem da casca é acelerada se os níveis de O₂ estão baixos e a quantidade de CO₂ é elevada, geralmente duas vezes maior do que a quantidade de oxigênio. Desta forma, pode-se inferir que o período de armazenamento prolongado aumenta o período de incubação devido à maior câmara de ar dos ovos. Isso porque períodos longos de armazenamento acarretam maior perda de peso pelos ovos e conseqüentemente aumentam a câmara de ar. Portanto, ovo armazenado por mais tempo possui mais oxigênio disponível para o embrião e, portanto, este eclode mais tarde.

Entretanto, Mather e Laughlin (1976 e 1977) atribuíram o aumento do período de incubação dos ovos armazenados por sete e 14 dias, comparado aos ovos frescos incubados, ao atraso no início do desenvolvimento embrionário e à menor taxa de crescimento embrionário apresentado pelos embriões dos ovos armazenados. Estes autores explicaram que o armazenamento pode atrasar a embriogênese ou que o atraso no desenvolvimento embrionário pode ser em função da menor taxa de crescimento do embrião no início da incubação.

Segundo Walsh et al. (1995), ovos armazenados por longos períodos perdem mais peso através da evaporação da água durante o armazenamento e possuem menos água disponível para ser perdida durante a incubação. Desta forma menos oxigênio será disponibilizado para o embrião durante seu desenvolvimento, reduzindo o metabolismo celular e acarretando atraso e redução no desenvolvimento embrionário.

Fazenko et al. (2002) observaram diferenças no metabolismo de embriões provenientes de ovos armazenados por quatro e 15 dias. Os embriões provenientes dos ovos armazenados por quatro dias apresentaram maior produção de gás carbônico no período de quatro a 18 dias de incubação e maior peso com 448 horas de incubação do que aqueles provenientes de ovos armazenados por 15 dias.

Christensen et al. (2002) observaram aumento de 11 horas no período de incubação quando os ovos foram armazenados por 14 dias, comparados aos armazenados por um dia.

De acordo com Schmidt et al. (2002), a ativação do desenvolvimento embrionário precoce ocorre por meio de enzimas pH-dependentes. O armazenamento prolongado aumenta o pH excessivamente, influenciando negativamente o início do desenvolvimento embrionário.

Tona et al. (2003) avaliaram o período de incubação de ovos armazenados por três e 18 dias e observaram que a eclosão dos ovos armazenados por menor período se dá entre 478 e 494 horas de incubação, sendo o pico às 486 horas. Entretanto, a eclosão de ovos armazenados por 18 dias só iniciou às 484 horas e o pico de eclosão se deu às 504 horas. Estes autores observaram que o maior período de incubação dos ovos armazenados por 18 dias ocorreu em função do atraso na bicagem da membrana interna da casca e do maior período necessário para completar a bicagem desta membrana, compreendido entre as bicagens das membranas interna e externa da casca. Este maior período foi associado ao aumento tardio na produção de corticosterona, que é necessária para estimular a conversão de T4 em T3 durante o desenvolvimento embrionário. O hormônio T3 está negativamente relacionado à concentração de pO₂/pCO₂, indicando sua relação com a taxa metabólica do embrião. Estes autores ainda verificaram menores quantidades de CO₂ e maiores quantidades de O₂ na câmara de ar dos ovos armazenados por 18 dias quando comparado aos ovos armazenados por três dias, ambos avaliados aos 18 dias de incubação e no momento da bicagem da membrana interna da casca. Isto indica que os embriões dos ovos armazenados por 18 dias se encontravam em estágio embrionário mais jovem do que os embriões dos ovos armazenados por três dias.

Segundo Fassenko (2007), o maior período de incubação dos ovos armazenados por mais tempo deve-se ao desenvolvimento mais lento do embrião.

2.3.7. Influência do armazenamento sobre o rendimento de incubação

Meijerhof et al. (1994) verificaram queda da eclosão em ovos armazenados por dois, seis, nove e 12 dias, principalmente devido ao aumento da mortalidade embrionária observada a partir de nove dias de incubação.

Lapão et al. (1999) demonstraram que a queda na eclosão nos ovos armazenados inicia um dia após a postura.

Ao realizarem um estudo epidemiológico da eclodibilidade de ovos de matrizes pesadas, Heier e Jarp (2001) verificaram redução de 0,7% na eclodibilidade por dia de armazenamento.

Elibol et al. (2002) avaliaram o efeito de três períodos de armazenamento (3, 7 e 14 dias) sobre o rendimento de incubação e verificaram queda da eclosão sobre ovos férteis com o aumento do período de armazenamento.

Ao avaliarem quatro períodos de armazenamento – dois, quatro, seis e oito dias – dos ovos de matrizes pesadas com 33 e 58 semanas de idade, Ferreira (2006) concluiu que este deve ser de quatro dias, independente da idade da matriz. Períodos de armazenamento superiores a quatro dias reduziram a taxa de eclosão e aumentaram as mortalidades embrionárias de zero a sete dias de incubação e de 19 a 21 dias de incubação e ovos bicados vivos.

Elibol e Brake (2008) observaram queda na eclosão, devido ao aumento na mortalidade embrionária inicial (zero a seis dias de incubação) e tardia (18 a 21 dias de incubação incluindo bicados), quando os ovos foram estocados por 14 dias comparados aos armazenados por três dias.

De acordo com estudo de campo realizado com dados de três anos provenientes de três incubatórios holandeses, Yassin et al. (2008) observaram que até o sétimo dia de armazenamento, cada dia a mais de armazenamento reduz a eclodibilidade em 0,2%. Após sete dias, esta redução na eclosão aumenta para 0,5% a cada dia extra de armazenamento.

Ao avaliarem o efeito de dois, quatro, seis, oito, dez, 12 e 14 dias de armazenamento de ovos férteis sobre a eclosão e mortalidade embrionária, Schmidt et al. (2009) observaram efeito linear dos períodos de armazenamento sobre a eclosão e mortalidade embrionária. Cada dia a mais de armazenamento dos ovos resultou em redução de 1,17 e 1,15% na eclosão e mortalidade embrionária, respectivamente.

Tanure et al. (2009) observaram redução na taxa de eclosão dos ovos de matrizes leves com 57 semanas de idade armazenados por sete dias quando comparado a três e cinco de armazenamento.

2.3.8. Peso do pinto em função do armazenamento dos ovos férteis

Ruiz e Lunam (2002) observaram que pintos provenientes de ovos armazenados por nove a 11 dias a 10°C foram mais pesados à eclosão do que os provenientes de ovos armazenados pelo mesmo período, porém em temperaturas mais altas. Os autores não explicaram este fato, entretanto, pode ter ocorrido menor perda de peso durante o armazenamento dos ovos sob temperatura mais baixa, restando maior quantidade de água para ser evaporada durante a incubação, garantindo maior aporte de oxigênio ao embrião, e portanto, maior metabolismo e deposição de tecido.

Curtos períodos de armazenamento também podem prejudicar o peso do pinto. Em avaliação do peso relativo dos pintos provenientes de ovos armazenados por dois, quatro, seis e oito dias, Ferreira (2006) verificou menor peso relativo nos pintos eclodidos de ovos armazenados por dois dias, quando comparado aos demais períodos de armazenamento. A autora creditou esta inferioridade de desenvolvimento embrionário à menor liquefação do albúmen durante o curto armazenamento, resultando em menor aporte de oxigênio e nutrientes para os embriões e menor deposição de tecido corporal.

Tanure et al. (2009) também observaram que o menor período de armazenamento dos ovos férteis, três dias, resultou em pintos mais leves à eclosão, quando comparado à sete dias de estocagem dos ovos.

2.4. FERTILIDADE DAS MATRIZES PESADAS EM IDADE AVANÇADA

2.4.1. Estresse oxidativo como causa da infertilidade

Na medicina humana, o estresse oxidativo dos espermatozóides tem recebido cada vez mais atenção em função deste ser uma importante causa de infertilidade. Poucos trabalhos na avicultura investigam esta causa de infertilidade dos galos.

Aitken (1994) demonstrou que a infertilidade envolve perda de função espermática como consequência de estresse oxidativo. Este estresse, originado da excessiva geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos espermatozóides, resulta na peroxidação de PUFA presentes na membrana espermática. Os peróxidos formados prejudicam a motilidade dos espermatozóides e a capacidade dos mesmos penetrarem o oócito, contribuindo para a infertilidade.

Apesar das ERO promoverem danos nos espermatozóides, em quantidades fisiológicas estas moléculas controlam a função espermática (Aitken, 1995). O mecanismo de ação das ERO na fisiologia dos espermatozóides ainda não está totalmente elucidado, mas as ERO participam da reação acrossômica e hiperativação (Sharma e Agarwal, 1996), além da compactação da cromatina durante a maturação dos espermatozóides (Weir e Robaire, 2007).

Lucchese et al. (2007) afirmaram que além da vulnerabilidade da membrana plasmática dos espermatozóides à peroxidação lipídica, prejudicando a estrutura celular, motilidade, sobrevivência e funções metabólicas, o estresse oxidativo pode induzir dano ao DNA espermático, acelerando o processo de apoptose da célula germinativa, diminuindo a concentração de espermatozóides e deteriorando a qualidade seminal.

O espermatozóide é um organismo aeróbio, sendo o oxigênio elemento essencial para manutenção de suas funções. Entretanto, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações. Tanto os espermatozóides quanto os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ERO causadores de danos à célula espermática (Valença e Guerra, 2007).

2.4.2. Mecanismos antioxidantes de proteção dos espermatozóides

A partir do momento que os espermatozóides são formados no testículo até a ejaculação e passagem pelo trato reprodutivo da fêmea, estes estão constantemente expostos a ambientes oxidativos (Weir e Robaire, 2007). Durante a maturação os espermatozóides sofrem constantes ataques de ERO produzidas intra e extracelularmente. Para se protegerem dos danos oxidativos, os espermatozóides contêm um sistema enzimático de defesa antioxidante para lidar com o excesso de ERO esquematizado na Figura 13, semelhante ao esquema apresentado na Figura 10.

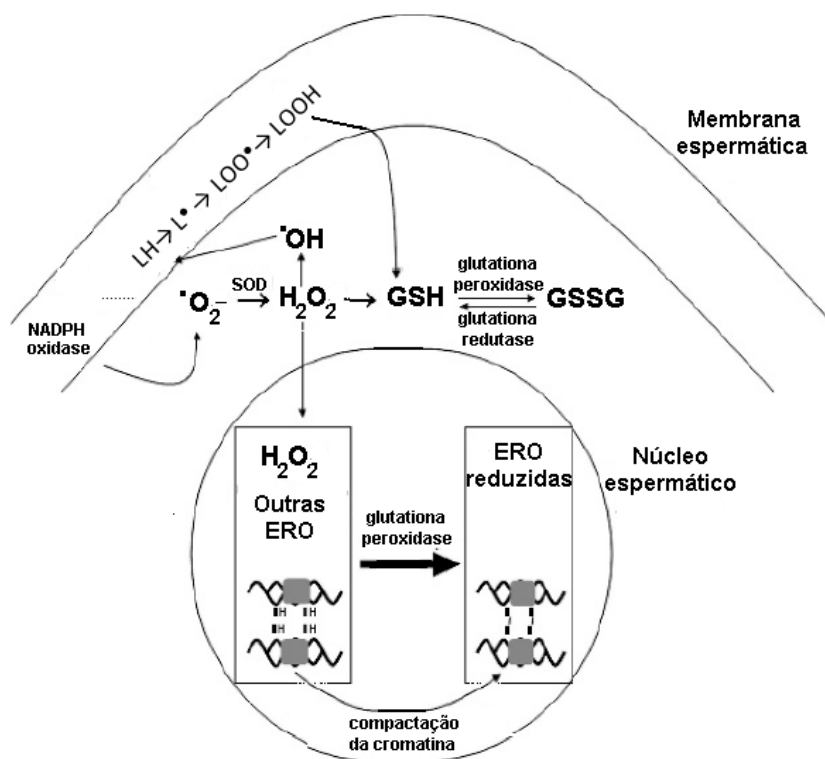


Figura 13. Defesa antioxidante do espermatozóide. O radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) produzido pela atividade da NADPH oxidase na membrana espermática é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela SOD. O H_2O_2 pode iniciar peroxidação pela produção de radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) tanto na membrana espermática como na membrana nuclear espermática, atacando os fosfolípidios (LH) das mesmas. O H_2O_2 e os peróxidos (LOOH) são detoxificados pela glutatona peroxidase. O H_2O_2 e radicais fosfolipídicos estão diretamente envolvidos no processo de compactação da cromatina no núcleo espermático. A glutatona peroxidase ao utilizar os grupos tióis (SH) das protaminas da cromatina espermática na redução das ERO, promove a formação de pontes dissulfídicas (SS) entre as protaminas, garantindo a compactação necessária da cromatina. Portanto, as ERO são fundamentais neste processo, entretanto o excesso de ERO causa dano ao DNA e a deficiente quantidade de ERO ou impedimento da atividade da GSH-Px leva à deficiente compactação da cromatina, deixando o DNA vulnerável ao ataque oxidativo. Adaptada de Weir e Robaire (2007).

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para funções espermáticas in vivo, desde a ejaculação, até a fertilização. Hammadeh et al. (2009) citaram a presença dos antioxidantes no plasma seminal que protegem os espermatozóides das ERO. Dentre estes, destacam-se a presença de SOD, catalase e GSH-Px, selenoproteínas, vitaminas A, C e E, dentre outros. Os antioxidantes atuam juntos como uma rede protetora neutralizando as ERO e regenerando os antioxidantes à estrutura original, como é o caso das vitaminas C e E, demonstrado na Figura 11. A origem destes antioxidantes ainda não é conhecida, sendo testicular para alguns autores e pós-testicular para outros. De qualquer forma, a presença destes antioxidantes no plasma seminal é de fundamental importância para a proteção dos espermatozóides, uma vez que a quantidade de enzimas antioxidantes no citoplasma dos espermatozóides é limitada.

Makker et al. (2009) e Bansal e Bilaspuri (2010) destacaram os antioxidantes dietéticos na redução do estresse oxidativo dos espermatozóides, sendo estes constituídos pelas vitaminas C, E, beta-carotenos, carotenóides e flavonóides.

2.4.3. Efeito da idade sobre a fertilidade

A queda de fertilidade dos galos a partir de 40 semanas de idade já é reconhecida há muitos anos, como relatado por Lake (1989). Hocking (1989) verificaram forte declínio no número

de galos produzindo sêmen após 40 semanas de idade e ressaltaram que a fertilidade reduz a partir desta idade, mas que o efeito da queda na fertilidade é maior após 50 semanas de idade.

Rocha Júnior e Baião (2001), ao avaliarem a capacidade reprodutiva de galos com 35 e 68 semanas de idade pelas análises de qualidade do sêmen, como motilidade, vigor e turbilhonamento, não encontraram diferenças significativas destas entre as idades dos galos. Os autores concluíram que a queda de fertilidade em galos velhos seria causada por outros fatores que não as características físicas seminais.

A membrana espermática é temporariamente protegida da peroxidação pela atividade antioxidante do plasma seminal (Rutz et al., 2005). Entretanto, após a cópula, este efeito é substituído pelo fluido secretado pelo oviduto. Acredita-se que nas glândulas hospedeiras de espermatozóides exista um mecanismo complexo no qual os principais antioxidantes (vitamina C e E, GSH-Px e SOD) são ativados a fim de proteger os espermatozóides durante o tempo em que estes permanecem no oviduto. Entretanto, este mecanismo apresenta menor eficiência em galinhas com idade avançada do que em galinhas jovens, explicando parcialmente o declínio da fertilidade em lotes matrizes pesadas mais velhos.

Weir e Robaire (2007) compararam a atividade enzimática antioxidante dos espermatozóides e a produção de ERO na maturação de espermatozóides de ratos novos e velhos e observaram queda na capacidade antioxidante associada ao aumento na produção de ERO com o envelhecimento dos animais. Os autores concluíram que a queda na qualidade espermática de animais velhos está associada à maior susceptibilidade dos espermatozóides aos danos oxidativos.

Rodrigues et al. (2009) demonstraram que um dos fatores que podem influenciar a fertilidade de galos mais idosos são as alterações na compactação da cromatina espermática. Estes pesquisadores identificaram que o sêmen de galos velhos apresentam mais alterações na cromatina, tanto na homogeneidade como na intensidade de compactação, do que galos jovens. A condensação do material nuclear é um importante evento da diferenciação nuclear durante a espermatogênese. Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozóides que se torna frouxa e influencia a fertilidade. A protamina, presente no núcleo da célula espermática, é conhecida como galline em aves.

2.4.4. Efeito da suplementação de vitaminas antioxidantes na dieta dos galos sobre a fertilidade

Zanini (2001) avaliou o efeito de diferentes fontes de óleo e níveis de vitamina E na dieta de galos sobre a fertilidade. No grupo que recebeu ração com 6% de óleo de soja e três níveis de vitamina E – 30, 200 e 400mg/kg, correu queda de 1,5% de fertilidade a cada aumento de 100mg/kg de suplementação de vitamina E. Os autores atribuíram este efeito à deficiência de vitamina A, provocada pelo excesso de vitamina E na ração, já que a vitamina A possui importante função reprodutiva proporcionando proteção do epitélio germinativo e manutenção da integridade das células intersticiais produtoras de testosterona.

Ao avaliarem a inclusão de 3% de três fontes de óleo (soja, canola, girassol) e dois níveis de vitamina E (200 e 400 mg/kg) e o tratamento controle sem óleo nem suplementação de vitamina, Rodenas et al. (2005) não verificaram influência das dietas dos galos sobre as características seminais como motilidade, volume do sêmen, concentração, número de células totais e morfologia espermática.

Ferreira (2010) adicionou 60ppm de Carophyll Red® (6ppm de cantaxantina) na dieta dos galos com 40 a 59 semanas de idade e verificaram aumento na motilidade, concentração espermática e redução nas alterações morfológicas dos espermatozóides quando comparado aos galos que não receberam o antioxidante na dieta. A pesquisadora atribuiu os efeitos à proteção antioxidante da cantaxantina dos ácidos graxos dos espermatozóides.

3. METODOLOGIA

3.1. Local

O experimento foi realizado na Granja Rio Minas, localizada no município de São José da Lapa – MG, no período de 18 de junho de 2009 a 27 de novembro de 2010.

As avaliações de taxa de eclosão, mortalidade embrionária e fertilidade foram realizadas no incubatório da empresa. As avaliações de cantaxantina, vitamina E, vitamina A, extrato etéreo, proteína bruta e índice de peróxido na gema do ovo foram realizadas no Analytical Research Center e CBO Análises Laboratoriais. As avaliações da composição em ácidos graxos da gema dos ovos foram realizadas no Laboratório de Óleos e Gorduras da Unicamp, em Campinas – SP. As avaliações de peso do ovo e seus componentes e avaliações da gema foram realizadas no laboratório do DTIPOA da UFMG. As avaliações de TBARS no saco vitelino do pinto foram realizadas no ITAL, em Campinas – SP.

3.2. Galpões e aves

Este experimento foi conduzido em dois galpões de um mesmo lote de matrizes Cobb. As aves deste lote estavam alojadas em cinco galpões vizinhos, sendo 8000 fêmeas e 800 machos em cada galpão.

No período de 40 a 45 semanas de idade das matrizes, a fertilidade e a eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados dos cinco galpões foram monitoradas para escolha dos dois galpões que seriam utilizados para compor os tratamentos deste experimento. Para tanto, foi realizada uma incubação semanal de dez bandejas com 96 ovos cada por galpão. As taxas de eclosão e fertilidade foram avaliadas e analisadas estatisticamente pelo teste F. Os resultados deste monitoramento nos dois galpões escolhidos estão apresentados no Quadro 1 do Anexo 1.

Os galpões com resultados de fertilidade e eclosão sobre ovos totais e ovos férteis incubados semelhantes estatisticamente e mais próximos fisicamente foram utilizados neste experimento. Portanto, após a escolha, o galpão 1 com 800 machos e 8000 fêmeas foi alimentado com ração controle sem cantaxantina e as 8000 fêmeas e 800 machos do galpão 2 receberam suplementação de cantaxantina na ração.

3.3. Manejo das matrizes

O arraçoamento das aves com cantaxantina iniciou quando estas estavam com 46 semanas.

O manejo das aves foi o rotineiramente utilizado na granja. As rações experimentais foram oferecidas desde 46 até 60 semanas de idade. A formulação da dieta deste experimento foi a de rotina da Granja Rio Minas para machos e fêmeas (Tab. 1), com exceção da suplementação ou não de cantaxantina, de acordo com os tratamentos.

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

Composição percentual		
Ingredientes	Fêmeas	Machos
Milho moído	62,3	60,0
Farelo de soja 45,5% PB	13,7	9,8
Farinha de carne e osso 46% PB	1,8	2,3
Farelo de trigo	14,2	25,8
Calcário	7,3	1,6
Sal comum	0,4	0,4
Suplemento Vitamínico Mineral	0,4	0,4
Carophyll Red® *	0,006	0,006
TOTAL	100,0	100,0
Níveis Nutricionais		
Energia (kcal/g)	2720	2750
Proteína bruta (%)	14,4	14,5
Cálcio (%)	3,20	1,10
Fósforo total (%)	0,60	0,72
Fósforo disponível (%)	0,35	0,42
Lisina total (%)	0,67	0,64
Met + Cis Total (%)	0,54	0,55
Metionina Total (%)	0,29	0,29
Sódio (%)	0,18	0,18
Cantaxantina (mg/kg) *	6,00	6,00

* Carophyll Red® contém 10% de cantaxantina e foi utilizado na dieta de machos e fêmeas do galpão 1.

Cada kg de Suplemento Vitamínico Mineral contém: Vitamina A – 2.250.000UI; Vitamina D3 – 650.000UI; Vitamina E – 3.500mg; Vitamina K3 – 400mg; Vitamina B1 – 550mg; Vitamina B2 – 1.500mg; Vitamina B6 – 750mg; Vitamina B12 – 2.500mcg; Niacina – 7.500mg; Ácido Pantotênico – 3.750mg; Ácido Fólico – 150mg; Biotina – 25mg; Colina – 84.630mg; Metionina – 99.000mg; Cobre – 24.950mg; Ferro – 12.500mg; Manganês – 17.500mg; Zinco – 12.500mg; Iodo – 300mg; Selênio – 50mg; Bacitracina de Zinco – 18750mg; Fitase – 75ftu; BHT – 25.000mg.

Às 50 semanas de idade das aves, as rações foram coletadas e o teor de cantaxantina foi analisado, contendo respectivamente 6,15 e 6,91mg/kg nas rações de fêmeas e machos suplementadas com cantaxantina e nas rações de fêmeas e machos não suplementadas não foi detectada cantaxantina.

3.4. Ovos

Os ovos utilizados para compor as bandejas de incubação e para análises laboratoriais do experimento I foram coletados dos galpões 1 e 2 quando as aves estavam com 59 semanas de idade, no período de sete e três dias antes da incubação, para compor os dois períodos de armazenamento. Os mesmos permaneceram armazenados em temperatura entre 19 e 20°C e umidade relativa em torno de 75% na sala de ovos do incubatório.

Para compor os tratamentos do Experimento II, foram coletados ovos de cada um dos dois galpões às 50, 51, 55, 59 e 60 semanas de idade das aves.

Todos os ovos foram provenientes das coletas matinais, eliminando-se os da primeira coleta para evitar que os ovos postos no dia anterior influenciassem as respostas. Os ovos incubáveis foram classificados por faixa de peso e apenas os ovos com 64 a 76,5g foram utilizados no experimento. O objetivo de limitar a faixa de peso dos ovos foi para eliminar o efeito do peso do ovo sobre a eclosão, relatado por Rocha et al. (2008).

3.5. Tratamentos

3.5.1. Experimento I

Os tratamentos do Experimento I, definidos pela dieta e períodos de armazenamento, foram:

A3 – Ovos produzidos pelas matrizes alimentadas com cantaxantina e armazenados por três dias,

A7 – Ovos produzidos pelas matrizes alimentadas com cantaxantina e armazenados por sete dias,

B3 – Ovos produzidos pelas matrizes alimentadas com ração controle (sem cantaxantina) e armazenados por três dias,

B7 – Ovos produzidos pelas matrizes alimentadas com ração controle (sem cantaxantina) e armazenados por sete dias.

3.5.2. Experimento II

Os tratamentos do Experimento II, definidos pela dieta e idades das matrizes, foram:

A50 – Ovos produzidos por matrizes, com 50 semanas de idade, alimentadas com cantaxantina

A51 – Ovos produzidos por matrizes, com 51 semanas de idade, alimentadas com cantaxantina

A55 – Ovos produzidos por matrizes, com 55 semanas de idade, alimentadas com cantaxantina

A59 – Ovos produzidos por matrizes, com 59 semanas de idade, alimentadas com cantaxantina

A60 – Ovos produzidos por matrizes, com 60 semanas de idade, alimentadas com cantaxantina

B50 – Ovos produzidos por matrizes, com 50 semanas de idade, alimentadas com ração controle (sem cantaxantina)

B51 – Ovos produzidos por matrizes, com 51 semanas de idade, alimentadas com ração controle (sem cantaxantina)

B55 – Ovos produzidos por matrizes, com 55 semanas de idade, alimentadas com ração controle (sem cantaxantina)

B59 – Ovos produzidos por matrizes, com 59 semanas de idade, alimentadas com ração controle (sem cantaxantina)

B60 – Ovos produzidos por matrizes, com 60 semanas de idade, alimentadas com ração controle (sem cantaxantina)

3.6. Dados obtidos no Experimento I

3.6.1. Qualidade dos ovos

Para as avaliações de qualidade dos ovos foram avaliados 72 ovos no dia da incubação, sendo 18 ovos de cada um dos quatro tratamentos. Cada ovo foi considerado uma repetição.

3.6.1.1. Porcentagem dos componentes dos ovos e altura de albúmen

As pesagens dos ovos foram feitas individualmente, utilizando-se uma balança com precisão de 0,01g. Após as pesagens, os ovos foram quebrados e a altura do albúmen, em mm, foi medida com micrômetro e os valores foram registrados. A gema foi separada manualmente e a

remoção do resíduo de albúmen, aderido à gema, foi feita com o auxílio de 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.

3.6.1.2. Cor e índice da gema

A cor da gema foi determinada através da utilização do leque colorimétrico da DSM, com escore variando de 1 (amarelo claro) a 15 (laranja avermelhado). A altura e largura da gema foram avaliadas através de paquímetro. No momento desta aferição, a gema se encontrava livre do albúmen. As medidas foram registradas para posterior cálculo do índice da gema (IG = altura/largura). Para as avaliações de cor e IG foram utilizadas 18 gemas por tratamento, sendo a gema considerada uma repetição.

3.6.1.3. pH da gema e albúmen

O pH da gema e do albúmen foi aferido através de pHmetro. As amostras de gema e albúmen foram constituídas por um pool de três gemas e três albúmens. Cada pool foi considerado uma repetição, portanto, foram utilizadas seis repetições por tratamento.

3.6.2. Composição da gema dos ovos

Para as avaliações da composição da gema dos ovos foram utilizados 120 ovos no 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°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, exceto para composição em ácidos graxos em que foram quatro repetições por tratamento.

3.6.2.1. Níveis de cantaxantina, vitamina E e vitamina A da gema dos ovos

A análise destas vitaminas foi através da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

O princípio da análise de cantaxantina na gema do ovo baseia-se na diluição da mesma em água, mistura desta emulsão com etanol e extração dos carotenóides com n-hexano. Os carotenóides são analisados injetando-se uma alíquota de n-hexano no CLAE de fase normal usando detecção em comprimento de onda de 466nm. A marcha analítica encontra-se no Anexo 2.

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. A marcha analítica encontra-se no Anexo 3.

3.6.2.2. Níveis de extrato etéreo, proteína bruta e índice de peróxido na gema dos ovos

A determinação do extrato etéreo foi feita por hidrólise ácida, de acordo com Compêndio... (2009). Este método baseia-se na quantificação total de substâncias solúveis em solventes orgânicos, sendo essas substâncias os acilgliceróis, os ácidos graxos livres, o colesterol, a lecitina, a clorofila, os álcoois voláteis, os óleos voláteis e as resinas.

A determinação de proteína bruta da gema dos ovos foi realizada de acordo com AOAC (2005). O princípio da técnica de determinação de proteína bruta baseia-se na quantificação do

nitrogênio, liberado pela pirólise e combustões subseqüentes. O nitrogênio é varrido através de transportador de CO₂ até o nitrômetro. O CO₂ é absorvido pelo hidróxido de potássio e o volume de nitrogênio residual é medido e convertido em proteína bruta.

A determinação do índice de peróxido foi feita pelo método a frio, de acordo com Compêndio... (2009). O método baseia-se na titulação do iodo, uma vez que o peróxido oxida o iodeto a iodo elementar que, por sua vez, forma com o amido um complexo de inclusão de cor característica escura.

3.6.2.3. Composição em ácidos graxos da gema dos ovos

Os ácidos graxos presentes nas amostras de gemas liofilizadas foram separados por cromatografia gasosa (CGC Agilent 68650 SERIES GC SYSTEM) usando coluna capilar (DB-23 AGILENT, cianopropil 50%) de 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de filme. O tempo de execução de cada amostra foi de aproximadamente 60 minutos. Os gases utilizados foram transportador de nitrogênio (gás de fuga), hidrogênio, hélio e ar sintético. As condições operacionais do cromatógrafo foram as seguintes: fluxo de coluna, 1,00ml/min, velocidade linear de 24 cm/seg; temperatura do detector de 280°C, temperatura do injetor de 250°C, temperatura do forno a 110 ° C por 5 min, 110-215°C (5°C/min), 215°C por 24 min; volume de gás injetado trilha de 1,0µl.

Os ácidos graxos quantificados foram C12:0 láurico, C14:0 mirístico, C15:0 pentadecanóico, C16:0 palmítico, C16:1 palmitoléico, C17:0 margárico, C17:1 cis-10-heptadecenóico, C18:0 esteárico, C18:1 oléico, C18:2 trans t-linoléico, C18:2 linoléico, C18:3 trans t-linolênico, C18:3 linolênico, C18:4 octadecatetreenóico, C20:0 araquídico, C20:1 eicosenóico, C20:4 araquidônico, C22:0 behênico, C24:0 lignocérico, C22:5 docosapentaenóico (DPA), C22:6 docosahexaenóico (DHA), e os resultados médios encontram-se no Anexo 4.

Para compor as variáveis e realizar as análises estatísticas, foram somados os ácidos graxos saturados (sem ligação dupla), ácidos graxos monoinsaturados (uma ligação dupla) e ácidos graxos poliinsaturados (mais de uma ligação dupla).

3.6.3. Rendimento de incubação

Para as avaliações de rendimento de incubação (eclosão e mortalidade embrionária) foram utilizadas 14 bandejas com 84 ovos por tratamento, sendo a bandeja considerada uma repetição.

O nascimento dos pintos foi realizado com 512 horas de incubação e os ovos não eclodidos foram quebrados para realização do embriodiagnóstico.

3.6.3.1. Perda de peso dos ovos

A perda de peso dos ovos foi avaliada em dois períodos, durante o armazenamento e a incubação. Para esta avaliação, as bandejas vazias foram pesadas e após receberem os ovos, as bandejas com ovos foram pesadas no dia da coleta, no dia da incubação e no dia da transferênciasendo esta última realizada com 19 dias. O peso médio do ovo foi calculado em todos os períodos de pesagem para expressar a perda de peso, em porcentagem, em relação ao peso do ovo no dia da coleta.

3.6.3.2. Fertilidade

A fertilidade foi avaliada em dois períodos: o primeiro com 11 dias de incubação e o segundo ao final dos 21 dias de incubação. No 11º dia de incubação, todos os ovos passaram por ovoscopia, quando foram retirados os ovos inférteis e aqueles 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

3.6.3.3. Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos incubados

Esta foi calculada tendo como base o número de pintos nascidos de acordo com o número total de ovos incubados.

3.6.3.4. Taxa de eclosão em relação ao número total de ovos férteis

Esta foi calculada tendo como base o número de pintos nascidos de acordo com o número total de ovos férteis (observado na ovoscopia aos 11 dias de incubação).

3.6.3.5. Mortalidade embrionária

A taxa de mortalidade embrionária foi avaliada em dois períodos: o primeiro com 11 dias de incubação e o segundo ao final dos 21 dias de incubação. No 11º 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.

3.6.4. Avaliações dos embriões e pintos

3.6.4.1. Peso absoluto e matéria seca dos embriões com 18 dias de incubação

Para as avaliações de peso absoluto e matéria seca dos embriões aos 18 dias de incubação foram utilizados 20 ovos por tratamento, sendo cada embrião considerado uma repetição. Os ovos foram quebrados e os embriões vivos foram retirados e imediatamente abatidos por deslocamento cervical. Cada embrião foi colocado em uma bandeja de alumínio, previamente pesada em balança de 0,01g, e o peso inicial do embrião foi registrado. Cada embrião foi moído e congelado a -40°C, liofilizado por 72 horas, seguida de secagem em estufa a 105°C por 12 horas, de acordo com o recomendado por van Cleef et al. (2010). Após estes procedimentos, a bandeja contendo o embrião foi novamente pesada e o peso final do embrião foi registrado. A porcentagem de matéria seca do embrião foi obtida dividindo-se o peso final pelo peso inicial e multiplicando-se o valor por 100.

3.6.4.2. Peso do pinto e saco vitelino à eclosão

Foram coletados ao acaso 30 pintos por tratamento à eclosão, portanto, 120 pintos ao todo. Os pintos foram abatidos por deslocamento cervical, pesados individualmente em balança com precisão de 0,01g, e o peso absoluto foi registrado. O saco vitelino de cada pinto foi retirado, pesado individualmente em balança com precisão de 0,01g, e o peso absoluto foi registrado. O peso relativo do saco vitelino foi calculado dividindo-se o peso absoluto do saco vitelino pelo peso absoluto do pinto e multiplicando-se o valor por 100.

3.6.4.3. Estabilidade oxidativa do saco vitelino dos pintos

Foram utilizados os sacos vitelinos de 240 pintos recém-eclodidos, sendo 60 sacos vitelinos de cada um dos quatro tratamentos, para quantificação de malondialdeído pelo método de TBARS proposto por Tarladgis et al. (1960). As amostras para esta análise foram constituídas por um

“pool” de dez sacos vitelinos, as quais foram congeladas a -40°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.

3.7. Delineamento do experimento I

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2×2 , sendo duas dietas e dois períodos de armazenamento. Foram 18 repetições para porcentagem de componentes dos ovos, cor e IG, seis repetições para pH da gema e albúmen, seis repetições (vitaminas A e E, cantaxantina, extrato etéreo, proteína bruta e índice de peróxido) e quatro repetições (composição em ácidos graxos) para composição da gema, 14 repetições para rendimento de incubação e perda de peso dos ovos, 20 repetições para peso e matéria seca do embrião, 30 repetições para peso do pinto e saco vitelino, e seis repetições para estabilidade oxidativa do saco vitelino do pinto.

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas pelo teste de Lilliefors e Cochran. As variáveis “concentração de cantaxantina na gema e valor de TBARS no saco vitelino do pinto” foram transformadas pela equação: variável \times variável. A variável mortalidade embrionária de 15 a 21 dias, incluindo ovos bicados, foi transformada pela equação: $\sqrt{(\text{variável} + 1)}$.

Os dados normais e homogêneos foram submetidos às análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste F, Tukey e SNK (Sampaio, 2002). A variável concentração de cantaxantina na gema foi comparada pelo teste de Dunnett, sendo o tratamento A3 (ovos provenientes de matrizes alimentadas com cantaxantina e armazenados por três dias) considerado o grupo controle. Este teste foi escolhido porque não foi possível detectar cantaxantina na gema dos ovos do tratamento B7 (ovos provenientes de matrizes alimentadas com ração controle, sem cantaxantina, e armazenados por sete dias). As medianas das respostas não normais e homogêneas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o programa SAEG versão 9.1 (Sistema..., 2005).

3.8. Dados obtidos no experimento II

3.8.1. Fertilidade

Para as avaliações de fertilidade foram utilizadas 10 bandejas com 84 ovos por tratamento, sendo a bandeja considerada uma repetição. A fertilidade foi avaliada em dois períodos: o primeiro com 11 dias de incubação e o segundo ao final dos 21 dias de incubação.

No 11º dia de incubação, todos os ovos passaram por ovoscopia, quando foram retirados os ovos inférteis e aqueles 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.

3.9. Delineamento do experimento II

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em parcelas subdivididas, sendo as parcelas compostas pelas dietas (com e sem cantaxantina) e as subparcelas constituídas pelas idades. Foram utilizadas dez repetições por tratamento, sendo a bandeja com 84 ovos considerada a repetição.

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas pelo teste de Lilliefors e Cochran. As médias das parcelas foram comparadas pelo teste F e o modelo de regressão linear foi ajustado às médias das subparcelas (Sampaio, 2002) utilizando o programa SAEG versão 9.1 (Sistema..., 2005).

3.10. 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I

4.1.1. Qualidade dos ovos

Os resultados referentes à qualidade dos ovos estão apresentados nas tabelas 2 a 9.

Tabela 2. Porcentagem de gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	29,9	30,4	30,1
0	29,2	30,8	30,0
Média	29,5b	30,6a	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,05$). CV=6,1%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável porcentagem de gema. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes não influenciou ($p > 0,05$) a porcentagem de gema. Independente da dieta das matrizes, o período de armazenamento por sete dias resultou em maior ($p \leq 0,05$) porcentagem de gema do que o de três dias.

Tabela 3. Porcentagem de albúmen de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	61,5	60,4	61,0
0	61,8	60,2	61,0
Média	61,6a	60,3b	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=3,2%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável porcentagem de albúmen. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes não influenciou ($p > 0,05$) a porcentagem de albúmen. Independente da dieta das matrizes, o período de armazenamento por sete dias resultou em menor ($p \leq 0,01$) porcentagem de albúmen do que período de três dias de armazenamento.

Estes resultados estão de acordo com Lapão et al. (1999) e Ferreira (2006). Durante o armazenamento, ocorre movimentação de água do albúmen para a gema em função da diferença de pressão osmótica, desta forma, a porcentagem de gema aumenta e a de albúmen reduz.

Tabela 4. Porcentagem de casca de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	
	3	7
6	8,6bA	9,2aA
0	9,0aA	9,0aA

Letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). CV=7,3%

Houve interação entre os tratamentos para a variável porcentagem de casca. Ovos produzidos pelas matrizes alimentadas com dieta contendo cantaxantina e armazenados por três dias apresentaram menor ($p \leq 0,05$) porcentagem de casca do que ovos provenientes das mesmas matrizes e armazenados por sete dias. Na dieta controle, sem adição de cantaxantina, não foi observada esta diferença em relação aos períodos de armazenamento. Estes resultados são inconsistentes e não podem ter sido causados pelos tratamentos.

Tabela 5. Índice de gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	0,383	0,378	0,380
0	0,381	0,368	0,375
Média	0,382	0,372	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=6,9%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável índice de gema. A dieta e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Este resultado discorda dos apresentados por Kirunda e McKee (2000). Isto pode ter ocorrido em função das medidas de altura e largura da gema terem sido realizadas na gema livre de albúmen. De acordo com Reijrink et al. (2008), a resistência da membrana vitelina depende da viscosidade da camada chalazífera que circunda a gema. Desta forma, a ausência do albúmen, incluindo a camada chalazífera, pode ter influenciado a resistência da membrana vitelina em todos os tratamentos, tornando os índices de gemas semelhantes.

Tabela 6. Altura (mm) de albúmen de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	7,60	6,33	6,97
0	7,42	6,31	6,87
Média	7,51a	6,32b	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p\leq 0,00001$). CV=14,4%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável altura de albúmen. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes não influenciou ($p>0,05$) a altura de albúmen. Independente da dieta, o período de armazenamento por sete dias reduziu ($p\leq 0,00001$) a altura de albúmen quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Estes resultados estão de acordo com Lapão et al. (1999), Ferreira (2006) e Xavier et al. (2008). Durante o armazenamento, ocorre aumento do pH do albúmen, desnaturando as proteínas do mesmo e tornando-o mais liquefeito. Estas mudanças acarretam a redução da altura de albúmen.

Tabela 7. Escore de cor da gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Mediana
	3	7	
6	14,0	13,0	14,0 A
0	8,0	6,0	7,0 B
Mediana	11,0	10,0	

Letras distintas, maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste Kruskal-Wallis ($p\leq 0,01$).

Não houve interação entre os tratamentos para a variável escore da cor da gema. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes resultou em maior ($p\leq 0,01$) escore de coloração da gema quando comparado aos ovos provenientes de matrizes que não receberam cantaxantina na dieta. Independente da dieta, o período de armazenamento não influenciou ($p>0,05$) o escore de cor da gema.

Estes resultados estão de acordo com Garcia et al. (2002). A pigmentação resulta da deposição de xantofilas (grupo de pigmentos carotenóides) na gema do ovo. O produto comercial utilizado neste experimento possui 10% de cantaxantina, pigmento vermelho, que acentua a coloração da gema. Ao ser consumida, a cantaxantina é empacotada nos portomícrons. Estes são liberados do enterócito, através da veia porta, e seguem para o fígado. Parte destes portomícrons sofre metabolismo

hepático para formar a VLDLg. Desta forma, a cantaxantina segue no núcleo da VLDLg até o oócito em formação, pigmentando a gema.

Tabela 8. pH da gema de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	6,26	6,23	6,25
0	6,28	6,29	6,28
Média	6,27	6,26	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=1,0%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável pH da gema. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Estes resultados estão de acordo Bakst e Holm (2003) que afirmaram que durante o armazenamento, a gema mantém-se levemente ácida, com pH em torno de 6,5, o que foi observado neste experimento.

Tabela 9. pH do albúmen de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	9,22	9,42	9,32
0	9,20	9,46	9,33
Média	9,21b	9,44a	

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p\leq 0,00001$). CV=0,5%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável pH do albúmen. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes não influenciou ($p>0,05$) o pH do albúmen. Independente da dieta, o período de armazenamento por sete dias aumentou ($p\leq 0,00001$) o pH do albúmen quando comparado ao ovos armazenados por três dias.

Estes resultados estão de acordo com Lapão et al. (1999), Bakst e Holm (2003), Ferreira (2006) e Xavier et al. (2008). O ácido carbônico (H_2CO_3) é um dos componentes do sistema tampão do albúmen. Durante o armazenamento, este ácido dissocia-se em água e gás carbônico. Este último é liberado ao ambiente, através dos poros da casca do ovo, elevando o pH do albúmen.

4.1.2. Composição das gemas dos ovos

Os resultados referentes à composição das gemas dos ovos férteis frescos estão apresentados nas tabelas 10 a 18.

Tabela 10. Concentração de cantaxantina (ppm) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	
	3	7
6	35,2Aa	30,9b
0	1,1B	inferior ao limite de detecção

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste de Dunnet ($p\leq 0,00001$). CV=20,9%

O teor de cantaxantina não pôde ser detectado nas amostras de gemas dos ovos provenientes das matrizes alimentadas sem suplementação de cantaxantina e armazenados por sete dias. Desta forma, as comparações estatísticas foram feitas em relação aos ovos produzidos pelas galinhas alimentadas com cantaxantina e armazenados por três dias.

Ao suplementar a dieta das aves com cantaxantina, ocorreu aumento dos níveis desta na gema do ovo tanto nos ovos armazenados por três dias quanto nos armazenados por sete dias. Isso já era esperado, já que a cantaxantina é lipossolúvel e depositada na gema juntamente com os lipídios pela VLDLg, através do mecanismo explicado na Tabela 7.

Independente da dieta, nos ovos originados das aves alimentadas com cantaxantina, o teor de cantaxantina reduziu ($p \leq 0,00001$) em torno de 12% quando os ovos foram armazenados por sete dias comparado aos armazenados por três dias. Nas aves alimentadas com dieta controle, o teor de cantaxantina dos ovos armazenados por três dias foi de 1,1ppm e nos ovos armazenados por sete dias, este ficou abaixo do limite de detecção pela análise. Apesar da impossibilidade de realizar análise estatística para comparar os últimos, nota-se pelos resultados redução na quantidade de cantaxantina com o armazenamento destes ovos.

Estes resultados podem ser devidos à oxidação da cantaxantina durante o armazenamento dos ovos por sete dias. Assim como os lipídios da gema dos ovos oxidam durante o armazenamento, demonstrado por Franchini et al. (2002), Cherian et al. (2007) e Giampietro et al. (2008) em pesquisa com ovos de poedeiras comerciais, as vitaminas e pigmentos também podem ser oxidados. O produto comercial utilizado neste experimento é composto de cantaxantina, em concentração mínima de 10%, e aproximadamente 2,2% de etoxiquim. A função do etoxiquim é estabilizar o produto, já que os carotenóides são muito sensíveis à oxidação. Ao ser consumido pelas aves, a cantaxantina foi depositada na gema do ovo, mas o etoxiquim não, já que Machlin et al. (1962) afirmou que mais de 99% do etoxiquim da dieta é excretado dentro de 24 horas e somente quantidade mínimas desta substância são depositadas na gema do ovo. Sem a proteção antioxidante do etoxiquim, a cantaxantina da gema oxidou durante o armazenamento.

Tabela 11. Concentração de vitamina A (UI/kg) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	29020	29150	29090A
0	27740	27133	27409B
Média	28380	28142	

Letras distintas, maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=4,9%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável concentração de vitamina A na gema. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes elevou ($p \leq 0,01$) os níveis de vitamina A na gema quando comparado aos ovos provenientes de matrizes que receberam dieta sem cantaxantina. Independente da dieta, o período de armazenamento não influenciou ($p > 0,05$) os níveis de vitamina A da gema.

Estes resultados estão, em parte, de acordo com Beardsworth e Hernández (2003) e estão em desacordo com Surai et al. (2001 e 2003). De acordo com o observado na Tab. 11, verifica-se que a cantaxantina é precursora de vitamina A, uma vez que as dietas ofertadas às matrizes foram isonutritivas, exceto pela adição de cantaxantina. Entretanto, de acordo com Beardsworth e Hernández (2003), a contribuição da cantaxantina como vitamina A só ocorre se o nível desta última for limitado na dieta. O premix utilizado nas rações experimentais forneceu o mínimo de 10.000UI de vitamina A/kg de ração. Este valor está de acordo com Rostagno et al. (2005), que recomendaram 9.000UI de vitamina A/kg de ração para aves reprodutoras. Desta forma, pode-se verificar que as aves deste experimento não receberam ração deficiente em vitamina A e que a conversão de parte da cantaxantina em vitamina A ocorre normalmente.

Tabela 12. Concentração de vitamina E (ppm) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	94,0	91,9	92,9B
0	98,9	102,6	100,8A
Média	96,4	97,3	

Letras distintas, maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=6,8%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável concentração de vitamina E na gema. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes reduziu ($p \leq 0,01$) os níveis de vitamina E na gema quando comparado aos ovos provenientes de matrizes que receberam dieta sem cantaxantina. Independente da dieta, o período de armazenamento não influenciou ($p > 0,05$) os níveis de vitamina E da gema.

Estes resultados estão em desacordo dos encontrados por Surai et al. (2003), que observaram maior deposição de vitamina E na gema do ovo com o aumento da inclusão de cantaxantina na dieta das matrizes. Entretanto, no experimento destes pesquisadores, a conversão de parte da cantaxantina em vitamina A não ocorreu como no presente experimento, causando redução da absorção de vitamina E no intestino, conforme relatado por Goodman et al. (1966), Combs (1976), Bieri e Tolliver (1982), Surai et al. (1998 e 2001) e Grobas et al. (2002).

Tabela 13. Correlação de Pearson (r) entre as vitaminas na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

	Vitamina A	Vitamina E
Cantaxantina	0,43	
Vitamina A		- 0,47

Correlações significativas a $p \leq 0,05$

Pela Tabela 13 nota-se que existe correlação fraca e positiva entre as concentrações de cantaxantina e vitamina A e negativa entre as concentrações de vitaminas A e E na gema do ovo fresco. Estes resultados confirmaram a atividade pró-vitamina A da cantaxantina e a competição entre as vitaminas A e E pela absorção intestinal.

Tabela 14. Concentração de extrato etéreo (%) na gema do ovo liofilizada

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	58,6	57,6	58,1
0	59,7	57,1	58,4
Média	59,2a	57,3b	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=2,4%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável concentração de extrato etéreo na gema. Independente do armazenamento, a dieta das matrizes não influenciou ($p > 0,05$) o extrato etéreo da gema. Independente da dieta, o período de armazenamento por sete dias reduziu ($p \leq 0,01$) a concentração de extrato etéreo da gema quando comparado ao período mais curto de apenas três dias.

Estes resultados podem ser explicados pela oxidação dos lipídios durante o armazenamento dos ovos por sete dias, demonstrado por outros pesquisadores em ovos comerciais (Franchini et al., 2002; Cherian et al., 2007 e Giampietro et al., 2008). A temperatura de armazenamento dos ovos férteis é em torno de 20°C, o que facilita a ocorrência da peroxidação. Os lipídios são substratos da oxidação, portanto, desaparecem nestas reações, reduzindo a quantidade de extrato etéreo da gema do ovo. Além disso, a redução dos níveis de cantaxantina com o maior

armazenamento (Tabela 10) também podem ter contribuído para a diminuição do extrato etéreo, uma vez que vitaminas lipossolúveis também são constituintes deste.

Tabela 15. Concentração de proteína bruta (%) na gema do ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	30,9	30,8	30,9
0	30,9	30,7	30,8
Média	30,9	30,8	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=1,8%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável proteína bruta da gema. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Apesar das proteínas também serem substratos susceptíveis à oxidação, o processo é bem mais lento e contido quando comparado à oxidação lipídica. Neste experimento, as condições de armazenamento dos ovos, como período, temperatura e umidade, não promoveram a oxidação protéica.

Os resultados de índice de peróxido na gema do ovo fresco foram iguais a zero em todas as amostras, portanto, não foi possível realizar análise estatística. Segundo Fellenberg e Speisky (2006), o peróxido é um produto primário da oxidação muito instável e como a variação deste ocorre de forma gaussiana, baixos níveis podem indicar tanto estabilidade oxidativa da amostra quanto ser indicativo de alteração pronunciada.

Tabela 16. Composição em ácido graxos saturados (% m/m) da gema de ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	33,98	34,30	34,14
0	33,73	34,54	34,13
Média	33,86b	34,42a	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p\leq 0,05$). CV=1,1%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável composição em ácidos graxos saturados. Independente do período de armazenamento, a dieta não influenciou ($p>0,05$) a quantidade de ácidos graxos saturados da gema. Independente da dieta, o período de armazenamento por sete dias aumentou ($p\leq 0,05$) a quantidade de ácidos graxos saturados da gema quando comparado ao período de apenas três dias.

Tabela 17. Composição em ácido graxos monoinsaturados (% m/m) da gema de ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	46,18	45,50	45,84
0	45,80	44,93	45,36
Média	45,99a	45,21b	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p\leq 0,05$). CV=1,6%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável composição em ácidos graxos monoinsaturados. Independente do período de armazenamento, a dieta não influenciou ($p>0,05$) a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados da gema. Independente da dieta, o período de armazenamento por sete dias reduziu ($p\leq 0,05$) a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados da gema quando comparado ao período de apenas três dias.

Era esperado que a dieta não influenciasse a quantidade de ácidos graxos saturados (Tabela 16) e monoinsaturados (Tabela 17), já que a única diferença entre estas foi a adição de cantaxantina. O período de armazenamento por sete dias provocou a oxidação dos ácidos graxos monoinsaturados, que são mais instáveis do que os saturados em função da presença de uma ligação dupla. A oxidação, durante o armazenamento, foi mais pronunciada sobre o ácido oléico que reduziu de 42,26% nos ovos armazenados por três dias para 41,24% nos armazenados por sete dias ($p \leq 0,05$). A oxidação dos ácidos graxos monoinsaturados promoveu a redução destes ácidos graxos na amostra, reduzindo os ácidos graxos totais. Por serem mais estáveis, os ácidos graxos saturados não foram alterados na amostra. Entretanto, como a porcentagem dos ácidos graxos saturados é determinada pela divisão destes pelo total de ácidos graxos da amostra (saturados/ácidos graxos totais), a redução dos ácidos graxos totais determinou o aumento relativo dos ácidos graxos saturados. Desta forma, a oxidação dos monoinsaturados promoveu redução destes (Tabela 17) e aumento relativo dos saturados (Tabela 16) na gema.

Tabela 18. Composição em ácido graxos poliinsaturados (% m/m) da gema de ovo liofilizada de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	17,05	17,57	17,31
0	17,57	17,71	17,64
Média	17,31	17,64	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p > 0,05$). CV=3,8%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável composição em ácidos graxos poliinsaturados. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p > 0,05$) esta resposta.

Era esperado que o período de armazenamento por sete dias reduzisse os ácidos graxos PUFA, já que quanto maior a insaturação do ácido graxo, maior a susceptibilidade deste à peroxidação (Hogg e Kalyanaraman, 1999). Entretanto foi observada peroxidação apenas dos ácidos graxos monoinsaturados (Tabela 17). Isto pode ter ocorrido em função da maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados presentes na gema, em quantidade quase três vezes superior aos PUFA. Desta forma, a maior presença de substratos “ácidos graxos monoinsaturados” ocasionou ação mais significativa dos radicais livres sobre estes, visto que o ácido oléico é o ácido graxo presente em maior quantidade na gema do ovo (Davis e Reeves, 2000).

4.1.3. Rendimento de incubação

Os resultados referentes ao rendimento de incubação estão demonstrados nas tabelas 19 a 27.

Tabela 19. Perda de peso (%) dos ovos durante o armazenamento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Mediana
	3	7	
6	0,7	1,4	1,1
0	0,7	1,4	1,1
Mediana	0,7b	1,4a	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,01$).

Não houve interação entre os tratamentos para a variável perda de peso no armazenamento. Independente do período de armazenamento, a dieta das matrizes não influenciou ($p > 0,05$) a perda de peso no armazenamento. Independente da dieta, o período de armazenamento por sete dias aumentou ($p \leq 0,01$) a perda de peso dos ovos quando comparado ao período mais curto de apenas três dias.

Estes resultados estão de acordo com Ferreira (2006). No presente experimento, foram utilizados ovos de matrizes velhas (59 semanas), portanto, a perda de peso destes é facilitada pela menor espessura da casca dos ovos. Ainda, o maior período de armazenamento resultou em aumento do pH do albúmen, tornando-o mais liquefeito. Estas características da casca e do albúmen dos ovos, associada ao próprio aumento no período de armazenamento de três para sete dias, acarreta maior saída de água destes para o meio externo, resultando em maior perda de peso no armazenamento.

Tabela 20. Perda de peso (%) dos ovos durante a incubação de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	12,0	11,8	11,9
0	12,0	12,1	12,1
Média	12,0	12,0	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=3,7%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável perda de peso dos ovos durante a incubação. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Estes resultados discordam de Walsh et al. (1995) que verificaram que o maior período de estocagem aumentou a perda de peso dos ovos no armazenamento, resultando em menor quantidade de água para ser perdida durante a incubação. Entretanto estes autores trabalharam com períodos de armazenamento mais longos do que os deste experimento.

Tabela 21. Fertilidade (%) de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	91,2	90,1	90,6A
0	88,9	87,7	88,3B
Média	90,1	88,9	

Letras distintas, maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste F ($p\leq 0,01$). CV=3,5%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável fertilidade. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das fêmeas e machos aumentou ($p\leq 0,01$) a fertilidade em 2,3 pontos percentuais quando comparado ao tratamento que não recebeu cantaxantina. Independente da dieta, o período de armazenamento não influenciou ($p>0,05$) a fertilidade.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Souza et al. (2008), Scher et al. (2009) e Rosa et al. (2010). O efeito da cantaxantina sobre a fertilidade pode ser devido ao efeito antioxidante deste carotenóide tanto na galinha quanto no galo. A melhora da fertilidade, relacionada ao galo, pode ser devida a dois fatores: proteção antioxidante dos espermatozóides e aumento da quantidade de vitamina A. A proteção dos espermatozóides contra a oxidação pode ter levado à melhora na motilidade, aumento do número de células espermáticas e redução nas alterações morfológicas, conforme observado por Ferreira (2010). Rutz et al. (2007) destacaram a importância da motilidade para os espermatozóides alcançarem a glândula hospedeira no oviduto da galinha. Ainda Makker et al. (2009) e Bansal e Bilaspuri (2010) afirmaram que os carotenóides dietéticos reduzem o estresse oxidativo dos espermatozóides. A vitamina A é essencial para reprodução nos machos, pois mantém a espermatogênese, através da proteção do epitélio germinativo e manutenção da integridade das células intersticiais produtoras de testosterona (Zanini et al., 2001; Champe et al., 2006). A atividade pró-vitamina A da cantaxantina observada pelo aumento de vitamina A na gema do ovo (Tabela 11) pode ter ocorrido no intestino do galo, aumentando as concentrações desta vitamina no organismo dos machos. O aumento da fertilidade devido às galinhas pode ter sido na melhoria do mecanismo antioxidante das glândulas hospedeiras de espermatozóides proposto por Rutz et al.

(2005), reciclando a vitamina E, em papel semelhante ao desempenhado pela vitamina C, conforme demonstrado por Böhm et al. (1997).

Tabela 22. Eclosão (%) sobre ovos totais incubados de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	84,3	81,0	82,6A
0	80,0	77,0	78,5B
Média	82,1a	79,0b	

Letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=4,6%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável eclosão sobre ovos totais incubados. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes aumentou ($p \leq 0,01$) a eclosão total em 5,0% quando comparado ao tratamento que não recebeu cantaxantina. Independente da dieta, o período de armazenamento de sete dias reduziu ($p \leq 0,01$) a eclosão total em 3,8% quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Tabela 23. Eclosão (%) sobre ovos férteis incubados de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	92,4	89,9	91,1A
0	90,0	87,9	88,9B
Média	91,2a	88,9b	

Letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=3,2%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável eclosão sobre ovos férteis incubados. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes aumentou ($p \leq 0,01$) a eclosão dos ovos férteis em 2,4% quando comparado ao tratamento que não recebeu cantaxantina. Independente da dieta, o período de armazenamento de sete dias reduziu ($p \leq 0,01$) a eclosão dos ovos férteis em 2,5% quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Os resultados referentes às taxas de eclosão, sobre ovos totais e ovos férteis incubados, em função da dieta em estão de acordo com os encontrados por Souza et al. (2008), Scher et al. (2009) e Rosa et al. (2010). Os resultados referentes às taxas de eclosão, sobre ovos totais e férteis incubados, em função do período de armazenamento estão de acordo com os encontrados por Meijerhof et al. (1994), Lapão et al. (1999), Heier e Jarp (2001), Elibol et al. (2002), Ferreira (2006), Elibol e Brake (2008), Yassin et al. (2008), Schmidt et al. (2009) e Tanure et al. (2009). O aumento das taxas de eclosão nos ovos das aves que receberam cantaxantina dietética e nos ovos armazenados por menor período foi devido à redução na mortalidade observada a partir de 15 dias de incubação, discutida adiante na Tabela 26.

A adição de cantaxantina à dieta das matrizes pode ter resultado em dois efeitos positivos para o embrião: maior concentração de cantaxantina na gema e menor quantidade de produtos oxidados transferidos à gema do ovo. A maior concentração de cantaxantina na gema (Tabela 10) resultou em maiores quantidades de vitaminas antioxidantes capazes de proteger os tecidos embrionários da oxidação durante a incubação. Além disso, a cantaxantina pode ter exercido efeito antioxidante in vivo na galinha, semelhante ao observado por Botsoglou et al. (2005). Vale ressaltar que a fonte de fósforo das dietas deste experimento foi farinha de carne e ossos, que é um produto bastante susceptível à peroxidação. Desta forma, a cantaxantina pode ter exercido efeito antioxidante sobre os lipídios da ração, diminuindo a transferência de produtos da oxidação (peróxidos, hidroperóxidos, malondialdeído entre outros compostos) para a gema em formação, que seriam tóxicos para o embrião.

O prejuízo à eclosão causado pelo aumento do período de armazenamento é conhecido e amplamente discutido na literatura. Entretanto, os trabalhos publicados até o momento atribuem esta queda na eclosão à deterioração na qualidade do albúmen, redução na viabilidade embrionária em função de necrose celular, apoptose não programada, alterações morfológicas do blastodermo, anormalidades embrionárias e diminuição no metabolismo celular. Estes fatores realmente ocorrem no período de armazenamento prolongado e são importantes causas de aumento da mortalidade embrionária e redução da eclodibilidade. Entretanto, neste trabalho outras três causas foram observadas e podem ter contribuído para reduzir a eclosão, sendo estas, a diminuição dos níveis de cantaxantina, extrato etéreo e ácidos graxos monoinsaturados na gema dos ovos armazenados por sete dias comparados aos ovos armazenados por três dias, apresentada nas Tabelas 10, 14 e 17, respectivamente. Segundo Cherian e Sim (1997), os lipídios da gema são importantes para a nutrição do embrião em desenvolvimento. Latour et al. (2000) afirmaram que os embriões obtêm mais de 90% da sua necessidade energética da oxidação dos ácidos graxos derivados dos lipídios da gema. Neste experimento, os ovos armazenados por sete dias apresentaram menor quantidade de extrato etéreo na gema em função da oxidação dos lipídios. Desta forma, a mortalidade embrionária pode ter sido em função da redução de energia disponível para os embriões destes ovos quando comparado aos armazenados por três dias. Além disso, a menor concentração de cantaxantina na gema, em função da oxidação desta devido ao armazenamento dos ovos por sete dias, resultou em menores quantidades de vitaminas antioxidantes capazes de proteger os tecidos embrionários da oxidação durante a incubação, quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Tabela 24. Mortalidade embrionária de zero a sete dias (%), calculada sobre ovos férteis incubados de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	3,5	5,5	4,5
0	4,7	4,5	4,6
Média	4,1	5,0	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=49,1%

Não houve interação entre os tratamentos para a variável mortalidade embrionária de zero a sete dias. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Estes resultados não estão de acordo com Ferreira (2006), Fassenko (2007), Elibol e Brake (2008). A literatura demonstra que o período prolongado de armazenamento aumenta as mortalidades inicial e final, entretanto, estes autores avaliaram períodos de estocagem dos ovos superiores à sete dias.

Tabela 25. Mortalidade embrionária de oito a 14 dias (%), calculada sobre ovos férteis incubados de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Mediana
	3	7	
6	0	0	0
0	1,3	0	0
Mediana	0	0	

Medianas não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

Não houve interação entre os tratamentos para a variável mortalidade embrionária de oito a 14 dias. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

A mortalidade embrionária de oito a 14 dias é geralmente baixa como observada neste experimento. A contaminação dos ovos é a principal causa de aumento na mortalidade nesta fase (Boleli, 2003). Apesar de, neste experimento, terem sido utilizados ovos de galinhas velhas, que são mais susceptíveis a contaminação devido à pior qualidade de casca, não foi observada contaminação

dos ovos, conforme observado na Tabela 27, justificando a baixa mortalidade intermediária em todos os tratamentos.

Tabela 26. Mortalidade embrionária de 15 a 21 dias, incluindo ovos bicados (%), calculada sobre ovos férteis incubados, de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	3,2	3,6	3,4A
0	3,9	6,1	5,0B
Média	3,6a	4,8b	

Letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=23,1%.

Não houve interação entre os tratamentos para a variável mortalidade embrionária de quinze a 21 dias, incluindo ovos bicados. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes reduziu ($p \leq 0,01$) a mortalidade a partir de 15 dias de incubação em 32 % quando comparado ao tratamento que não recebeu cantaxantina. Independente da dieta, o período de armazenamento de sete dias aumentou ($p \leq 0,01$) a mortalidade a partir de 15 dias em 25% quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

O efeito negativo do maior período de armazenamento sobre a mortalidade embrionária a partir de 15 dias está de acordo com Ferreira (2006), Fassenko (2007), Elibol e Brake (2008).

A mortalidade embrionária foi considerada a partir de 15 dias de incubação, pois neste período da incubação inicia o aumento do metabolismo embrionário (Rocha et al., 2008). Este aumento do metabolismo significa maior consumo de oxigênio (Wilson et al., 1992) e maior oxidação de lipídios da gema para atender aos requisitos energéticos do embrião (Latour et al., 2000). Estes fatores associados à alta concentração de PUFA dos tecidos embrionários (Surai et al., 1997), tornam o embrião mais susceptível à peroxidação. Desta forma, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes aumentou a quantidade de antioxidantes na gema capazes de proteger os tecidos embrionários, resultando em menor mortalidade neste período, quando comparado aos embriões das matrizes que não receberam cantaxantina na dieta.

O armazenamento dos ovos por sete dias reduziu a quantidade cantaxantina e extrato etéreo na gema do ovo fresco em função da oxidação dos lipídios e vitaminas lipossolúveis. Desta forma, a maior mortalidade embrionária após 15 dias observada nestes ovos pode ter ocorrido em função de aporte insuficiente de energia para os embriões e menores quantidades de vitaminas antioxidantes capazes de proteger os tecidos embrionários da oxidação durante o aumento do metabolismo, quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Tabela 27. Mortalidade embrionária em função de contaminação e desidratação dos ovos (%), calculada sobre ovos férteis incubados, de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Mediana
	3	7	
6	0	0	0
0	0	0	0
Mediana	0	0	

Medianas não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Não houve interação entre os tratamentos para a variável mortalidade embrionária em função de contaminação e desidratação dos ovos. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p > 0,05$) esta resposta.

Apesar de, neste experimento, terem sido utilizados ovos de galinhas velhas, que são mais susceptíveis a contaminação e desidratação devido à pior qualidade de casca, não foi observada mortalidade por estas causas. A ausência de contaminação e desidratação dos ovos foi devida à criteriosa classificação dos ovos incubáveis. No incubatório em que foi realizado o trabalho, máquinas classificadoras de peso foram utilizadas para compor as bandejas de incubação. Ovos de aves velhas são muito susceptíveis a trincas e quebram facilmente quando classificados automaticamente. Assim, após a composição das bandejas de incubação, os ovos foram cuidadosamente inspecionados e os que apresentavam trincas aparentes foram substituídos por ovos com casca íntegra.

4.1.4. Avaliações relativas aos embriões e pintos

As avaliações relativas aos embriões e pintos encontram-se nas tabelas 28 a 33.

Tabela 28. Peso (g) do embrião aos 18 dias de incubação de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	32,8	31,1	32,0
0	32,6	31,7	32,1
Média	32,7a	31,4b	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=5,8%.

Não houve interação entre os tratamentos para a variável peso do embrião aos 18 dias de incubação. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes não influenciou ($p > 0,05$) o peso do embrião. Independente da dieta, o período de armazenamento de sete dias reduziu ($p \leq 0,01$) o peso do embrião aos 18 dias quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Tabela 29. Matéria seca (%) do embrião aos 18 dias de incubação de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	17,7	17,1	17,4
0	17,6	16,8	17,2
Média	17,7a	17,0b	

Letras distintas, minúsculas na linha, são diferentes pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV=6,3%.

Não houve interação entre os tratamentos para os resultados de matéria seca do embrião aos 18 dias de incubação. Independente do armazenamento, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes não influenciou ($p > 0,05$) a matéria seca do embrião. Independente da dieta, o período de armazenamento de sete dias reduziu ($p \leq 0,01$) a matéria seca do embrião aos 18 dias quando comparado aos ovos armazenados por três dias.

Os resultados de peso e matéria seca do embrião aos 18 dias estão de acordo com Mather e Laughlin (1976 e 1977), Walsh et al. (1995), Christensen et al. (2002), Schmidt et al. (2002), Tona et al. (2003) e Fassenko (2007). Segundo estes pesquisadores, o armazenamento aumenta excessivamente o pH, interferindo na ativação do desenvolvimento embrionário precoce realizada por enzimas pH-dependentes. Além disso, embriões provenientes de ovos armazenados por mais tempo apresentam aumento tardio na produção de corticosterona, necessária para estimular a conversão de T4 em T3, sendo o aporte adequado deste último hormônio essencial para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo do embrião. Desta forma, o período prolongado de armazenamento dos ovos atrasa o desenvolvimento embrionário e reduz a taxa metabólica do embrião, resultando em embriões mais leves e menor deposição de tecidos corporais aos 18 dias de incubação.

Tabela 30. Peso (g) do pinto ao nascimento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	48,6	48,0	48,3
0	49,2	48,3	48,8
Média	48,9	48,2	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=5,9%.

Não houve interação entre os tratamentos para a variável peso do pinto ao nascimento. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Ao nascimento, não foi possível verificar retardo no desenvolvimento embrionário ou redução do metabolismo em função do período de armazenamento, como observado no embrião aos 18 dias (Tab. 28 e 29). Isso pode ter ocorrido porque o nascimento dos pintos foi realizado com 512 horas, portanto, neste momento os pintos já tinham eclodido, pois estavam completamente formados. No caso dos embriões, os mesmos foram retirados dos ovos aos 18 dias no mesmo momento em todos os tratamentos, desta forma foi possível observar as diferenças no desenvolvimento embrionário.

Tabela 31. Peso absoluto (g) do saco vitelino ao nascimento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	7,2	6,7	7,0
0	7,0	6,7	6,9
Média	7,1	6,7	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=22,1%.

Não houve interação entre os tratamentos para a variável peso absoluto do saco vitelino do pinto ao nascimento. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Tabela 32. Peso relativo (%) do saco vitelino do pinto ao nascimento de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)		Média
	3	7	
6	14,8	14,0	14,4
0	14,2	13,9	14,1
Média	14,5	14,0	

Médias não seguidas de letras distintas são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$). CV=20,3%.

Não houve interação entre os tratamentos para a variável peso relativo do saco vitelino. As dietas e os períodos de armazenamento não influenciaram ($p>0,05$) esta resposta.

Segundo Rocha et al. (2008), os pesos absoluto e relativo do saco vitelino são influenciados pelo tamanho do ovo. Como neste experimento, o peso dos ovos foi limitado entre 64 e 76,5g em todos os tratamentos, o efeito deste sobre o saco vitelino foi eliminado. Desta forma, não foi observada diferença nestas respostas em função dos tratamentos.

Tabela 33. Valor de TBARS (mg de malondialdeído/kg de saco vitelino) do saco vitelino de acordo com as dietas e os períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	
	3	7
6	0,53Aa	0,48Aa
0	0,55Aa	0,13Bb

Letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, são diferentes pelo teste SNK ($p \leq 0,00001$). CV=22,1%.

Houve interação entre os tratamentos para a variável valor de TBARS do saco vitelino. Os sacos vitelinos dos pintos provenientes dos ovos armazenados por sete dias e das matrizes alimentadas com cantaxantina na dieta apresentaram menor valor de TBARS do que os demais tratamentos.

O valor de TBARS do saco vitelino indica o estresse oxidativo da amostra, portanto era esperado que o saco vitelino dos pintos do tratamento “ovos de matrizes alimentadas com cantaxantina e armazenados por sete dias” apresentasse maior valor de TBARS do que o dos demais tratamentos. As análises laboratoriais indicaram o contrário, pois de acordo com os valores de TBARS este tratamento (B7) apresentou menor peroxidação. Isso pode ter ocorrido em função da falta de especificidade do TBARS, já que segundo Fellenberg e Speisky (2006), o MDA não é o único produto da oxidação dos lipídios que reage com o ácido tiobarbitúrico. Os demais tratamentos (A3, A7 e B3) podem ter apresentado valores muito baixos de MDA, provocando a reação de outras substâncias (aldeídos não provenientes de oxidação lipídica) com o ácido tiobarbitúrico, superestimando os resultados.

4.2. Experimento II

Os resultados de fertilidade em função dos tratamentos estão demonstrados na Tabela 34 e na Fig. 14.

Tabela 34. Fertilidade (%) em função das dietas e das idades das matrizes

Cantaxantina (ppm)	Idade das matrizes (semanas)					Média
	50	51	55	59	60	
6	98,1	97,5	94,5	91,1	91,2	94,5 A
0	94,9	95,4	90,8	87,3	88,9	91,5 B
Média	96,5	96,4	92,7	89,2	90,1	L

A,BMédias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste F ($p \leq 0,0001$). ^LRegressão linear, para as idades das matrizes, pelo teste F ($p \leq 0,01$). CV = 4,5%

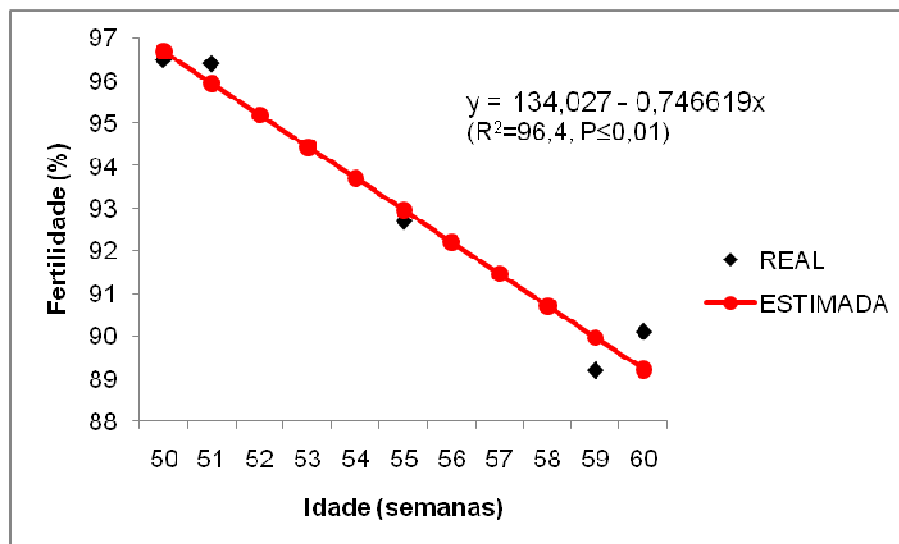


Figura 14. Fertilidade em função da idade das matrizes

Não houve interação entre os tratamentos para a variável fertilidade. Independente da idade, a adição de cantaxantina à dieta das matrizes aumentou ($p \leq 0,0001$) a fertilidade em 3,2% quando comparado ao tratamento que não recebeu cantaxantina. Independente da dieta, a fertilidade reduziu 0,75% ($p \leq 0,0001$) por semana de envelhecimento das matrizes entre 50 e 60 semanas de idade.

Os resultados referentes ao efeito da dieta estão de acordo com os encontrados por Souza et al. (2008), Scher et al. (2009) e Rosa et al. (2010). Os resultados referentes à influência da idade sobre a fertilidade estão de acordo com Lake (1989) e Hocking (1989).

O efeito positivo da cantaxantina sobre a fertilidade pode ser devido ao efeito antioxidante deste carotenóide tanto na galinha quanto no galo, conforme explicado anteriormente para os resultados da Tabela 21.

O efeito negativo da idade sobre a fertilidade poderia ser explicado pela maior susceptibilidade dos espermatozóides dos galos velhos aos danos oxidativos, demonstrado por Weir e Robaire (2007), que foi compensado, somente em parte neste experimento, pela adição de antioxidante à dieta. Estes danos oxidativos podem ter causado alterações na cromatina, influenciando a fertilidade dos galos com a progressão da idade (Rodrigues et al., 2009). Outros fatores observados nos galos velhos, que não podem ser melhorados com a adição de antioxidantes, incluem redução do número de espermatozóides no ejaculado, menores libido e número de cópulas férteis (Rocha Júnior e Baião, 2001). Quanto à redução na fertilidade devido aos fatores relacionados às galinhas, pode ter ocorrido redução na eficiência do mecanismo de ação antioxidante das glândulas hospedeiras sobre os espermatozóides armazenados no oviduto, com o avanço da idade (Rutz et al., 2005), que foi compensado em parte pela adição de cantaxantina na dieta das fêmeas. Além disso, o declínio na duração da fertilidade com a idade pode ter resultado de uma maior facilidade na liberação dos espermatozóides das glândulas hospedeiras das galinhas, reduzindo o número de espermatozóides aptos a realizarem a fertilização do oócito (Rutz et al., 2007).

5. CONCLUSÃO

A cantaxantina, na quantidade de 6ppm, pode ser utilizada como antioxidante nas dietas das matrizes pesadas para minimizar os efeitos negativos do armazenamento sobre o rendimento de incubação e da idade sobre a fertilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUFF, R.V.; THEDFORD, S.S.; HIDIROGLOU, N.N.; PAPAS, A.M.; ODOM JR., T.A. Relative bioavailability of RRR- and all-rac-a-tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated compounds. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 60, p. 397-402, 1994.
- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 6, n. 1, p. 19-23, 1994.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 7, n. 4, p. 659-668, 1995.
- AOAC. *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists*. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- ARAÚJO, J.M. *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 478 p.
- ARORA, K. L.; IKOSIN, I.L. The response of the early chicken embryo to pre-incubation temperature as evidenced from its gross morphology and mitotic pattern. *Physiol. Zool.*, v. 41, p. 104-112, 1968.
- BAKST, M.R., HOLM, L. Impact of egg storage on carbonic anhydrase activity during early embryogenesis in turkey. *Poultry Science*, v. 82, p. 1193-1197, 2003.
- BANERJEE, D.; REDMAN, C.M. Biosynthesis of high density lipoprotein by chicken liver: Conjugation of nascent lipids with apoprotein A1. *The Journal of Cell Biology*, v. 99, p. 1917-1926, 1984.
- BANSAL, A.K; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, v. 2011, p. 2010.
- BARBER, D.L.; SANDERS, E.J.; AEBERSOLD, R.; SCHNEIDER, W.J. The receptor for yolk lipoprotein deposition in the chicken oocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 18761-18770, 1991.
- BEARDSWORTH, P.M.; HERNÁNDEZ, J.M. Canthaxanthin is more than a safe carotenoid. *World Poultry*, v. 19, p. 14-15, 2003.
- BENTON JR., C.E.; BRAKE, J. The effect of broiler breeder flock age and length of egg storage on egg albumen during early incubation. *Poultry Science*, v. 75, p. 1069-1075, 1996.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 20313-20316, 1997.
- BIERI, J.G. E TOLLIVER, T.J. Reversal by bile acid on the inhibition of alfa-tocopherol absorption by retinoic acid. *The Journal of Nutrition*, v. 112, n.2, p. 401-403, 1982.
- BJORNEBOE, a.; BJORNEBOE, g.; DREVOH, a.a. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *The Journal of Nutrition*, v. 120, n.3, p. 233-242, 1990.
- BLOOM, S.E.; MUSCARELLA, D.E.; LEE, M.Y.; RACHLINSKY, M. Cell death in the avian blastoderm: resistance to stressinduced apoptosis and expression of anti-apoptotic genes. *Cell Death and Differentiation*, v. 5, p. 529-538, 1998.
- BÖHM, F.; EDGE, R.; LAND, E.J.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *Journal of American Chemical Society*, v. 119, p. 621-622, 1997.
- BOLELI, I.C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: MACARI, M; GONZALES, E. *Manejo da Incubação*. 2 ed. Jaboticabal: FACTA, 2003. p. 394-434.
- BOTSOGLOU, N.A.; FLOROU-PANERI, P.; NIKOLAKAKIS, I.; GIANNENAS, I.; DOTAS, V.; BOTSOGLOU, E.N.; AGGELOPOULOS, S. Effect of dietary saffron (*Crocyus sativus* L.) on the oxidative stability of egg yolk. *British Poultry Science*, v. 46, p. 701-707, 2005.
- BRAKE, J. T. Análises de riesgo de los puntos críticos en el proceso de incubación para producir pollos bebé de alta calidad. In: *XVI CONGRESO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA*, Lima-perú, p. 218 – 228, 1999.
- BRAKE, J.; WALSH, T.J.; BENTON JR., C.E.; PETITTE, J.N.; MEIJERHOF, R.; PEÑALVA, G. Egg handling and storage. *Poultry Science*, v. 76, p. 144-151, 1997.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. *Bioquímica Ilustrada*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 533p.
- CHAPMAN, M.J. Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative aspects. *Journal of Lipid Research*, v. 21, p. 789-852, 1980.
- CHERIAN, G.; TRABER, M.G.; GOEGER, M.P.; LEONARD, S.W. Conjugated linoleic acid and fish oil in laying hen diets: effects on egg fatty acids, thiobarbituric acid reactive substances, and tocopherols during storage. *Poultry Science*, v. 86, p. 953-958, 2007.

- 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.
- CHRISTENSEN, V.L.; WINELAND, M.J.; FAZENKO, G.M.; DONALDSON, W.E. egg storage alters weight of supply and demand organs of broiler chicken embryos. *Poultry Science*, v. 81, p. 1738-1743, 2002.
- 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.
- COMPÊNDIO Brasileiro de Alimentação Animal. Determinação de Extrato Etéreo – Hidrólise Ácida. In: *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal*. 3 ed. São Paulo: Sindirações/Anfal, 2009. p.65-67.
- COMPÊNDIO Brasileiro de Alimentação Animal. Índice de Peróxido – Método a Frio. In: *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal*. 3 ed. São Paulo: Sindirações/Anfal, 2009. p. 163-166.
- DAVIS, C.; REEVES, R. High value opportunities from the chicken egg. *Rural industries research & development corporation*. Kingston: 2002, 61p.
- DEAN, R.T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*, v. 324, p. 1-18, 1997.
- DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. *Poultry Science*, v. 86, p. 1037-1042, 2007.
- ELIBOL, O.; BRAKE, J. Effect of egg position during three and fourteen days if storage and turning frequency during subsequent incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poultry Science*, v. 87, p. 1237-1242, 2008.
- ELIBOL, O.; PEAK, S.D.; BRAKE, J. Effect of flock age, length of egg storage frequency of turning during storage on hatchability of broiler hatching eggs. *Poultry Science*, v. 81, p. 945-950, 2002.
- ELKIM., R.G. Shell egg cholesterol reduction. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, p. 665-687, 2006.
- EUROPEAN COMMISSION. *Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of canthaxanthin in feedingstuffs for salmon and trout, laying hens, and other poultry*, abril, 2002. Disponibilidade em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out81_en.pdf. Acesso em 29 nov 2010.
- FASENKO, G.M. Egg storage and the embryo. *Poultry Science*, v. 86, p. 1020-1024, 2007.
- FASENKO, G.M.; ROBINSON, F.E.; SEGURA, J.C.; FEDDES, J.J.R.; OUELLETTE, C.A. Long term hatching egg storage alters the metabolism of broiler embryos. *Poultry Science*, v. 80, supl. 1, p.62, 2002.
- FASENKO, G.M.; ROBINSON, F.E.; WHELAN, A.I.; KREMENIUK, K.M.; WALKER, J.A. Prestorage incubation of long-term stored broiler breeder eggs: 1. Effect on hatchability. *Poultry Science*, v. 80, p. 1406-1411, 2001.
- 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.
- FERREIRA, F.C. Influência da idade da matriz pesada e do período de armazenamento dos ovos sobre a qualidade dos ovos, resultados de incubação, qualidade do pinto e desempenho dos frangos. 2006. X f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FERREIRA, P.B. Cantaxantina e 25-hidroxicoлекаliferol e seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos de galos. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- FRANCHINI, A.; SIRRI, F.; TALLARICO, N.; MINELLI, G.; IAFFALDANO, N.; MELUZZI, A. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamins E and C. *Poultry Science*, v. 81, p. 1744-1750, 2002.
- GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; CODONY, R.; TERNES, W. Effect of dietary supplementation with rosemary extract and alfa-tocoferil acetate on lipid oxidation in eggs enriched with ω 3-fatty acids. *Poultry Science*, v. 80, p. 460-467, 2001a.
- GALOBART, J.; BARROETA, A.C.; BAUCCELLS, M.D.; GUARDIOLA, F. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω 3 e ω 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxantin supplementation. *Poultry Science*, v. 80, p. 327-337, 2001b.
- GARCIA, E.A.; MENDES, A.A.; PIZZOLANTE, C.C.; GONÇALVES, H.C.; OLIVEIRA, R.P.; SILVA, M.A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2002.

- GIAMPIETRO, A.; SCATOLINI, A.M.; BOIAGO, M.M.; CORÓ, D.M.O.; SOUZA, H.B.A.; SOUZA, P.A.; LIMA, T.M.A. PIZZOLANTE, C.C. Estudo da metodologia de TBARS em ovos. *Produção Animal - Avicultura, Revista do Avisite*, Campinas, n. 13, p. 18 - 18, maio. 2008.
- GOODMAN, D.S.; BLOMSTRAND, R.; WERNER, B. The Intestinal Absorption and Metabolism of Vitamin A and P-Carotene in Man. *Journal of Clinical Investigation*, v. 45, n.10, p. 1615-1623, 1966.
- GORNALL, D.A.; KUKSIS, A. Alterations in lipid composition of plasma lipoproteins during deposition of egg yolk. *Journal of Lipid Research*, v. 14, p. 197-205, 1973.
- GRIFFIN, H.; GRANT, G.; PERRY, M. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase *in vitro*. *Biochemistry Journal*, v. 206, p. 647-654, 1982.
- GRIFFIN, H.; PERRY, M. Exclusion of plasma lipoproteins of intestinal origin from avian egg yolk because of their size. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B*, v. 82, p. 321-325, 1985.
- GRIFFIN, H.; PERRY, M.; GILBERT, A.B. Yolk formation. In: FREEMAN, B.M. *Physiology Biochemistry Domestic Fowl*. London: Academic Press, 1984. v. 5. p. 345-376, 1984.
- GROBAS, S.; MÉNDEZ, J.; BOTE, C.L.; DE BLAS, C.; MATEOS, G.G. Effect of vitamin E and supplementation on egg yolk alfa-tocopherol concentration. *Poultry Science*, v. 81, p. 376-381, 2002.
- GUEDES, M.C. Química e bioquímica da peroxidação lipídica. I. Formação de radicais livres: espécies reativas de oxigênio. *Revista Científica do IMAPES, Sorocaba*, v. 4, n. 4, p. 19-24, junho. 2006.
- GURR, M.I.; HARWOOD, J.L.; FRAYN, K.N. Lipid Transport. In: *Lipid Biochemistry. An Introduction*. Oxford: Blackwell Science, 2002. 5. ed. p. 170-213.
- HAMMADEH, M.E.; FILIPPOS, A.; HAMAD, M.F. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, v. 3, n. 3, p. 87-110, 2009.
- HEIER, B.T.; JARP, J. An epidemiological study of the hatchability in broiler breeder flocks. *Poultry Science*, v. 80, p. 1132-1138, 2001.
- HERMIER, D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *The Journal of Nutrition*, v. 127, p. 805S-808S, 1997.
- HERMIER, D.; CHAPMAN, M.J.; LECLERCQ, B. Plasma lipoprotein profile in fasted and refed chickens of two strains selected for high or low adiposity. *The Journal Of Nutrition*, v. 114, p. 1112-1121, 1984.
- HOCKING, P.M. Effect of dietary crude protein concentration on semen yield and quality in male broiler breeder fowls. *Br. Poult. Sci.*, v.30, p.935-945, 1989.
- HOOG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, p. 378-384, 1999.
- KARADAS, F.; PAPPAS, A.C.; SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K. Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B*, v. 141, p. 244-251, 2005.
- KIRUNDA, D.F.K.; MCKEE, S.R. Relating quality characteristics of aged eggs and fresh eggs to vitelline membrane strength as determined by a texture analyzer. *Poultry Science*, v. 79, p. 1189-1193, 2000.
- KOUTSOS, E.A.; CLIFFORD, A.J.; CALVERT, C.C.; KLASING, K.C. Maternal carotenoid status modifies the incorporation of dietary carotenoids into immune tissues of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 1132-1138, 2003.
- LAKE, P. E. Recent progress in poultry reproduction. *World's Poult. Sci. J.*, v.45, p.53-59, 1989.
- LAPÃO, C.; GAMA, L.T.; SOARES, M.C. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poultry Science*, v. 78, p. 640-645, 1999.
- 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, p. 822-826, 2000.
- 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.
- LUCCHESI, L.; GARCEZ, M.; SALVADOR, M.; PASQUALOTTO, E. B.; PAQUALOTTO, F. F. A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina. *Reprod. Clim.*; v. 22, p. 7-14, 2007.

- MACHLIN, L.J.; GORDON, R.S.; MARR, J.E.; POPE, C.W. Effect of antioxidants and unsaturated fatty acids on reproduction in the hen. *J. Nutrition*, v. 76, p. 284-290, 1962.
- MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J. Med. Res.*, v. 129, p. 357-367, 2009.
- MATHER, C.M.; LAUGHLIN, K.F. Storage of hatching eggs: the effect on early embryonic development. *British Poultry Science*, v. 18, p. 597-603, 1977.
- MATHER, C.M.; LAUGHLIN, K.F. Storage of hatching eggs: the effect on total incubation period. *British Poultry Science*, v. 17, p. 471-479, 1976.
- MAYES, F.J.; TAKEBALLI, M.A. Storage of the eggs of the fowl (*Gallus domesticus*) before incubation: a review. *World's Poultry Science Journal*, v. 40, p. 131-140, 1984.
- MEIJERHOF, R. Pre-incubation holding of hatching eggs. *World's Poultry Science Journal*, v. 48, p. 57-68, 1992.
- MEIJERHOF, R. Storage of hatching eggs – Influence of storage time, temperature and breeder age on hatchability. *World Poultry Misset*, v. 11, n. 6, p. 21-23, 1995.
- MEIJERHOF, R.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; LEENSTRA, F.R. Influence of pre-incubation treatment on hatching results of broiler breeder eggs produced at 37 and 59 weeks of age. *British Poultry Science*, v. 35, p. 249-257, 1994.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. estabilidad de los pigmentos carotenoides em los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 54, p. 209-215, 2004.
- MORAN JR., E.T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poultry Science*, v. 86, p. 1043-1049, 2007.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2002. 977p.
- NIMPF, J.; SCHNEIDER, W.J. Receptor-mediated lipoprotein transport in laying hens. *The Journal of Nutrition*, v. 121, p. 1471-1474, 1991.
- ONAGBESAN, O.; BRUGGEMAN, V.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; WITTERS, A.; TONA, K.; EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Gas exchange during storage and incubation of avian eggs: effects on embryogenesis, hatchability, chick quality and post-hatch growth. *World's Poultry Science Journal*, v. 63, p.557-573, 2007.
- PÁL, L.; GROSSMANN, R.; DUBLECZ, K.; HUSVÉTH, F.; WÁGNER, L.; BARTOS, A.; KOVÁCS, G. Effects of glucagon and insulin on plasma glucose, triglyceride, and triglyceride-rich lipoprotein concentrations in laying hens fed diets containing different types of fats. *Poultry Science*, v. 81, p. 1694-1702, 2002.
- RACANICCI, A.M.C.; MENTEN, J.F.M.; IAFIGLIOLA, M.C. et al. Efeito da adição de antioxidante BHT e do armazenamento sobre a qualidade da farinha de carne e ossos para frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 2, p.155-161, 2000.
- REIJRINK, I.A.M.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DER BRAND, A. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. *World's Poultry Science Association*, v. 64, p. 581-598, 2008.
- REIS, L.H.; GAMA, L.T.; SOARES, M.C. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. *Poultry Science*, v. 76, p. 1459-1466, 1997.
- ROCHA JÚNIOR, J.M., BAIÃO, N.C. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.6, p.683-685, 2001.
- 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.
- RODENAS, C.E.O.; MURGAS, L.D.S; MACIEL, M.P.; FERRAZ, J.M.; RIBEIRO, M.C.; BERTECHINI, A.G.; FREITAS, R.T.F; FIALHO, E.T. Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. *Ciênc. Agrotec.*, v. 29, n. 1, p. 160-167, 2005.
- RODRIGUES, A.C.N.; ROCHA, J.V.; BELETTI, M.E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.6, p.1302-1307, 2009.
- ROQUE, L.; SOARES, M. C. Effects of eggshell and broiler breeder age on hatchability. *Poultry Science*, v.73, n.12, p. 1838-1845, 1994.

- ROSA, A.P.; SCHER, A.; DUARTE, V.; BOEMO, L.; VIEIRA, T.N.N.; FERREIRA JR., J.A.G.; SORBARA, J.O.B. 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*. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.
- RUIZ, J.; LUNAM, C.A. Effect of pre-incubation storage conditions on hatchability, chick weight at hatch and hatching time in broiler breeders. *British Poultry Science*, v. 43, p. 374-383, 2002.
- 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.
- RUTZ, R.; ANCIUTI, M.A.; XAVIER, E.G.; ROLL, V.F.B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.3, p.307-317, 2007.
- SALVANTE, K.G.; LIN, G.; WALZEM, R.L.; WILLIAMS, T.D. Characterization of very low density lipoprotein particle diameter dynamics in relation to egg production in a passerine bird. *The Journal of Experimental Biology*, v. 210, p. 1064-1074, 2007.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002, 265p.
- SCHER, A.; ROSA, A.P.; SORBARA, J.O.B.; DUARTE, V.; BOEMO, L.; VIEIRA, T.N.N. Efeitos da adição de HyD e Carophyll Red à dieta de matrizes de corte sobre a incubação artificial. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2009, Porto Alegre. *Anais do Prêmio Lamas da...* Campinas: Facta, 2009. p. 36.
- SCHMIDT, G.S.; FIGUEIREDO, E.A.P.; AVILA, V.S. Incubação: estocagem de ovos férteis. *Embrapa Comunicado Técnico*, n. 303, 2002, 5 p.
- SCHMIDT, G.S.; FIGUEIREDO, E.A.P.; SAATKAMP, M.G.; BOMM, E.R. Effect of storage period and egg weight on embryo development and incubation results. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 11, n.1, p. 1-5, 2009.
- 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.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v. 48, n. 6, p. 835-50, 1996.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n.1, p. 94-103, 1999.
- SISTEMA de análises estatísticas – SAEG. Versão 9.0. Viçosa: UFV, 2005.
- SOUZA, R.A.; SOUZA, P.A.; SOUZA, R.C.; NEVES, A.C.R.S. Efeito da utilização de Carophyll Red nos índices reprodutivos de matrizes de frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Supl. 10, p. 32, 2008.
- SPEAKE, B.K.; MURRAY, A.M.B.; NOBLE, R.C. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid. Res.*, v.37, p. 1-32, 1998.
- STEVENS, L. Lipids and their metabolism. In: *Avian Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Cambridge University Press, 1996. P. 46-64.
- STRYER, L. Biossíntese de lipídeos de membrana e esteróides. In: *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 652-678.
- SURAI, A.P.; SURAI, P.F.; STEINBERG, W.; WAKEMAN, W.G.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science*, v. 44, p. 612-619, 2003.
- 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, p. 235-243, 2000.
- SURAI, P.F. Selenium in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, v. 58, p. 333-347, 2002.
- SURAI, P.F. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *British Poultry Science*, v. 40, p. 397-405, 1999.
- SURAI, P.F.; IONOV, I.A.; KUKLENKO, T.V.; KOSTJUK, I.A.; MACPHERSON, A.; SPEAKE, B.K.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.C. 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, p. 257-263, 1998.
- 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, p. 406-410, 1999a.
- SURAI, P.F.; SPARKS, N.H.C. Comparative evaluation of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. *British Poultry Science*, v. 42, p. 252-259, 2001.
- SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.C. Antioxidant systems of the developing chicken embryo: glutathione peroxidase. *British Poultry Science*, v. 38, p. S19-S20, 1997.
- SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.C. Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biological Trace Element Research*, v. 68, p. 63-78, 1999b.
- SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. *Journal of Poultry Science*, v. 38, p. 1-27, 2001.
- TANURE, C.B.G.S.; CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M.; BAIÃO, N.C.; STRINGHINI, J.H.; GOMES, N.A. Efeitos da idade da matriz leve e do período de armazenamento de ovos incubáveis no rendimento de incubação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.6, p.1391-1396, 2009.
- TARLADGIS, B.G.; WATTS, B.M.; YOUNATHAN, M.T. A distillation methodology for the quantitation determination of malonaldeide in rancid foods. *The Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 37, p. 44-48, 1960.
- TARUGI, P.; ALBERTAZZI, L.; NICOLINI, S.; CALANDRA, S. Absence of apolipoprotein B-48 in the chick, *Gallus domesticus*. *Journal of Lipid Research*, v. 31, p. 417-427, 1990.
- TARUGI, P.; BALLARINI, G.; PINOTTI, B.; FRANCHINI, A.; OTTAVIANI, E.; CALANDRA, S. Secretion of apoB- and apoA-I-containing lipoproteins by chick kidney. *Journal of Lipid Research*, v. 39, p. 731-743, 1998.
- TONA, K.; BAMELIS, F.; COUCKE, W.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E. Relationship between broiler breeder's age and egg weight loss and embryonic mortality during incubation in large-scale conditions. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 10, p. 221-227, 2001.
- TONA, K.; MALHEIROS, R.D., BAMELIS, F. et al. Effects of storage time on incubating egg gas pressure, thyroid hormones, and corticosterone levels in embryos and on their hatching parameters. *Poultry Science*, v. 82, p. 840-845, 2003.
- TULLETT, S. G. Science and art of incubation. *Poultry Science*, v.69, n.1, p.1-15, 1990.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.1, p.47-53, 2007.
- VAN CLEEF, E.H.C.B.; EZEQUIEL, J.M.B.; GONÇALVES, J.S; PASCOAL, L.A.F. Determinação da matéria seca das fezes de ovinos e da carne de peito de frango através do método tradicional e por liofilização. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, v. 11, n. 4, 2010. Disponível em <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040410/041009.pdf>>
- VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO JR., A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 31, p. 31-44, 1998.
- VISSCHEDIJK, A. H. J. The air space and embryonic respiration. 3. The balance between oxygen and carbon dioxide in the air space of the incubating chicken egg and its role in stimulating pipping. *Br. Poult. Sci.*, v. 9, n. 2, p. 197-210, 1968.
- WALSH, T.J.; RIZK, R.E.; BRAKE, J. Effects of temperature and carbon dioxide on albumen characteristics weight loss, and early embryonic mortality of long stored hatching eggs. *Poultry Science*, v. 74, p. 1403-1410, 1995.
- WALZEM, R.L. Lipoproteins and Laying Hen: Forms Follows Function. *Poultry and Avian Biology Reviews*, v. 7, n. 1, p. 31-64, 1996.
- WALZEM, R.L., DAVIS, P.A., HANSEN, R.J. Overfeeding increases very low density lipoprotein diameter and causes the appearance of a unique lipoprotein particle in association with failed yolk deposition. *Journal of Lipid Research*, v. 35, p. 1354-1366, 1994.
- WALZEM, R.L.; HANSEN, R.J.; WILLIAMS, D.L.; HAMILTON, R.L. Estrogen Induction of VLDL Assembly in Egg-Laying Hens. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 467S-472S, 1999.

WALZEM, R.L.; WATKINS, S.; FRANKEL, E.N.; HANSEN, R.J.; GERMAN, J.B. Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: a linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. *The Proceedings of the National Academy Sciences USA*, v. 92, p. 7460-7464, 1995.

WEIR, C.P.; ROBAIRE, B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown norway rat. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

WILSON, J.X.; LUI, E.M.; DEL MAESTRO, R.F. Developmental profiles of antioxidant enzymes and trace metals in chick embryo. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 65, p. 51-64, 1992.

XAVIER, I.M.C.; CANÇADO, S.V.; FIGUEIREDO, T.C. et al. Qualidade de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n. 4, p. 953-959, 2008.

YASSIN, H.; VELTHUIS, A.G.J.; BOERJAN, M.; VAN RIEL, J.; HUIRNE, R.B.M. Field study on broiler eggs hatchability. *Poultry Science*, v. 87, p. 2408-2417, 2008.

ZANINI, S.F. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina “e” na ração sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de galos leves. 2001. 139 p. (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ANEXO 1

Quadro 1. Monitoramento da fertilidade, eclosão sobre ovos totais incubados e sobre ovos férteis incubados, em porcentagem, dos galpões que constituíram os tratamentos COM e SEM adição de cantaxantina*

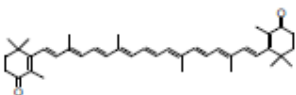
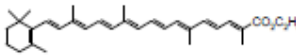
40 SEMANAS DE IDADE			
TRAT	Fertilidade (%)	Eclosão Total (%)	Eclosão sobre férteis (%)
COM	98,2	85,9	87,5
SEM	97,5	86,5	88,7
CV (%)	1,1	3,7	3,6
41 SEMANAS DE IDADE			
TRAT	Fertilidade (%)	Eclosão Total (%)	Eclosão sobre férteis (%)
COM	98,9	84,4	85,3
SEM	98,2	85,4	87,0
CV (%)	1,1	5,1	5,3
42 SEMANAS DE IDADE			
TRAT	Fertilidade (%)	Eclosão Total (%)	Eclosão sobre férteis (%)
COM	98,8	87,2	88,3
SEM	98,5	87,1	88,4
CV (%)	1,2	2,7	2,7
43 SEMANAS DE IDADE			
TRAT	Fertilidade (%)	Eclosão Total (%)	Eclosão sobre férteis (%)
COM	98,3	88,0	89,5
SEM	99,1	91,0	91,9
CV (%)	1,1	3,9	3,8
44 SEMANAS DE IDADE			
TRAT	Fertilidade (%)	Eclosão Total (%)	Eclosão sobre férteis (%)
COM	98,7	88,8	90,0
SEM	98,9	91,2	92,2
CV (%)	1,1	3,2	3,2
45 SEMANAS DE IDADE			
TRAT	Fertilidade (%)	Eclosão Total (%)	Eclosão sobre férteis (%)
COM	96,5	84,6	87,6
SEM	97,3	86,5	88,9
CV (%)	1,8	5,8	4,6

Os tratamentos são semelhantes entre si pelo teste F em todas as semanas avaliadas ($p>0,05$)

*Desde 40 até 45 semanas de idade, as matrizes foram alimentadas com a mesma ração. A partir da 46a semana de idade, as rações diferiram apenas pela adição de 6ppm de cantaxantina.

ANEXO 2

Determinação de apoester e cantaxantina na gema do ovo

Determination of apoester and cantaxanthin in egg yolk	
J. Schlerke and C. Frey	
<p>Range</p> <p>Above 0.5 mg/kg</p>	<ul style="list-style-type: none"> Centrifuge (e.g. Megafuge 1.0, Heraeus) Balance (e.g. PM 2000 and AT 261 Delta Range, Mettler-Toledo) HPLC (e.g. LaChrom 7000 with UV/VIS detector L-7420, Merck-Hitachi Int., chromatography data system)
<p>Structures</p> <div style="text-align: center;">  <p>all-E-Canthaxanthin</p>  <p>all-E-Apoester (all-E-ethyl-β-apo-8'-carotenoate)</p> </div>	<p>Reagents</p> <p>As far as possible, only reagents of analytical grade are used.</p> <ul style="list-style-type: none"> Butylated hydroxytoluene (BHT, e.g. ICN Biochemicals no. 203824) Chloroform, acid-free (e.g. Fluka no. 25690) Cyclohexane (e.g. Merck no. 1.09666) n-Hexane (e.g. Merck no. 1.04367) n-Heptane (e.g. Merck no. 1.04379) Acetone (e.g. Merck no. 1.000014) Ethanol, absolute (e.g. Merck no. 1.00963) Reference substances: all-E-Canthaxanthin and all-E-Apoester (= all-E-ethyl-β-apo-8'-carotenoate) (e.g. Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany)
<p>Principle</p> <p>Egg yolk is diluted with water. The emulsion is mixed with ethanol and extracted with n-hexane on the horizontal shaker. The carotenoids are analysed by injecting an aliquot of the n-hexane phase into a normal-phase HPLC using the detection wavelength of 456 nm.</p>	<p>Standard solution and calibration</p> <p>Preparation of standard solution: Weigh accurately approx. 3 mg of all-E-canthaxanthin or all-E-apoester (all-E-ethyl-β-apo-8'-carotenoate, reference substance, respectively) and 1 g of BHT into a 100 ml volumetric flask, dissolve in 10 ml of chloroform (supported by ultrasonic treatment) and make up to volume with cyclohexane. Transfer 5 ml of the solution to a 100 ml volumetric flask and make up to volume with cyclohexane, resulting in apoester or cantaxanthin concentrations of approx. 1.5 mg/l in cyclohexane/chloroform (99.5:0.5; v/v).</p> <p>Spectrophotometry of standard solutions: Immediately after preparation, measure the concentrations of the standard solutions spectrophotometrically at the respective absorption maxima (all-E-apoester: approx.</p>
<p>Equipment</p> <ul style="list-style-type: none"> Dispensing instrument (e.g. Ultra-Turrax, T25 combined with a 10 mm dispensing aggregate, IKA) Vortex orbital shaker (e.g. VWR International) Water bath with reflux condensers (e.g. GFL) Horizontal Shaker (e.g. HS501 digital, IKA) Spectrophotometer (e.g. UVICON 930, Kontron) 	
Apoester and cantaxanthin in egg yolk - version 1.0 (06.08.09)	© DSM Nutritional Products Ltd 1/4

448 nm; all-E-canthaxanthin: 470 nm, blank: cyclohexane) and calculate the concentrations according to the following formulas:

$$C_{\text{all-E-apoester}} [\text{mg/l}] = \frac{\text{Absorption} \cdot 10\,000}{2550}$$

$$C_{\text{all-E-canthaxanthin}} [\text{mg/l}] = \frac{\text{Absorption} \cdot 10\,000}{2200}$$

2550: $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ of all-E-apoester (= all-E-ethyl- β -apo-8'-carotenolate) in cyclohexane [1]

2200: $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ of all-E-canthaxanthin in cyclohexane [2, 3]

10000: Scaling factor

HPLC of standard solution:

Immediately after preparation, inject at least six 20 μl -aliquots of the standard solutions into the HPLC system. Determine the total peak areas of the chromatograms (including the peaks of the all-E-isomers, the Z-isomers and potentially present coloured impurities, but excluding the solvent peak). The peak area of all-E-apoester or all-E-canthaxanthin should exceed 95 % of the total peak area of the respective chromatogram. Calculate the response factors (RF) for all-E-apoester or all-E-canthaxanthin using the mean total peak areas obtained from all chromatograms and the spectrophotometrically measured apoester or canthaxanthin concentrations applying the following formula:

$$\text{RF}_{\text{all-E-apoester or all-E-canthaxanthin}} = \frac{A_{\text{total}}}{c}$$

A_{total} : Mean total peak area of all recorded chromatograms (mVs)

c: Spectrophotometrically measured apoester or canthaxanthin concentration of the standard solutions [mg/l]

Constancy of HPLC system

If the HPLC system is not changed calibrations can be routinely performed e.g. every three months. During the interval between calibrations, the constancy of the HPLC system should be controlled using control solutions analysed together with each set of samples. Use heat-isomerised standard solutions (a mixture of apoester and canthaxanthin), which are stable over at least 3 months if stored at approx. 5 °C in the darkness.

Preparation of the control solution:

Predissolve approx. 1.5 mg of all-E-apoester, 1.5 mg of all-E-canthaxanthin and 0.5 g of BHT in a 500 ml volumetric flask in 10 ml of chloroform. Dilute the solution with approx. 200 ml of n-hexane/acetone (93:7; v/v) and reflux for 1 h at a water bath temperature of 80°C. After cooling to room temperature, fill the solution up to volume with n-hexane/acetone (93:7; v/v). Pour the mixture into a dispenser bottle, mix well, leave at room temperature over night and then fill into a large number of HPLC vials. Seal the vials carefully with Teflon/silicone septa and store at approx. 5 °C (refrigerator) in the dark.

Procedure

Weigh exactly approx. 10 g of the well mixed egg yolk into a 50-ml glass beaker. Add exactly the same amount of demineralized water and mix the emulsion using a dispersing instrument. Weigh 1.00 g of the mixture into a 10 ml test tube, add 1 ml demineralized water and 2 ml ethanol, and shake the mixture using a Vortex. Add 4 ml of n-hexane, close the test tube with a stopper, and shake vigorously with a horizontal shaker for 10 minutes. Centrifuge the emulsion for 5 minutes at approx. 3000 rpm using a laboratory centrifuge. Fill an aliquot of the upper n-hexane phase into a HPLC vial and inject 20-50 μl of the extract into the HPLC.

HPLC

Conditions

- Column: Lichrosorb®Si60, 5 μm , 250 x 4 mm, Merck
- Mobile phase: n-heptane/acetone (93:7; v/v), isocratic
- Flow rate: 1.5 ml/min
- Pressure: 70-120 bar
- Temperature: ambient (e.g. 23 °C)
- Injection volume: 20-50 μl
- Detection wavelength: 466 nm
- Run time: 15 min

Retention times

- Retention of all-E-canthaxanthin: 7-14 min

• Relative retention times (In relation to all-E-canthaxanthin):	
α- and β-Carotene:	0.21
all-E-Apoester:	0.23
Z-Apoester:	0.24
all-E-Canthaxanthin:	1.00
Z-Canthaxanthin:	1.09
all-E-Lutein:	10.5
all-E-Zeaxanthin:	12.0

Calculation

Total apoester [mg/kg] =

$$\frac{(A_{all-E-apo} + A_{Z-apo}) \cdot 4.3 \cdot V_{inj}}{0.5 \cdot RF_{all-E-apo} \cdot 20}$$

Total canthaxanthin [mg/kg] =

$$\frac{(A_{all-E-can} + 1.3 \cdot A_{Z-can}) \cdot 4.3 \cdot V_{inj}}{0.5 \cdot RF_{all-E-can} \cdot 20}$$

$A_{all-E-apo}$:	Peak area of all-E-apoester [mVs]
A_{Z-apo} :	Peak area of Z-apoester [mVs]
$A_{all-E-can}$:	Peak area of all-E-canthaxanthin [mVs]
A_{Z-can} :	Peak area of Z-canthaxanthin [mVs]
$RF_{all-E-apo}$:	Response factor of all-E-apoester [mVs/mg]
$RF_{all-E-can}$:	Response factor of all-E-canthaxanthin [mVs/mg]

1.3:	Relative response factor of Z-canthaxanthin (Correction takes into account that the specific response of Z-canthaxanthin isomers is 1.3 times lower than that of all-E-canthaxanthin, as a mean, if the stated HPLC conditions are applied.)
0.5:	Amount of extracted egg yolk [g] (Sample weight = 1 g of egg yolk, dilution 1:1)
4.3:	Volume of the n-hexane phase [ml] (Due to egg yolk lipids, the volume of the n-hexane phase [4 ml] is enlarged to a volume of 4.3 ml, as a mean.)
V_{inj} :	Injected Volume of extract [μl]
20:	Injected Volume of standard solution [μl]

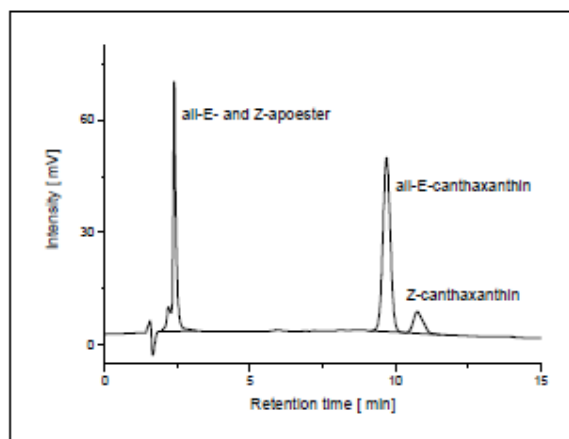
References

[1] β-apo-8'-Carotenoid acid ethyl ester, JECFA publication, prepared at the 26th JECFA (1984), published in FNP 31/1, 1984 and in FNP 52, 1992.

[2] Canthaxanthin, Prepared at the 51st JECFA (1998), published in the Combined Compendium of Food Additive Specifications, FAO JECFA Monographs 1, 2005.

[3] E. De Ritter and A. E. Purcell: Carotenoid Analytical Methods, In: J. Chr. Bauernfeind (ed.) Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, Academic Press, New York, p. 688, 1981.

Typical chromatogram of an egg yolk extract



ANEXO 3

Determinação de vitamina a e dl- α -tocopherol nos premixes

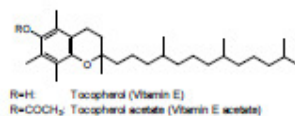
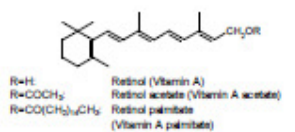
Determination of vitamin A and dl- α -tocopherol acetate in premixes

P. Hofmann, W. Schüep

Range

Above 1 MioIU/kg for vitamin A¹⁾ and above 1 g/kg for tocopherol acetate.

Structures



Principle

The assay comprises enzymatic digestion of gelatine coatings (without saponification) and extraction of the vitamin using a solvent mixture of acetone and tetrahydrofuran. The centrifuged extract is analysed via a reversed phase HPLC column using UV-detection at 325 nm (vitamin A) and 285 nm (tocopherol acetate).

Equipment

- Lab balance, accuracy 0.01 g (e.g. Mod. P1200, Mettler Instrumente AG, Greifensee, Switzerland)
- Analytical balance, sensitivity 0.01 mg (e.g. Mod. AT261, Mettler Instrumente AG, Greifensee, Switzerland)

- Ultrasonic bath (e.g. TUC-150, 150 W, 35 kHz, heatable, Telsonic, Bronschhofen, Switzerland)
- Centrifuge (e.g. laboratory centrifuge 4000 rpm Heraeus-Christ GmbH, Osterode, Germany; 10 ml centrifuge tubes)
- HPLC modules:
Autosampler (e.g. Waters WISP 717, Millipore Corp., Milford, MA 01757, USA)
HPLC pump (e.g. Jasco PU 980, Jasco Corporation, 2967-5, Ishikavacho, Hachioji, Tokyo, Japan)
UV detector (e.g. Linear UVIS 204, Stagma AG, CH-8304 Wallisellen, Switzerland)
Integration system (e.g. VG Multichrom Chromatography System, Astmoore, Cheshire, UK, combined with a VAX computer, DEC, Zürich, Switzerland)

Reagents

As far as possible, only reagents of analytical grade are used.

- Vitamin A acetate (e.g. Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Vitamin A palmitate (e.g. Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- dl- α -Tocopherol acetate (e.g. Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)
- Protex 6L (Genencor, Leiden, The Netherlands)
- Acetone (\geq 99.5%, e.g. Fluka)
- Ethanol, absolute (\geq 99.8%, e.g. Merck)
- Methanol (\geq 99.8%, e.g. Merck)
- 2-propanol (\geq 99.5%, e.g. Fluka)
- Tetrahydrofuran (\geq 99.5%, e.g. Fluka)
- Ammonium hydroxide (25%, e.g. Fluka)
- Ammonium hydroxide solution (0.02%): Dilute 1.0 ml of ammonium hydroxide solution (25%) to 1000 ml using water.

¹⁾ Conversion factors see chapter remarks, MioIU=10⁶ IU.

- Extraction solution:
Mix equal volumes of acetone and tetrahydrofuran.
- Mobile phase:
Pipette 20.0 ml of demineralised water into a 1000 ml volumetric flask and adjust to volume using methanol.

Standard solution

Stock solutions

Vitamin A acetate:

Into a 100 ml volumetric flask accurately weigh about 65 mg of vitamin A acetate, dissolve in 2-propanol and adjust to volume using 2-propanol.

Vitamin A palmitate:

Into a 100 ml volumetric flask accurately weigh about 70 mg vitamin A palmitate, dissolve in 2-propanol and adjust to volume using 2-propanol.

dl- α -Tocopherol acetate:

Into a 100 ml volumetric flask accurately weigh about 100 mg of dl- α -tocopherol acetate, dissolve in 2-propanol and adjust to volume using 2-propanol.

The stock solutions are stable for 6 months when stored in the deep freezer (-18 °C).

Working standard solution

Pipette the following quantities of stock solutions into a 100 ml volumetric flask and adjust to volume using 2-propanol.

Vitamin A acetate: 2.0 ml
Vitamin A palmitate: 2.0 ml
dl- α -Tocopherol acetate: 5.0 ml

The working standard solution is stable for 6 months when stored in the deep freezer (-18 °C).

Assay procedure

Into a 100 ml volumetric flask accurately weigh the amount of sample specified in table 1 and/or 2. Add approx. 1 ml of Protex 6L and 10 ml of ammonium hydroxide solution. Treat the mixture in an ultrasonic bath at 65 °C under frequent swirling for 20 min. After

cooling to room temperature add approx. 60 ml of extraction solution and sonicate again for 10 minutes at 45°C. After cooling to room temperature, adjust to volume using extraction solution. Close the flask with a suitable stopper and shake well. Dilute if necessary to appropriate concentrations (see table 1 and/or 2) using ethanol. Centrifuge an aliquot of the final solution until a clear supernatant is obtained. Inject 20 μ l of the clear supernatant into the HPLC.

Concentration range (MioIU ² Vitamin A/kg)	Sample weight	Dilution
< 1	approx. 2 g	-
1 – 10	approx. 1 g	-
10 – 80	approx. 1 g	1 : 10
100	approx. 1 g	1 : 20
200	approx. 1 g	1 : 50
300	approx. 1 g	1 : 100
500	ca. 0.1 g	1 : 20

Table 1

Concentration range (g Vitamin E ² /kg)	Sample weight	Dilution
1 – 20	approx. 1 g	-
20 – 100	approx. 1 g	1 : 10
100 – 200	approx. 1 g	1 : 20
> 200	approx. 0.1 g	1 : 10

Table 2, ²dl- α -tocopherol acetate

HPLC conditions

- Column: Hypersil ODS, 3 μ m, 125x4 mm (Shandon, Astmore, Cheshire, UK)
- Mobile phase: 2% demineralised water in methanol (see Reagents)
- Flow: 1.0 ml/min
- Column temperature: 25 °C
- Pressure: approx. 50-150 bar
- Injection volume: 20 μ l
- Detection and range: wavelength and sensitivity program (see table below)
- Run time: 20 min
- Calibration: external standard, peak area

Time (s)	Wavelength (nm)	Range (A.U.F.S)
0-300	328	0.5
300-600	285	0.05
600-1200	328	0.1

² MioIU=10⁶ IU

Retention times

Vitamin A acetate: approx. 3 min
 di- α -Tocopherol acetate: approx. 7 min
 Vitamin A palmitate: approx. 15 min

Calibration

Calibration is performed via the peak area using an external standard. The working standard solution is injected repeatedly into the HPLC system until two consecutive chromatograms are obtained with the same area of peaks of the vitamins ($\pm 2.5\%$ from the mean value of the two injections).

Calculations

The mean response factors (RF) of the vitamins are calculated according to the following formula:

$$RF = \frac{A_{St}}{c}$$

A_{St} : Mean peak area obtained from the working standard solution [mVs]
 c: Concentration of vitamins in the working standard solution (di- α -tocopherol acetate: [$\mu\text{g}/\text{ml}$], vitamin A acetate and palmitate: [IU/ml])

The concentrations (c) of the working standard solutions are calculated according to the following formulas:

$$C_{\text{di-}\alpha\text{-Tocopherol acetate}} [\mu\text{g}/\text{ml}] = \frac{m_{St} \cdot 5 \cdot 1000}{100 \cdot 100}$$

$$C_{\text{Vitamin A acetate}} [\text{IU}/\text{ml}] = \frac{m_{St} \cdot 2 \cdot 1000}{100 \cdot 100 \cdot 0.344}$$

$$C_{\text{Vitamin A palmitate}} [\text{IU}/\text{ml}] = \frac{m_{St} \cdot 2 \cdot 1000}{100 \cdot 100 \cdot 0.55}$$

m_{St} : Weight of standard substance [mg]
 5: Aliquot taken from the stock solution [ml]
 2: Aliquot taken from the stock solution [ml]
 1000: Conversion mg to μg
 100: Volume of the stock solution [ml]
 100: Volume of the working standard solution [ml]
 0.344: Conversion factor for vitamin A acetate [IU to μg]

0.55: Conversion factor for vitamin A palmitate [IU to μg]

Using the mean response factor (RF) from the standard injections and the area counts from the sample injection, the vitamin contents of the sample are calculated according to the following formula:

$$\text{mg or IU Vitamin/kg} = \frac{A_{Sa} \cdot V \cdot V_2}{RF \cdot m \cdot V_1}$$

A_{Sa} : Peak area obtained from the sample solution [mVs]
 V: Volume of the sample extract (100 ml) [ml]
 RF: Mean response factor
 V_1 : Aliquot of the sample extract to be diluted [ml]
 V_2 : Final volume after dilution [ml]

Variation of results

Approx. $\pm 5\%$ for double determinations (estimated)

Detection limit

Vitamin A acetate: 200000 IU/kg
 Vitamin A palmitate: 200000 IU/kg
 di- α -Tocopherol acetate: 500 mg/kg

Remarks

Definition of the conversion factors IU (International Units) to μg :

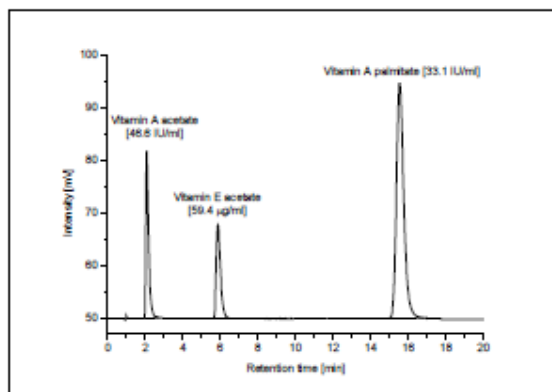
1 IU Vitamin A = 0.3 μg all-trans-retinol (definition according to biological activity)

1 IU Vitamin A = 0.344 μg all-trans-retinol acetate (conversion according to molecular weight)

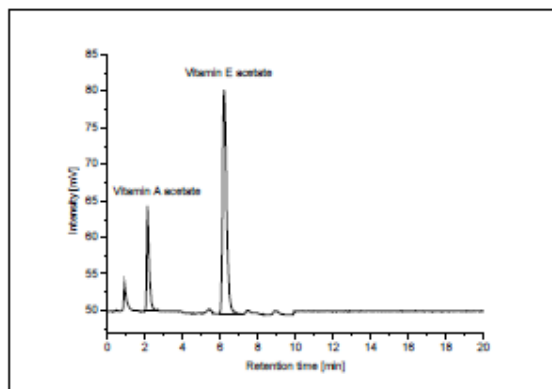
1 IU Vitamin A = 0.550 μg all-trans-retinol palmitate (conversion according to molecular weight)

Chromatograms

Chromatogram of a standard solution



Chromatogram of a premix extract



The analysed premix contained the vitamins at the following levels: 18.6 MioIU vitamin A acetate/kg, 92 g vitamin E acetate/kg.

ANEXO 4

Quadro 2. Composição em ácidos graxos (%) da gema liofilizada em função das dietas e dos períodos de armazenamento dos ovos

Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C12:0 láurico ¹	C14:0 mirístico ¹	C15:0 pentadecanóico ¹
6	3	0,010	0,395	0,073
0	3	0,010	0,385	0,083
6	7	0,010	0,405	0,063
0	7	0,010	0,403	0,083
Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C16:0 palmítico ¹	C16:1 palmitoléico ²	C17:0 margárico ¹
6	3	24,655	3,358	0,233
0	3	24,490	3,260	0,250
6	7	25,080	3,670	0,253
0	7	25,088	3,438	0,253
Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C17:1 cis-10-heptadecenóico ²	C18:0 esteárico ¹	C18:1 oléico ²
6	3	0,143	8,473	42,410
0	3	0,153	8,375	42,118
6	7	0,155	8,343	41,403
0	7	0,153	8,563	41,075
Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C18:2 trans t-linoléico	C18:2 linoléico ³	C18:3 trans t-linolênico ³
6	3	0,123	13,760	0,200
0	3	0,148	14,030	0,210
6	7	0,110	14,180	0,218
0	7	0,115	14,305	0,230
Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C18:3 linolênico ³	C18:4 octadecatetreenóico ³	C20:0 araquídico ¹
6	3	0,300	0,020	0,050
0	3	0,290	0,020	0,048
6	7	0,323	0,020	0,048
0	7	0,323	0,020	0,048
Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C20:1 eicosenóico ²	C20:4 araquidônico ³	C22:0 behênico ¹
6	3	0,270	2,025	0,035
0	3	0,268	2,180	0,030
6	7	0,270	2,093	0,035
0	7	0,265	2,093	0,030
Cantaxantina (ppm)	Armazenamento (dias)	C24:0 lignocérico ¹	C22:5 docosapentaenóico (DPA) ³	C22:6 docosaheptaenóico (DHA) ³
6	3	0,060	0,165	0,453
0	3	0,058	0,175	0,520
6	7	0,065	0,173	0,453
0	7	0,065	0,178	0,445

Ácidos graxos saturados¹, monoinsaturados² e poliinsaturados³