

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ADITIVOS ANTIOXIDANTES NA DIETA DE  
REPRODUTORES DE CODORNAS JAPONESAS E O EFEITO  
NA PROGÊNIE

Autora: Tainara Ciuffi Euzebio  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Carlesso dos Santos

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro - 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ADITIVOS ANTIOXIDANTES NA DIETA DE  
REPRODUTORES DE CODORNAS JAPONESAS E O EFEITO  
NA PROGÊNIE

Autor: Tainara Ciuffi Euzébio  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Carlesso dos Santos  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Toshimi M. Pinto

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro - 2022

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

E91a	<p>Euzébio, Tainara Ciuffi Aditivos antioxidantes na dieta de reprodutores de codornas japonesas e o efeito na progênie / Tainara Ciuffi Euzébio. -- Maringá, PR, 2022. 107 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos. Coorientadora: Profa. Dra. Paula Toshimi M. Pinto. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2022.</p> <p>1. Antioxidante. 2. Vitamina D. 3. Selênio. 4. Carotenoite. 5. Avicultura. I. Santos, Tatiana Carlesso dos, orient. II. Pinto, Paula Toshimi M. , coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.</p>
CDD 23.ed. 636.50852	



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ADITIVOS ANTIOXIDANTES NA DIETA DE  
REPRODUTORES DE CODORNAS JAPONESAS E O EFEITO  
NA PROGÊNIE

Autora: Tainara Ciuffi Euzebio  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 22 de fevereiro de 2022.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simara Marcia Marcato

Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Yurika  
Tamehiro

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jovani Inês Muller  
Fernandes

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos  
Orientadora

Aos meus avós,  
Idalina Ramos Euzébio e Saul Euzébio (*in memoriam*)  
e  
Natalina Ciuffi Faria (*in memoriam*) e José Braga de Faria (*in memoriam*)

“O homem de bem deixa uma herança aos filhos de seus filhos.”

Provérbios 13:22

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sustento nos momentos em que tudo parecia não dar certo.

Aos meus pais Messiones Euzébio e Luiza Ciuffi F. Euzébio, por todos os sacrifícios feitos até que esse dia chegasse. A minha irmã Natália Ciuffi Euzébio e meu cunhado Leonardo Reggiani, pela amizade.

Ao meu esposo Pedro Augusto Dornelas, por seu amor e não ter me deixado desistir.

À Universidade Estadual de Maringá, instituição responsável por me conceder o privilégio de realizar minha graduação em Zootecnia, Mestrado e Doutorado.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos, por todos os ensinamentos e toda paciência me ajudando a ser um ser humano e profissional melhor.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelos ensinamentos durante essa caminhada. Em especial Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simara M. Marcato, Prof. Dr. Leandro D. Castilha, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula T.M. Pinto e Prof. Dr. Ricardo de Souza Vasconcellos. Aos membros da banca pela disponibilidade e por sua contribuição valorosa.

Aos meus amigos, Lenilson da F. Roza, Rodrigo A. Basaglia, Leticia A. Silva, Evandro Menezes e Lidiane Staub. Aos estagiários e bolsistas por toda disponibilidade e ajuda.

Aos colegas que foram fundamentais para a realização deste trabalho, Bianka Saraiva, Daniele Hermoso, Alceu K. Hirata, Janaina Bragatto e Fernanda Tanamati. As colegas de

turma, Mariani I. Benites, Isabela F. Leal, Lais S. C. Mantovani, pelos estudos, conversas e apoio principalmente na reta final. A minha amiga Bruna A. Bronharo, por todo apoio. A todos os funcionários da FEI, em especial Maurício, Vicente, Toninho, Cleomar, Valdecir e Célio. À secretária do PPZ Solange e a secretária do DZO Elizabeth. Aos meus amigos pessoais que sempre me incentivaram e tinham admiração pela minha trajetória, e aos demais familiares que sempre torceram pela minha felicidade.

Agradeço!

## BIOGRAFIA

TAINARA CIUFFI EUZÉBIO, filha de Messiones Euzébio e Luiza Ciuffi Faria Euzébio, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, Brasil, em 07 de novembro de 1992

Em março de 2010 ingressou no curso de graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, e diplomou-se em fevereiro de 2016.

Em março de 2016 ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da mesma instituição, área de concentração Produção Animal, subárea de Melhoramento Genético Animal sob orientação da Professora Dr<sup>a</sup>. Eliane Gasparino. Em fevereiro de 2018 submeteu-se a banca examinadora para a defesa da dissertação apresentada obtendo o título de Mestra em Zootecnia.

Em março de 2018, iniciou no programa de Pós-Graduação em Zootecnia, doutorado na área de concentração Produção Animal, subárea Produção de Aves, na Universidade Estadual de Maringá – UEM. Em abril de 2021 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação.

No dia 22 de fevereiro de 2022 submeteu-se à banca para defesa da tese.



## INDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
I-INTRODUÇÃO.....	1
1. Coturnicultura.....	2
2. Estresse oxidativo e sistema antioxidante.....	3
2.1 Oxidação e formação de radicais livres.....	3
2.2 Defesa antioxidante.....	4
3. Uso de substâncias com potencial antioxidante na produção avícola.....	6
3.1 Selênio .....	6
3.2 Vitamina D.....	8
3.3 Carotenoides .....	10
3.3.1 Cantaxantina. ....	11
3.4 Associação de Vitamina D e Cantaxantina.....	12
4. Antioxidantes sobre os aspectos reprodutivos das aves.....	13
4.1 Matrizes .....	13
4.2 Reprodutores.....	14
4.3 Desenvolvimento embrionário.....	14
5.Referências.....	16
II - OBJETIVOS GERAIS.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24

### III - ARTIGO 1 - SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS NA DIETA DE REPRODUTORES DE CODORNA JAPONESA PROMOVE MELHORA NO *STATUS REDOX*

	Página
Resumo.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e Métodos .....	28
3. Resultados .....	37
4. Discussão .....	40
5. Conclusões.....	46
6. Agradecimentos .....	46
7. Referências .....	47

### IV- ARTIGO 2 - SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES MELHORA OS PARÂMETROS DE FERTILIDADE DAS MATRIZES E A QUALIDADE DE PINTOS DE CODORNA

	Página
Resumo.....	59
1. Introdução .....	60
2. Material e Métodos .....	61
3. Resultados .....	69
4. Discussão .....	71
5. Conclusões.....	78
6. Agradecimentos .....	78
7. Referências .....	79
V-Considerações finais.....	91

## LISTA DE TABELAS

III- ARTIGO 1 - SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS NA DIETA DE REPRODUTORES  
DE CODORNA JAPONESA PROMOVE MELHORA NO *STATUS REDOX*

	Página
TABELA 1. Composição das dietas experimentais para codornas de postura ( <i>Coturnix coturnix japonica</i> ).....	53
TABELA 2. Sequências de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - qRT-PCR).....	54
TABELA 3. Desempenho produtivo, qualidade interna e externa e coloração de gema de ovos de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo substâncias antioxidantes (n=10).....	55
TABELA 4. Bioquímica sérica de reprodutores e matrizes de codornas alimentadas com dietas contendo substâncias antioxidantes (n=10).....	56
TABELA 5. Capacidade redutora dos radicais ABTS <sup>+</sup> e DPPH na gema de ovo, tecido hepático e soro de reprodutores e matrizes de codorna de postura alimentadas com dietas contendo substâncias antioxidantes (n=3).....	57
TABELA 6. Análise de peroxidação lipídica determinada pela concentração de MDA/g de tecido liofilizado pelo método de TBARS na gema do ovo e tecido hepático de reprodutores(as) de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo diferentes substâncias antioxidantes (n=3).....	58
TABELA 7. Atividade da enzima Superóxido Dismutase no fígado de codornas japonesas alimentadas com substâncias antioxidantes (n=4).....	58
TABELA 8. Expressão relativa dos genes da glutathiona peroxidase ( <i>GPX7</i> ) e da superóxido dismutase ( <i>SOD1</i> ) na mucosa da vagina de reprodutoras de codornas japonesas com 26 semanas (n=5).....	58

IV – ARTIGO 2 - SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES MELHORA OS PARÂMETROS DE FERTILIDADE DAS MATRIZES E A QUALIDADE DE PINTOS DE CODORNA

	Página
TABELA 1. Composição das dietas experimentais para codornas de postura e progênie.....	83
TABELA 2. Desempenho da incubação de ovos oriundos de codornas japonesas suplementadas com substâncias antioxidantes.....	85
TABELA 3. Escore de Pasgar e qualidade da progênie resultante de codornas japonesas alimentadas com substâncias antioxidantes (n=50).....	86
TABELA 4. Estado oxidativo mensurado pela inibição do radical DPPH (%) e ABTS no vitelo e no fígado de embrião e de pintinhos (n= 3) de codornas japonesas alimentadas com diferentes substâncias antioxidantes.....	86
TABELA 5. Peroxidação lipídica do tecido hepático e vitelo de codornas oriundas de reprodutores suplementados com antioxidantes na dieta (n=3).....	87
TABELA 6. Atividade enzimática da SOD no tecido hepático de codornas oriundas de reprodutores suplementados com antioxidantes na dieta.....	87
TABELA 7. Desempenho da progênie de reprodutores (as) de codornas japonesas recebendo antioxidantes na dieta.....	88
TABELA 8. Valores estimados de $\beta$ para pontos de hidrólise na membrana perivitelínica e probabilidade de fertilidade do ovo.....	90

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Defesa antioxidante de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio.....	5
FIGURA 2. Efeito protetor do Se em aves.....	7
FIGURA 3. Formas nutricionais e pós-hidroxiilações da vitamina D. (A) Formas de vitamina D obtidas nutricionalmente, (B) Passos envolvidos até a forma ativa da vitamina D.....	8
<b>IV – ARTIGO 2 - A SUPLEMENTAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES MELHORA OS PARÂMETROS DE FERTILIDADE E A QUALIDADE DE PINTOS DE CODORNA</b>	
FIGURA 1. Seções histológicas da membrana perivitelínica na região do disco germinativo de ovos de codornas japonesas. (A) Colocação de filtro de papel sobre o disco germinativo. (B) Lâmina corada e finalizada. (C) Imagem de microscópio em lentes objetivas de 4x da membrana perivitelínica com pontos de hidrólise.....	84
FIGURA 2. (A) Probabilidade de fertilidade quando o casal recebeu as dietas experimentais; (B) probabilidade de o ovo estar fértil quando as fêmeas receberam as dietas experimentais; (C) probabilidade de fertilidade quando machos receberam as dietas.....	89
FIGURA 3. (A) PHMP quando o casal recebeu as dietas experimentais; (B) Número de PHMP quando as fêmeas receberam as dietas experimentais; (C) PHMP quando machos receberam as dietas.....	89

## RESUMO

O selênio (Se), a cantaxantina (Cx) e o metabólito 25-hidroxicolecalciferol da vitamina D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) são substâncias que dentre outras funções atuam no sistema antioxidante dos animais, protegendo contra a formação de espécies reativas e promovendo melhora nos índices zootécnicos. Cinco experimentos foram realizados para avaliar o efeito dessas substâncias sobre as variáveis de desempenho produtivo, reprodutivo, de incubação, sobre o estado antioxidante e desempenho de progênie em reprodutores de codornas japonesas. Foram analisados os seguintes tratamentos: dieta basal com 0,3 ppm Se (selenito de sódio, SS); dieta basal sem SS com 0,3 ppm Se (selênio levedura, SeLev); SS+2760 UI 25-hidroxicolecalciferol (VD<sub>3</sub>); SS+ 6 ppm Cx, e; SS+ 6 ppm Cx+2760 UI VD<sub>3</sub> (Cx+VD<sub>3</sub>). No artigo 1, as aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso, com 10 repetições de 5 fêmeas e 2 machos. No Exp. I foram utilizadas as dietas SS, SeLev, Cx e VD<sub>3</sub> e no Exp. II as dietas SS, SeLev e Cx+VD<sub>3</sub>. Em ambos os experimentos foram analisados o desempenho produtivo, a qualidade de ovos e a atividade antioxidante no soro e fígado das matrizes. O desempenho produtivo não foi afetado pelas fontes de antioxidantes inclusas nas dietas nos Exp. I e II, nem a qualidade de ovos no Exp. I. No Exp. II a inclusão de Cx+VD<sub>3</sub> aumentou a espessura da casca e o índice e % gema. Em relação a luminosidade, a intensidade de a\* foi maior nos tratamentos Cx e Cx+VD<sub>3</sub> frente aos demais experimentos. O status antioxidante foi mensurado no soro sanguíneo e tecido hepático de fêmeas e machos e na gema do ovo através da redução dos radicais DPPH e ABTS. A atividade antioxidante aumentou em todos os tecidos nos tratamentos com inclusão de SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> e Cx+VD<sub>3</sub>. A peroxidação lipídica na gema do ovo foi menor no tratamento SeLev) em Exp. I e Exp. II. A atividade da SOD no fígado das matrizes e a expressão gênica do *GPX7* e da *SOD1* na mucosa da vagina não apresentaram efeitos frente a administração de SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> e Cx+VD<sub>3</sub> na dieta. No artigo II foram analisados o desempenho da progênie, a atividade

antioxidante do embrião e do pinto e a interação espermatozoide:ovo nos ovos das matrizes. No Exp. I foram utilizadas as dietas SS, SeLev, Cx e VD<sub>3</sub> e no Exp. II as dietas SS, SeLev e Cx+VD<sub>3</sub>. Nos exp. I e II foram avaliados pintos provenientes das matrizes que receberam as dietas experimentais, distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 20 aves. Em ambos os experimentos os pintos descendentes das matrizes SS apresentaram maior taxa de conversão alimentar e maior consumo de ração nos Exp. I e II. A porcentagem de fertilidade e infertilidade não foram influenciadas pela dieta, mas os tratamentos SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> e Cx+VD<sub>3</sub> apresentaram maiores taxas de eclodibilidade total e eclodibilidade nos ovos férteis. O escore de Pasgar e o peso dos pintos não diferiram entre os tratamentos, mas o comprimento de pintos provenientes de Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> e SeLev foi maior frente os pintos SS (P<0,05). O status antioxidante e a peroxidação lipídica foram mensurados no vitelo e no tecido hepático dos pintos e foram maiores no tecido hepático e vitelo de pintos Cx, VD<sub>3</sub>, SeLev e Cx+VD<sub>3</sub>. O Exp. III o efeito das cinco dietas foram analisadas sobre a fertilidade ao longo dos dias, após a cópula e sobre o número de buracos de hidrólise na membrana perivitelínica dos ovos (PHMP). As variáveis foram analisadas em dez casais/tratamento em três situações: fêmeas com dietas experimentais e machos com dieta basal; fêmeas com dieta basal e machos com dietas experimentais e fêmeas e machos com dietas experimentais. Houve aumento no número de PHMP e na probabilidade de fertilidade quando fêmeas e fêmeas+machos receberam os tratamentos Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> e SeLev, sugerindo efeito maior sobre as fêmeas na manutenção da sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino. Conclui-se que o uso de Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> e de SeLev é recomendado para reprodutores de codornas visto a melhora no status antioxidantes dessas aves, na melhora da eclosão e no aumento do período de sobrevivência dos espermatozoides no genital feminino e os efeitos positivos que eles promovem também em sua progênie.

**Palavras-chave:** Antioxidante; carotenoide; codorna; reprodução; selênio; 25-hidroxicolecalciferol

## ABSTRACT

Selenium (SeLev), canthaxanthin (Cx) and 25-hydroxycholecalciferol ((25OH-D<sub>3</sub>) VD<sub>3</sub>) are substances that, among other functions, act in the antioxidant system of animals, protecting against the formation of reactive species and promoting improvement in performance indices. Five experiments were carried out to evaluate the effect of these substances on productive and reproductive variables, incubation performance in the antioxidant status and progeny performance of Japanese quail breeders. The following treatments were analyzed: control diet with 0.3 ppm Se (sodium selenite, SS); control diet without SS with 0.3 ppm Se (yeast selenium, SeLev); SS+2760 IU 25-hydroxycholecalciferol (VD<sub>3</sub>); SS+ 6 ppm Cx, and SS+ 6 ppm Cx+2760 IU VD<sub>3</sub> (Cx+VD<sub>3</sub>). In article 1, the birds were distributed in a completely randomized design, with 10 replications of 5 females and 2 males. In Exp. I, the diets used were SS, SeLev, Cx and VD<sub>3</sub> in the Exp. II the diets were SS, SeLev and Cx+VD<sub>3</sub>. In both experiments, productive performance, egg quality and antioxidant activity in the serum and liver of the breeders were analyzed. Productive performance was not affected by antioxidants sources included in the diets in Exp. I and II, nor egg quality in Exp. I. In Exp. II, the inclusion of Cx+VD<sub>3</sub> increased the shell thickness and the yolk index and %. In relation to luminosity, the intensity of a\* was higher in the treatments Cx and Cx+VD<sub>3</sub> compared to the others in the two experiments. Antioxidant status was measured in blood serum and liver tissue of females and males and in egg yolks by reducing DPPH and ABTS radicals. Antioxidant activity increased in all tissues in treatments with inclusion of SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> and Cx+VD<sub>3</sub>. The lipid peroxidation in the egg yolk was lower in the SeLev treatment in Exp. I and Exp. II. The activity of SOD in the liver of the matrices and the gene expression of GPX7 and SOD1 in the vagina mucosa did not present effects against the administration of SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> and Cx+VD<sub>3</sub> in the diet. In article II, the progeny performance, the antioxidant activity of the embryo and the chick and the sperm:egg interaction in the eggs



of the breeders were analyzed. In Exp. I the diets SS, SeLev, Cx and VD<sub>3</sub> were used and in Exp. II the diets SS, SeLev and Cx+VD<sub>3</sub> were used. In Exp. I and II, chicks from the breeders that received the experimental diets were evaluated, distributed in a completely randomized design, with four replications of 20 birds. In both experiments, chicks from SS breeders showed higher feed conversion rate and higher feed intake in Exp. I and II. The percentage of fertility and infertility were not influenced by the diet, but the treatments SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> and Cx+VD<sub>3</sub> presented higher total hatchability and hatchability rates in fertile eggs. The Pasgar score and chick weight did not differ between treatments, but the length of chicks from Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> and SeLev was greater compared to SS chicks ( $P < 0,05$ ). Antioxidant status and lipid peroxidation were measured in yolk and liver tissue of chicks and were higher in liver and yolk tissue of Cx, VD<sub>3</sub>, SeLev and Cx+VD<sub>3</sub> chicks. In the Exp. III the effect of the five diets were analyzed on fertility over the days after mating and on the number of hydrolysis holes in the perivitellin membrane of eggs (PHMP). The variables were analyzed in ten pairs/treatment in three situations: females with experimental diets and males with control diets; females on control diet and males on experimental diets and females and males on experimental diets. There was an increase in the number of PHMP and the probability of fertility when females and females+males received treatments Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> and SeLev, suggesting a greater effect on females in maintaining sperm survival in the female genital tract. It is concluded that the use of Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> and SeLev is recommended for quail breeders given the improvement in the antioxidant status of these birds, in the improvement of hatching and in the increase of the sperm survival period in the female genital and the positive effects that they also promote in their progeny.

**Keywords:** Antioxidant; carotenoid; quail; reproduction; selenium; 25-hydroxycholecalciferol.

## I - INTRODUÇÃO

A atividade coturnícola no Brasil tem deixado de ser uma atividade secundária para ser a principal de muitos produtores e de grandes empresas. A criação de codornas segue como o segundo maior rebanho de aves no País tendo somado entre aves com aptidão para ovos e para carne 17,41 milhões de cabeças no ano de 2019 (IBGE, 2020) sendo a maior parte desse plantel destinado, principalmente para a produção de ovos.

Durante toda a vida produtiva, as aves passam por momentos desafiadores capazes de influenciar diretamente seu desempenho produtivo, podendo ser relacionados ao ambiente, alimentação e também causado pelo processo de desenvolvimento embrionário. As reações oxidativas são base de diversas reações bioquímicas naturais do organismo, mas quando há desequilíbrio entre a taxa de produção dessas reações e dos mecanismos antioxidantes que são capazes de neutralizá-las, há a ocorrência de danos oxidativos no organismo animal (Estévez, 2015).

A nutrição tem sido a forma mais efetiva de fornecer proteção antioxidante para o animal, e o grande foco das pesquisas atuais tem sido a busca por substâncias com potencial antioxidante que são capazes de mitigar a formação excessiva de espécies reativas e evitar que o animal tenha seu desempenho prejudicado. Diferentes substâncias antioxidantes têm sido adicionadas a dieta das aves com objetivo de melhorar os parâmetros produtivos e reprodutivos. O uso de vitaminas e minerais na dieta animal é uma prática indispensável para o correto desenvolvimento do animal, e essas substâncias cada vez mais vem tomando espaço na prevenção contra o estresse oxidativo.

A vitamina D<sub>3</sub> tem participação no processo de formação do ovo, e também de calcificação do esqueleto, participa do metabolismo e homeostase do cálcio e da regulação do crescimento ósseo, e favorece o desenvolvimento do embrião, e conseqüentemente melhora as taxas de eclodibilidade e de pintos nascidos vivos (Saunders-Blades e Korver, 2015).

O tecido embrionário é um tecido com grande concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), e a produção de espécies reativas é alta durante esse processo, A cantaxantina auxilia nessa situação por ser uma molécula lipofílica sendo depositada, principalmente na gema do ovo e na pele (Esatbeyoglu e Rimbach, 2017; Surai et al., 2003).

O uso desses dois compostos associados vêm trazendo resultados positivos frente ao desenvolvimento embrionário, parâmetros de qualidade de carcaça, e na modulação antioxidante (Araujo et al., 2019; Bonagurio et al., 2020; Bonamigo et al., 2022).

O selênio atua na defesa antioxidante como o principal mineral com essa função, tendo efeito em todas as fases de desenvolvimento das aves já que participa da síntese de diversas selenoproteínas. Sua forma de atuação e eficiência dependem da fonte de selênio suplementada na dieta (Surai et al., 2018; Surai e Kochish, 2019). O selênio orgânico tem apresentado incremento na atividade de enzimas antioxidantes na matriz e na progênie, persistindo por até 4 semanas no músculo peitoral e diminuindo a oxidação lipídica (Pappas et al., 2006; Surai, 2000).

O uso de codornas como modelo animal em pesquisas tem se tornado um atrativo frente ao uso de frangos e galinhas poedeiras, já que seu material genético tem cerca de 95% de similaridade, permitindo a aplicação dos resultados das pesquisas a ambos, e também por atingirem a maturidade sexual com aproximadamente seis semanas de vida, permitindo a obtenção de até seis gerações por ano (Serralbo et al., 2020).

Frente a importância do processo de incubação para o desenvolvimento animal pós-eclosão e ao longo de sua vida produtiva, e também da necessidade de elucidar de como a dieta dos genitores influencia nesse desenvolvimento, é necessário a busca por estratégias nutricionais que possam auxiliar de maneira positiva todo esse período. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o uso de cantaxantina, selênio orgânico levedura e vitamina D<sub>3</sub> na dieta de reprodutores de codornas japonesas, sobre o desempenho produtivo, a qualidade de ovos, o desempenho de incubação e da progênie e sobre as variáveis de bioquímica sérica e antioxidantes.

## 1. Coturnicultura

Dentre as espécies difundidas na avicultura as codornas desde sua introdução como aves de produção chamaram atenção pela sua facilidade de manejo e produção. Diferentemente da produção de frangos de corte e galinhas poedeiras que necessitam de grandes espaços e investimentos, a produção de codornas pode ser tecnificada com menor

investimento, já que dentre suas características o seu tamanho resulta em menos espaço para maior contingente de aves, menor consumo de ração, precocidade produtiva e reprodutiva e longevidade (Pinto et al., 2002).

As codornas pertencem à ordem *Galliformes* e à família *Phasianidae*. Apesar de muito parecidas, a codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) é considerada uma espécie separada da codorna comum (*Coturnix coturnix coturnix*). Por centenas de anos, as codornas foram criadas no Japão visando seu comércio para o canto e mais tarde foram introduzidas na China, Coreia, Taiwan, Hong Kong e Indochina. Durante os anos 1900, os japoneses criaram codornas para a produção de ovos e carne. Embora muitas dessas linhas comerciais tenham sido perdidas durante a Segunda Guerra Mundial, novas cepas foram eventualmente restabelecidas. Todas as linhagens domésticas, atualmente são derivadas de populações do pós-guerra (Huss et al., 2008; Tavaniello, 2013).

O Brasil possui importante efetivo de codornas e se destaca no cenário mundial em relação a criação tanto para ovos quanto para corte. As codornas japonesas são as mais exploradas para a produção de ovos, por apresentarem precocidade produtiva, iniciando a postura em média 35-42 dias de idade e pequeno porte (em média 132g), demandando menor quantidade de ração e possibilitando menor quantidade de espaço, mas com grande número de animais. As codornas utilizadas para corte possuem peso aproximado de 320 gramas, e podem ser abatidos aos 35 dias de idade, com rendimento de carcaça médio de 75%. Para ambas as espécies, o desenvolvimento embrionário que dura entre 17 e 18 dias até a eclosão e possui resistência maior que outras aves durante o desenvolvimento.

Assim, o uso de codornas como modelo animal apresenta vantagens, além de serem filogeneticamente parecidas com os frangos de corte e estudos indicarem que seus genomas são homólogos (Baumgartner et al., 1994; Kayang et al., 2004; Tavaniello, 2013), possibilitando a realização de pesquisas que possam ser extrapoladas, ou sirvam como base para outras espécies avícolas.

## 2. Estresse oxidativo e sistema antioxidante

### 2.1 Oxidação e formação de radicais livres

A oxidação é parte fundamental de organismos vivos sob condições aeróbias, assim a produção dos radicais livres ocorre naturalmente ou como resultado de alguma disfunção biológica, sendo que as principais espécies reativas são o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (Ray et al., 2012). O excesso de radicais

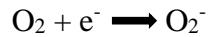
livres será combatido e eliminado por meio de substâncias antioxidantes que podem ser enzimáticas, estando inclusas nestas categorias superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, e não enzimáticas podendo ser citadas algumas vitaminas, como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), carotenoides e aminoácidos como a metionina. O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio da produção de radicais livres e sua eliminação pelo sistema antioxidante.

A formação das espécies reativas inicia na mitocôndria, com a redução do oxigênio, havendo a aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, sendo a enzima citocromo oxidase a catalisadora dessa reação. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo C removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao  $O_2$  para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (Ott et al., 2007). No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres. Sabe-se também que outros complexos e enzimas também podem ser formadores de espécies reativas como o complexo da xantina oxidase (Lushchak, 2014).

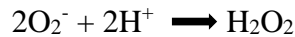
O principal problema dos radicais livres formados são as moléculas nas quais eles irão se ligar para parelhar seus elétrons. A fonte mais importante de alterações mutagênicas no DNA é o dano oxidativo. Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e radicais superóxidos, surgem durante irradiação ou como um subproduto do metabolismo aeróbio. Dessas espécies, os radicais hidroxila são responsáveis pela maioria dos danos oxidativos no DNA, pois ao se ligarem a essas moléculas podem causar danos nucleares nas mitocôndrias e nos cloroplastos causando efeitos deletérios na síntese de bases do DNA, levando ao mau funcionamento ou inativação da célula (Nelson e Cox, 2013; Sharma et al., 2012).

## 2.2 Defesa antioxidante

Dentre as substâncias enzimáticas, a superóxido dismutase (SOD) é a enzima responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em espécies menos reativas como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A formação do ânion superóxido envolve o oxigênio com dois elétrons desemparelhados que se ligam a outra molécula compartilhadora de elétron:



A dismutação é o processo pelo qual esse radical óxido ao receber íons hidrogênio, resultará no composto de peróxido de hidrogênio, e esse composto será reduzido pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx):



Assim, essas enzimas atuam como a primeira linha de defesa antioxidante do organismo, auxiliando no basal da produção de radicais livres. O resultado da ação dessas enzimas serão moléculas inócuas como oxigênio e água (Aslani e Ghobadi, 2016) (Figura 1).

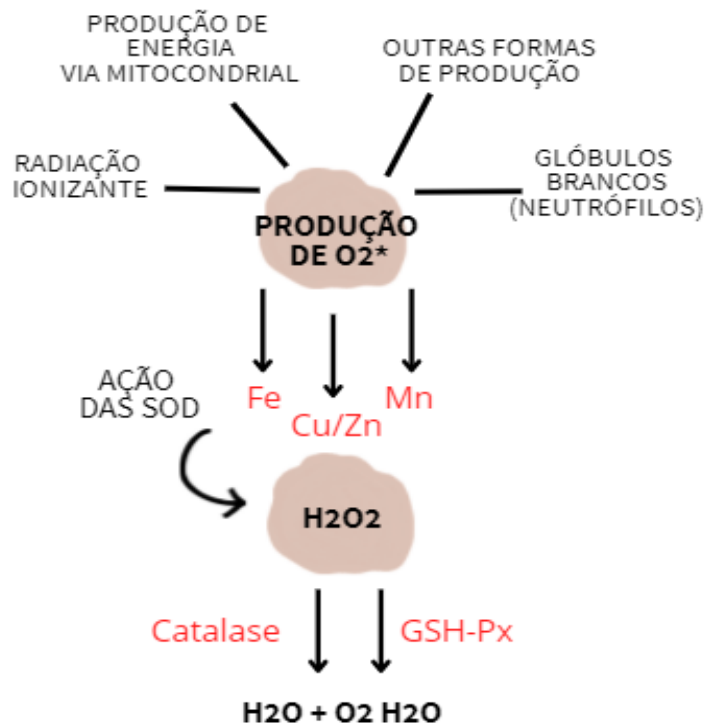
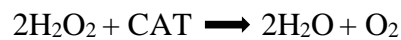


Figura 1. Defesa antioxidante de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Ighodaro e Akinloye (2017).

Pode-se entender então que o principal papel das SODs é impedir o acúmulo de ânion superóxido (Schieber e Chandel, 2014). Essa classe de enzimas pode ser dividida em duas sendo que ambas são metaloenzimas dependendo de metais para sua conformação sendo: SOD1 que contém em seu sítio ativo os minerais cobre e zinco, e está localizada principalmente no espaço intermembranoso do citosol e na mitocôndria, e a SOD2 que se localiza na matriz mitocondrial, sendo essa enzima uma SOD dependente de manganês, sabe-se que a cadeia respiratória nas mitocôndrias é grande formadora de

superóxido de oxigênio (Halliwell, 1994; Nanduri et al., 2013; Ray et al., 2012). Existe ainda uma SOD3 dependente de Ferro que é encontrada em plantas.

A enzima glutatona peroxidase (GPx) atua principalmente nas mitocôndrias e citosol, também é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio, usando selênio como cofator (Ighodaro e Akinloye, 2017). Embora GPX e CAT compartilhem do mesmo substrato, isoladamente a GPx pode reagir eficazmente com lipídios e outros hidroperóxidos orgânicos, sendo a principal fonte de proteção contra os baixos níveis de estresse oxidativo.

### 3. Uso de substâncias com potencial antioxidante na produção avícola

#### 3.1 Selênio

Os primeiros estudos sobre fontes de minerais para rações datam da década de 1950, quando se iniciou a suplementação mineral para resolver problemas ósseos e de desempenho das aves. Um dos minerais mais estudados na produção avícola é o selênio (Se), que começou a ser suplementado na dieta dos animais na década de 1960 (Bertechini, 2006; Surai, 2006).

O Se é encontrado nas formas orgânicas e inorgânicas. O inorgânico se apresenta como dois compostos: selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) e selenato ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ). Apesar de ambas serem absorvidos de forma eficiente, a absorção do selenato depende de sua redução para selenito antes de ser metabolizado, e esse processo faz com que ocorram perdas significativas via urina, fazendo com que seja priorizado o uso do selenito nas dietas (Faulks e Southon, 1993; Faulks e Southon, 2005).

O Se orgânico é obtido através da fermentação de leveduras (geralmente de alguma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*) enriquecida com o Se pelo processo de biossíntese. As semelhanças químicas entre o enxofre e o Se levam a levedura, assim como as plantas, a incorporar o Se no lugar do enxofre durante a formação das proteínas, principalmente se estão envolvidos aminoácidos sulfurados como metionina, formando as selenoproteínas, entre elas selenometionina, e selenocisteína. Assim, as duas principais formas desse micromineral na alimentação das aves é na forma inorgânica e a orgânica (Surai et al., 2018).

O intestino delgado é o principal local de absorção do Se da dieta, cerca de 80% do Se ingerido. Acredita-se que o selenito seja absorvido passivamente, enquanto o selenato

pode usar mecanismos de absorção junto com sódio e a absorção do Se orgânico ocorra da mesma forma que a absorção da metionina (Surai, 2006).

O Se está envolvido na atividade de diversas enzimas que atuam na defesa antioxidante como a glutatona peroxidase (GSH-Px), que catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio, e a superóxido dismutase (SOD), que é a responsável pela dismutação do ânion superóxido, e é constituinte de diversas selenoproteínas como catalase e glutatona (Han et al., 2017; Surai et al., 2019).

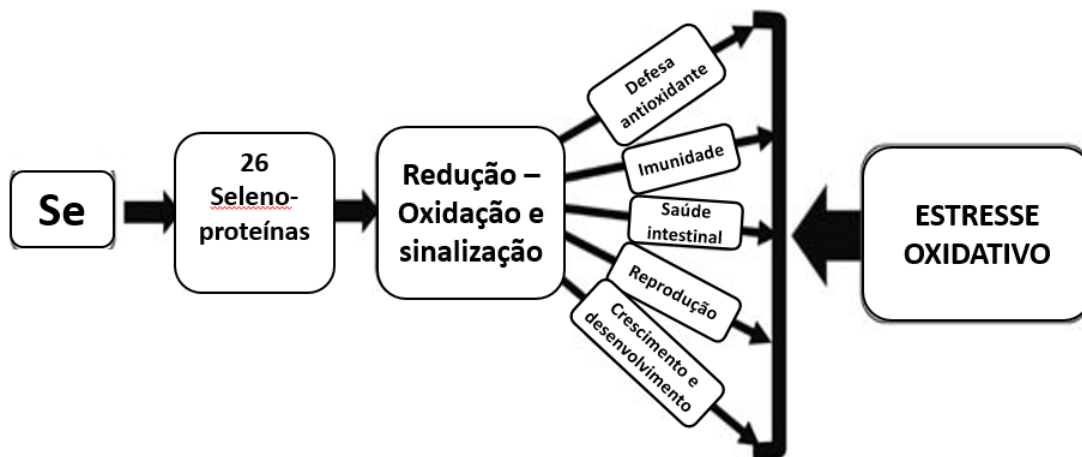


Figura 2. Efeito protetor do Se em aves. Fonte: Adaptado de Surai et al., (2018).

A transferência do Se nas aves reprodutoras para a gema do ovo já é documentada, com melhorias nos índices de eclodibilidade e fertilidade (Surai et al., 2018; Wan et al., 2019). Durante a incubação, o Se é transferido do ovo para os tecidos embrionários e no fígado dos pintinhos recém-nascidos. A concentração de Se no fígado de pintos de 1 dia de idade aumentou de 0,38 mg / kg no grupo controle alimentado com dieta comercial até 0,73 e 1,4 mg / kg nos grupos em que as mães foram suplementadas, também foi constatado aumento significativo da atividade GSH-Px no fígado dos pintos e essa diferença permaneceu significativa 5 dias após a eclosão (Surai, 2000).

O Se também atua na manutenção do sistema reprodutivo, e seu papel como antioxidante é importante para manter a integridade da membrana espermática e suas propriedades fisiológicas necessárias para a fertilização e motilidade dos espermatozoides (Khalid et al., 2016; Surai et al., 2016). A integridade da membrana promove melhoria no processo de criopreservação do sêmen como foi observado no estudo de Chauychnoo et al., (2021) que suplementaram a dieta de galos 0,3, 0,6 e 0,9 ppm de Se, após criopreservação e descongelamento do sêmen, encontraram melhoras na viabilidade



espermática e morfologia dos espermatozoides independentemente do nível de suplementação.

### 3.2 Vitamina D

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel, associada estritamente com a luz solar, visto que a exposição periódica pode eliminar sua exigência dietética. As duas principais formas são o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>, fonte para os animais) e ergocalciferol ou vitamina D<sub>2</sub> que ocorre predominantemente em plantas. Os animais podem obter a vitamina D<sub>3</sub> a partir da conversão do 7-desidrocolesterol a colecalciferol na pele ou a partir do recebimento pela dieta (Nelson e Cox, 2013).

Os metabólitos são formas inativadas de vitamina D, sendo necessária a conversão a um metabólito ativo para que seja disponibilizada ao organismo. A formação do primeiro metabólito, ocorre a partir de uma hidroxilação que ocorre no fígado, e nesse processo é adicionada uma hidroxila na posição do carbono 25 da cadeia lateral, resultando no primeiro metabólito ativo, o 25 hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>). Este composto ainda necessita de mais uma hidroxilação, que ocorre no rim, no seu carbono 1 resultando no hormônio ativo, 1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Bender, 2003; Jones et al., 1998).

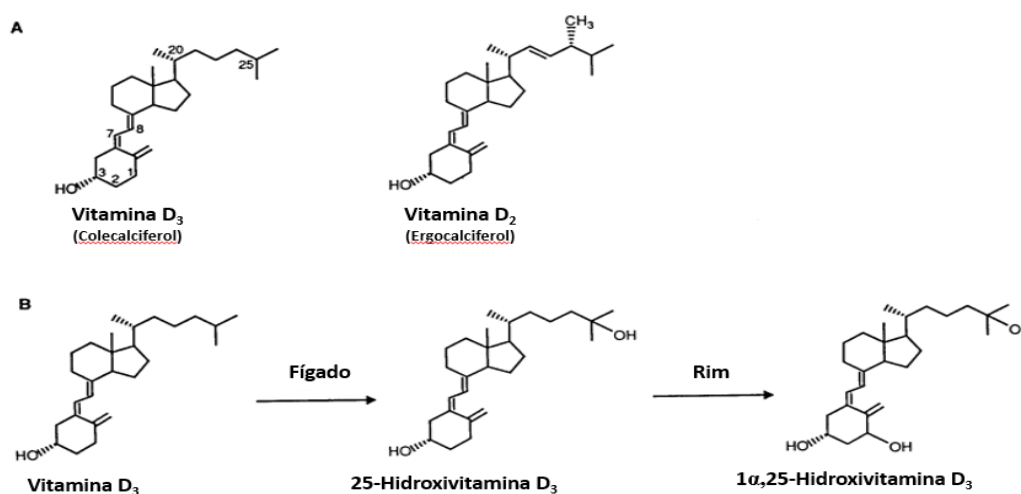


Figura 3. Formas nutricionais e pós-hidroxilações da vitamina D. (A) Formas de vitamina D obtidas nutricionalmente, (B) Passos envolvidos até a forma ativa da vitamina D. Fonte: Adaptado de Jones et al., 1998.

A suplementação com o metabólito intermediário 25(OH)D<sub>3</sub> traz para o animal uma redução nesse processo de hidroxilação da vitamina, aumentando a concentração de vitamina D<sub>3</sub> estocada no organismo e que está mais disponível em casos de necessidade,

visto que esse composto é duas vezes melhor absorvido que as outras formas de vitamina D, possui meia vida mais longa, além de dispensar a hidroxilação hepática que seus precursores necessitam. Estudos sugerem que a atividade deste metabólito pode ser até cinco vezes mais eficiente que sua forma inativa (Mattila et al., 2011; Sun et al., 2012).

Além do conhecimento do envolvimento desta vitamina no metabolismo ósseo, como reguladora dos níveis de cálcio e fósforo tanto sérico como extracelular, age na absorção desses minerais e também atua regulando a ação do paratormônio no organismo, como consequência dessa atividade sua função também influencia diretamente o processo de formação da casca do ovo e sua qualidade (Garcia et al., 2013; Han et al., 2012).

A função principal do  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nos vertebrados, é auxiliar na formação do osso e da casca do ovo, pois está intimamente ligada a regulação da homeostase do cálcio e do fósforo no corpo, influenciando a absorção intestinal e renal (Fritts e Waldroup, 2005; Wen et al., 2019) através de um *feedback* de inibição da produção do hormônio PTH nas glândulas paratireoides. A ativação da vitamina  $\text{D}_3$  também é dependente das concentrações plasmáticas de cálcio. Quando a concentração do mineral é baixa, a  $1\alpha$ -hidroxilase renal é ativada e a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é sintetizada. Se a concentração de cálcio é adequada,  $25(\text{OH})\text{D}_3$  sofre 24-hidroxilação para o metabólito inativo  $25,24(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Jones et al., 1998; Proszkowiec-Weglarz e Angel, 2013).

Com maior taxa de vitamina  $\text{D}_3$  no organismo, conseqüentemente há maior deposição de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  no ovo e em tecidos. Essa deposição favorece o desenvolvimento do embrião, pois a dieta materna é responsável pela composição nutricional do ovo. Sendo assim, no embrião de aves esses nutrientes serão utilizados durante a formação embrionária, resultando em melhores índices de eclosão (Atencio et al., 2006; Mattila et al., 2011), e conseqüentemente melhor qualidade dos pintainhos ao nascimento. No primeiro dia pós-eclosão o rim é o órgão que apresenta as maiores quantidades de RNAm de  $1\alpha$ -hidroxilase que é a enzima responsável pela hidroxilação da forma  $25$ -hidroxicolecalciferol para  $1,25$ -diidroxicolecalciferol, a forma biologicamente ativa, apresentando concentração aproximadamente 70 vezes superior ao fígado em frangos (Shanmugasundaram e Selvaraj, 2012).

Estudos com a suplementação do metabólito  $25\text{-OHD}$  ou  $25(\text{OH})\text{D}_3$  na dieta de matrizes de corte avaliando os efeitos isoladamente e frente dieta controle, observaram redução da mortalidade embrionária durante todo o período de incubação quando as reprodutoras foram suplementadas com  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (Saunders-Blades e Korver, 2015).

Além desses papéis na reprodução e metabolismo ósseo, hipóteses apontam que a vitamina D<sub>3</sub> estaria envolvida no desenvolvimento dos neurônios em humanos (Eyles et al., 2014; Naveilhan et al., 1996) visto a presença das enzimas e receptores necessários para síntese de seu metabólito ativo estarem presentes no cérebro (Zehnder et al., 2001). Em mamíferos, a ação da vitamina D sobre o sistema imune vem sendo elucidada, e com base nesses estudos têm-se extrapolado a atividade da vitamina para as espécies aviárias, já que os trabalhos ainda são escassos. A difusão passiva é o principal mecanismo pelo qual as células do sistema imunológico adquirem vitamina D<sub>3</sub>. Após a entrada, a vitamina D<sub>3</sub> se liga ao seu receptor nuclear, o receptor da vitamina D (VDR), que possui ampla atividade modulatória nas células do sistema imunológico (Shojadoost et al., 2021). Em humanos, a expressão do receptor VDR vem sendo associada a prevenção de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças renais, por haver evidências sobre a capacidade de induzir a expressão de moléculas envolvidas no sistema de defesa antioxidante como a GSH-Px e a SOD (Mokhtari et al., 2017).

Em aves pesquisas mostram também sua importância para o sistema imune, como foi constatado por Zhang et al. (2016) ao conduzirem um estudo *in vitro* e encontrarem evidências que o metabólito 1,25(OH)D<sub>3</sub> foi capaz de induzir a expressão dos genes da β-defensina aviária. Esses genes fazem parte dos peptídeos de defesa do hospedeiro, e possuem grande importância pela sua capacidade de aumentar a imunidade e a resistência a doenças na produção animal, sua expressão poderia contribuir consideravelmente para a diminuição no uso de antibióticos na produção de aves (Saunders-Blades e Korver, 2015; Shojadoost et al., 2015).

### 3.3 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentantes naturais e responsáveis por variada gama de colorações de flores, frutas, vegetais, penas de animais, entre outros. Por não serem capazes de sintetizar esses compostos, as espécies animais necessitam que a dieta forneça esses pigmentos (Williams et al., 1998). A importância dos carotenoides vai além da simples pigmentação da carne ou ovo, e a suplementação vem sendo objeto de estudo a algum tempo, apresentam diversas funções e atividades biológicas, como a atividade pró-vitamina A, capacidade antioxidante e reforço do sistema imunológico.

Por serem compostos lipofílicos para o processo de digestão e absorção, primeiramente os carotenoides passam por solubilização com a matriz alimentar, e em seguida são incorporados nas micelas, que são as responsáveis por transportar as

moléculas lipossolúveis tornando-as potencialmente acessíveis pelo epitélio intestinal (Fernández-García et al., 2012).

Uma vez que o material lipídico é internalizado pelas células a partir da difusão facilitada, é então compactado nos quilomícos. Os quilomícos são excretados e eventualmente absorvidos pelo fígado, e são armazenados ou reexcretados para a circulação em lipoproteínas (Fernández-García et al., 2012; Karadas et al., 2005; Williams et al., 1998). Carotenoides mais polares, como a cantaxantina, são transportados por partículas de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) (Faulks e Southon, 2005).

### 3.3.1 Cantaxantina

Dentre os mais de 600 carotenoides existentes na natureza, a cantaxantina é um dos principais encontrados no milho, mas sua suplementação tem sido obtida, principalmente de fontes sintéticas. Além de ser pigmentante, esse composto também é importante antioxidante lipossolúvel, sendo um atenuante físico das espécies reativas em excesso (Bohm et al., 1997; Rosa et al., 2012). A cantaxantina se enquadra como o segundo carotenoide com alta capacidade de remoção dos radicais óxido ( $O^{\cdot-}$ ), que são espécies reativas e são envolvidas no processo de iniciação ou progressão da oxidação (Fontana et al., 2000).

O aumento da concentração de cantaxantina nos tecidos embrionários está associado ao aumento da resistência ao estresse oxidativo (Surai, 2012). A reação de radicais livres com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) inicia um processo conhecido como peroxidação lipídica em sistemas vivos e rancidez oxidativa em alimentos. Essa categoria de ácidos graxos é mais suscetível à oxidação, resultando na formação de produtos tóxicos. Os tecidos embrionários possuem altas concentrações desses ácidos graxos, e por isso, a dieta da matriz pode modular o estado oxidativo do pinto (Rocha et al., 2010). Zhang et al, (2011) dividiram reprodutoras de corte em dois grupos, um que recebia uma dieta basal sem suplementação de cantaxantina e o outro com suplementação antioxidante, os autores relataram que os ovos das galinhas do grupo cantaxantina apresentaram melhor status antioxidante, observado pelo aumento significativo da capacidade antioxidante sérica total e pela diminuição do malonaldeído (principal produto formado durante a peroxidação lipídica), esse resultado persistiu no embrião e no dia 7 após eclosão os níveis de malonaldeído ainda eram significativamente menores nos pintos do tratamento com cantaxantina em relação ao grupo controle.

A cantaxantina pode ter efeito protetor da vitamina E na gema do ovo e, assim, ser transferida para o embrião, como evidenciou Surai et al. (2003) que ao utilizar níveis de cantaxantina na dieta de matrizes e avaliar seu efeito sobre o sistema antioxidante do embrião e pinto, verificaram aumento nos níveis de cantaxantina na gema do ovo, no fígado e saco vitelínico dos pintos e embriões, e ainda a cantaxantina apresentou efeito protetor sob a concentração da vitamina E, aumentando sua transferência para a gema do ovo.

#### 3.4 Associação de Vitamina D e Cantaxantina

A cantaxantina e o metabólito 25(OH)D<sub>3</sub> são nutrientes utilizados na produção avícola e sua associação vem sendo comumente usada pela deposição que ambos têm na gema do ovo, visando aumentar a proteção antioxidante para o embrião durante a incubação dos ovos (Karadas et al., 2005; Saunders-Blades e Korver, 2015).

Pesquisas vêm mostrando resultados satisfatórios para a progênie de aves que receberam essa associação, melhor conversão alimentar e maior ganho de peso da progênie, proveniente de matrizes de corte alimentadas com cantaxantina + 25(OH)D<sub>3</sub>, foram relatados por Araujo et al. (2019). Ainda, a continuação da suplementação a um grupo de frangos pós-eclosão promoveu melhores resultados do que os que só receberam a cantaxantina+ vitamina D<sub>3</sub> materna.

Outras espécies aviárias também têm apresentado resultados promissores em sua progênie, como é o caso do estudo envolvendo patos provenientes da incubação de ovos de matrizes que receberam vitamina D<sub>3</sub> + cantaxantina na dieta. O status antioxidante foi aumentado até aos 14 dias de idade, e os níveis de malonaldeído (indicador de peroxidação lipídica) foram menores aos 1 e 7 dias de vida (Ren et al., 2016). Na dieta de reprodutores de codornas europeias, Bonagurio et al. (2020) encontraram menores concentrações de MDA no soro sanguíneo e no tecido hepático de codornas europeias.

Mesmo em associação, as principais ações isoladas continuam predominantes, mostrando que pode não haver competição entre as duas substâncias quando combinadas, como visto no aumento da pigmentação de gema de ovo e da canela de aves como resultado da ação da cantaxantina, e na espessura da casca do ovo e na qualidade óssea ação da vitamina D (Araujo et al., 2019; Bonagurio et al., 2020; Ren et al., 2016).

#### 4. Antioxidantes sobre os aspectos reprodutivos das aves

##### 4.1 Matrizes

Quando se aborda o metabolismo da fêmea o principal produto obtido é ovo que será utilizado para consumo ou como futuro embrião, e como as condições de produção podem variar a cada localidade de produção, avaliar parâmetros de qualidade do ovo é de fundamental importância.

A casca é a barreira física entre o conteúdo do ovo e o meio externo e sua qualidade é fundamental para a proteção e bom desenvolvimento do embrião. A suplementação com Se levedura pode afetar positivamente o peso da casca, a espessura da casca e a unidade Haugh em comparação com a suplementação com selenito na dieta das reprodutoras quando os ovos são submetidos a prolongado tempo de armazenagem (Baylan et al., 2011), também há documentado evidências de que melhora a taxa de postura (Han et al., 2017).

Matrizes de corte ou postura, necessitam de dieta adequada para que os parâmetros reprodutivos sejam assegurados, a 25(OH)D<sub>3</sub> é um suplemento anti-hipertensivo eficaz para aliviar a patogênese cardíaca e melhorar a habitabilidade em galinhas reprodutoras, pela expressão do receptor de vitamina D que atua na inibição da expressão do gene da renina que está relacionado a essa cardiopatia (Yeh et al., 2020). O metabólito intermediário da vitamina D<sub>3</sub> também é o responsável pela indução dos genes da calbindina no intestino delgado e na glândula da casca, e aves deficientes nessa vitamina possuem menor expressão desse gene, que resulta em dificuldades no metabolismo do cálcio e conseqüentemente na calcificação da casca (Striem e Bar, 1991).

A expressão de genes relacionados a proteção do estresse oxidativo foi observada na mucosa da vagina de fêmeas de codornas europeias Bonagurio et al., (2020), assim como redução na concentração de MDA no tecido hepático medido pelo ensaio de TBARS. Essas respostas são importantes para auxiliar na elucidação de como os espermatozoides são protegidos do dano oxidativo enquanto estão armazenados no trato reprodutivo.

A capacidade antioxidante do ferro, ou capacidade antioxidante total, foi melhor em matrizes que receberam cantaxantina na dieta (6 mg) e nos ovos oriundos dessas mesmas matrizes, além de melhores resultados para capacidade antioxidante total, também agiu diminuindo a concentração de malondialdeído (Zhang et al., 2011).

## 4.2 Reprodutores

Os espermatozoides possuem grande concentração de PUFA em sua composição, e dessa forma são susceptíveis ao dano oxidativo durante o manuseio no caso de congelamento para uso em inseminação artificial. A suplementação de 0,6 e 0,9 ppm de Se orgânico por kg de dieta para machos de frangos de corte promoveram melhora na viabilidade e morfologia dos espermatozoides *in natura*, e também após o descongelamento por criopreservação (Chauychu-noo et al., 2021).

O Se é um elemento essencial para a espermatogênese, pois participa da formação de selenoproteínas envolvidas na manutenção da integridade da membrana espermática, e dessa forma a deficiência de Se diminui o número de espermatozoides por ejaculação e a motilidade. Esses efeitos podem ser intensificados caso os animais estejam passando por momentos de desafio, a suplementação com 0,3 mg de Se levedura na dieta de galos reduz a concentração de TBARS no líquido seminal, melhorando a motilidade e diminuindo a porcentagem de espermatozoides mortos quando os galos estavam em estresse por calor (Ebeid, 2009).

A diminuição na concentração de MDA no tecido hepático de machos reprodutores de codornas europeias, e a alta capacidade de eliminação de radicais medidos pelo ensaio de DPPH no tecido hepático e soro sanguíneo propõem evidências de que a suplementação de Cx e 25OHD<sub>3</sub> possam atuar melhorando o estado antioxidante, também referente a viabilidade seminal e aumento da fertilidade dos machos (Bonagurio et al., 2020).

## 4.3 Desenvolvimento embrionário

Os nutrientes do desenvolvimento do embrião são obtidos do conteúdo da gema e albúmen durante o período de incubação, e dependem fortemente do fornecimento de nutrientes que são provenientes da dieta da galinha e de seu metabolismo. Tecidos de embriões contêm alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados. Por esse motivo são altamente sensíveis à peroxidação lipídica e precisam de defesa antioxidante adequada (Surai e Fisinin, 2014).

No caso do Se, a reserva encontrada no soro e nos tecidos da progênie é significativamente maior quando as mães recebem alguma fonte de Se orgânico na dieta, sendo depositado principalmente no fígado, rim e músculos, e também no cérebro (Surai et al., 2007; Zhang et al., 2014).

A forma da vitamina D depositada na gema é a 25(OH)D<sub>3</sub>, possivelmente porque é mais estável e dessa forma é utilizada mais efetivamente pelo embrião. A cantaxantina como outros carotenoides, é parte do sistema antioxidante e muitas vezes por atuar com outras substâncias e os resultados positivos podem ser atribuídos a interação (Surai et al., 2003). A suplementação materna com cantaxantina associada a vitamina D<sub>3</sub> promoveu maior capacidade antioxidante no fígado e resíduo do saco vitelínico em patos de 1 dia de idade (Ren et al., 2016).

Isoladamente, a suplementação de cantaxantina na dieta das mães com 6 ou 12 mg de cantaxantina/kg de ração, promoveu aumento na concentração de vitamina E no fígado de pintos de 1 dia de idade, persistindo até o sétimo dia pós-nascimento. Esse resultado apontando a ação protetora da cantaxantina sobre a vitamina E no tecido hepático pode ser atribuído a diminuição na susceptibilidade de peroxidação lipídica no tecido de pintos (Surai et al., 2003). No estudo de Zhang et al. (2011) o efeito da suplementação de cantaxantina na dieta materna persistiu até aos 21 dias de vida dos pintos, reduzindo a taxa de mortalidade em 4% frente animais descendentes de aves que recebiam tratamento comercial. Mesmo com bons resultados em alguns estudos, é importante ressaltar que a inclusão excessiva de cantaxantina para os pintos pode resultar em efeito contrário do esperado, sendo usada em altas concentrações ela pode atuar como pró-oxidante. Mesmo promovendo melhora no status antioxidante dos pintos, a inoculação de 0,45 mg de cantaxantina *in ovo*, diminuiu a viabilidade dos pintos de 1 a 14 dias de idade, reduziu o consumo de ração e o ganho de peso (Araújo et al., 2020).

A injeção *in ovo* é amplamente usada na indústria avícola comercial pois permite a administração direta de determinados nutrientes ou vacinas, sendo menos estressante para o embrião. A diminuição da mortalidade embrionária e melhora do desempenho inicial de frangos após a eclosão são relatados com a injeção de 2,4 µg de 25(OH)D<sub>3</sub> (Fatemi et al., 2021). A injeção *in ovo* de 20 µg de selenito de sódio mostrou ser benéfica para aves que ao nascerem foram expostas a *Eimeria* e *Clostridium*, o mesmo grupo também apresentou maior ganho de peso frente as aves que não receberam a suplementação, além disso a atividade de enzimas como catalase e superóxido dismutase foram reduzidos no grupo de 10 e 20 µg de Se e os níveis de malondialdeído foram reduzidos no grupo de 20 µg de Se (Lee et al., 2014).

Baseado nos achados da literatura, percebe-se que por mais que sejam foco de muitos estudos as substâncias antioxidantes ainda são amplo campo de pesquisa e muito deve ser elucidado para minimizar os efeitos das espécies reativas e dessa forma melhorar



os ganhos produtivos e reprodutivos, principalmente quando se trata de codornas que mesmo com a expansão da atividade ainda carece de trabalhos que abranjam essa categoria de aves.

## Referências

- Araujo, L.F., Araujo, C.S.S., Pereira, R.J.G., Bittencourt, L.C., Silva, C.C., Cisneros, F., Hermes, R.G., Sartore, Y.G.A., Dias, M.T., 2019. The dietary supplementation of canthaxanthin in combination with 25OHD3 results in reproductive, performance, and progeny quality gains in broiler breeders. *Poult. Sci.* 98, 5801–5808. <https://doi.org/10.3382/ps/pez377>
- Atencio, A., Edwards, H.M., Pesti, G.M., Ware, G.O., 2006. The vitamin D3 requirement of broiler breeders. *Poult. Sci.* 85, 674–692. <https://doi.org/10.1093/ps/85.4.674>
- Baumgartner J., 1994. Japanese quail production, breeding and genetics. *W. Poult. Sci. Jour.* 50, 227–35
- Baylan, M., Canogullari, S., Ayasan, T., Copur, G., 2011. Effects of dietary selenium source, storage time, and temperature on the quality of quail eggs. *Biol. Trace Elem. Res.* 143, 957–964. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8912-x>
- Bender, D.A., 2003. *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, 2<sup>a</sup> edition. ed. Cambridge, New York.
- Bohm, F., Edge, R., Land, E.J., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 621–622. <https://doi.org/10.1021/ja962512c>
- Bonagurio, L.P., Cruz, F.K., Kaneko, I.N., Matumoto-Pintro, P.T., Murakami, A.E., Santos, T.C., 2020. Dietary supplementation with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol has beneficial effects on bone and oxidative metabolism in European quail breeders. *Poult. Sci.* 99, 4874–4883. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.021>
- Bonamigo, D.V., Rosa, A.P., Paixão, S.J., Stefanello, F.S., Londero, A., Mariani, A.B., Bittencourt, L.C., 2022. Performance, carcass yield and cuts of male broilers fed with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol in the diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 283, 115173. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115173>

- Chauychu-noo, N., Thananurak, P., Boonkum, W., Vongpralub, T., Chankitisakul, V., 2021. Effect of organic selenium dietary supplementation on quality and fertility of cryopreserved chicken sperm. *Cryobiology* 98, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.008>
- Ebeid, T.A., 2009. Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. *Br. Poult. Sci.* 50, 641–647. <https://doi.org/10.1080/00071660903303415>
- Esatbeyoglu, T., Rimbach, G., 2017. Canthaxanthin: From molecule to function. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1–49. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600469>
- Estévez, M., 2015. Oxidative damage to poultry: From farm to fork. *Poult. Sci.* 94, 1368–1378. <https://doi.org/10.3382/ps/pev094>
- Eyles, D.W., Liu, P.Y., Josh, P., Cui, X., 2014. Intracellular distribution of the vitamin D receptor in the brain: Comparison with classic target tissues and redistribution with development. *Neuroscience* 268, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.042>
- Fatemi, S.A., Alqhtani, A.H., Elliott, K.E.C., Bello, A., Levy, A.W., Peebles, E.D., 2021. Improvement in the performance and inflammatory reaction of Ross 708 broilers in response to the in ovo injection of 25-hydroxyvitamin D3. *Poult. Sci.* 100, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.010>
- Faulks, R.M., Southon, S., 2005. Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1740, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.11.012>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., Hornero-Méndez, D., 2012. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res. Int.* 46, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.007>
- Fritts, C.A., Waldroup, P.W., 2005. Comparison of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in broiler diets designed to minimize phosphorus excretion. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 156–166. <https://doi.org/10.1093/japr/14.1.156>
- Garcia, A.F.Q.M., Murakami, A.E., Do Amaral Duarte, C.R., Rojas, I.C.O., Picoli, K.P.,

- Puzotti, M.M., 2013. Use of vitamin D3 and its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 26, 408–415. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12455>
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X)
- Han, J.C., Wang, Y.L., Qu, H.X., Liang, F., Zhang, J.L., Shi, C.X., Zhang, X.L., Li, L., Xie, Q., Wang, C.L., Yan, Y.Y., Dong, X.S., Cheng, Y.H., 2012. One alpha-hydroxycholecalciferol improves growth performance, tibia quality, and meat color of broilers fed calcium- and phosphorus-deficient diets. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25, 267–271. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11320>
- Han, X.J., Qin, P., Li, W.X., Ma, Q.G., Ji, C., Zhang, J.Y., Zhao, L.H., 2017. Effect of sodium selenite and selenium yeast on performance, egg quality, antioxidant capacity, and selenium deposition of laying hens. *Poult. Sci.* 96, 3973–3980. <https://doi.org/10.3382/ps/pex216>
- Huss, D., Poynter, G., Lansford, R., 2008. Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *Lab Anim* 37, 513-513. <https://doi.org/10.1038/labani108-513>
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jones, G., Strugnell, S.A., DeLuca, H.F., 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* 78, 1193–1231. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1193>
- Karadas, F., Pappas, A.C., Surai, P.F., Speake, B.K., 2005. Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken 141, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.04.001>
- Kayang, B.B., Vignal, A., Inoue-Murayama, M., Miwa, M., Monvoisin, J.L., Ito, S., Minvielle, F., 2004. A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Anim. Genet.* 35, 195–200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01135.x>

- Khalid, A., Khudhair, N., He, H., Peng, Z., Yaguang, T., Guixue, Z., 2016. Effects of Dietary Selenium Supplementation on Seminiferous Tubules and SelW, GPx4, LHCGR, and ACE Expression in Chicken Testis. *Biol. Trace Elem. Res.* 173, 202–209. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0646-y>
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Jeong, M.S., Xu, S.Z., Kim, J.B., Park, H.J., Kim, H.R., Lillehoj, E.P., Bravo, D.M., 2014. Effects of in ovo injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 93, 1113–1121. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03770>
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Mattila, P.H., Valkonen, E., Valaja, J., 2011. Effect of different vitamin D supplementations in poultry feed on vitamin D content of eggs and chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8298–8303. <https://doi.org/10.1021/jf2012634>
- Mokhtari, Z., Hekmatdoost, Z., Nourian, M., 2017. Antioxidant efficacy of vitamin D. *J. Parathy. Dis.* 5, 11–16.
- Nanduri, J., Vaddi, D.R., Khan, S.A., Wang, N., Makerenko, V., Prabhakar, N.R., 2013. Xanthine Oxidase Mediates Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$  Degradation by Intermittent Hypoxia. *PLoS One* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075838>
- Naveilhan, P., Neveu, I., Baudet, C., Funakoshi, H., Wion, D., Brachet, P., Metsis, M., 1996. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Mol. Brain Res.* 41, 259–268.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2011.03.016>
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913–922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
- Pappas, A.C., Acamovic, T., Surai, P.F., McDevitt, R.M., 2006. Maternal organo-selenium compounds and polyunsaturated fatty acids affect progeny performance

- and levels of selenium and docosahexaenoic acid in the chick tissues. *Poult. Sci.* 85, 1610–1620. <https://doi.org/10.1093/ps/85.9.1610>
- Proszkowiec-Weglarz, M., Angel, R., 2013. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 609–627. <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00743>
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Ren, Z., Jiang, S., Zeng, Q., Ding, X., Bai, S., Wang, J., Luo, Y., Su, Z., Xuan, Y., Yao, B., Cisneros, F., Zhang, K., 2016. Effect of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the performance of duck breeders under two different vitamin regimens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0062-3>
- Rocha, J.S.R., Lara, L.J.C., Baião, N.C., Vasconcelos, R.J.C., Barbosa, V.M., Pompeu, M.A., Fernandes, M.N.S., 2010. Antioxidant properties of vitamins in nutrition of broiler breeders and laying hens. *Worlds. Poult. Sci. J.* 66, 261–270. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000310>
- Rosa, A.P., Scher, A., Sorbara, J.O., Boemo, L.S., Forgiarini, J., Londero, A., 2012. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poult. Sci.* 91, 660–666. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01582>
- Saunders-Blades, J.L., Korver, D.R., 2015. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poult. Sci.* 94, 1233–1246. <https://doi.org/10.3382/ps/pev002>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Serralbo, O., Salgado, D., Véron, N., Cooper, C., Dejardin, M.J., Doran, T., Gros, J., Marcelle, C., 2020. Transgenesis and web resources in Quail. *Elife* 9, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.56312>
- Shanmugasundaram, R., Selvaraj, R.K., 2012. Vitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D-

- 24-hydroxylase mRNA studies in chickens. *Poult. Sci.* 91, 1819–1824. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02129>
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shojadoost, B., Yitbarek, A., Alizadeh, M., Kulkarni, R.R., Astill, J., Boodhoo, N., Sharif, S., 2021. Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. *Poult. Sci.* 100, 100930. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.027>
- Sun, Q., Guo, Y., Ma, S., Yuan, J., An, S., Li, J., 2012. Dietary mineral sources altered lipid and antioxidant profiles in broiler breeders and posthatch growth of their offsprings. *Biol. Trace Elem. Res.* 145, 318–324. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9196-5>
- Surai, P.F., 2016. Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. *J. Anim. Res. Nutr.* 01. <https://doi.org/10.21767/2572-5459.100008>
- Surai, P.F., 2012. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 2. *Worlds. Poult. Sci. J.* 68, 717–726. <https://doi.org/10.1017/S0043933912000840>
- Surai, P.F., 2006. Selenium in Nutrition and Health, *The American Journal of Clinical Nutrition.* <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.1.270>
- Surai, P.F., 2000. Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *Br. Poult. Sci.* 41, 235–243. <https://doi.org/10.1080/713654909>
- Surai, P.F., Fisinin, V.I., 2014. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. *Anim. Feed Sci. Technol.* 191, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.02.005>
- Surai, P.F., Fisinin, V.I., Karadas, F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* 2, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.01.001>
- Surai, P.F., Karadas, F., Pappas, A.C., Sparks, N.H.C., 2007. Effect of organic selenium in quail diet on its accumulation in tissues and transfer to the progeny. *Br. Poult. Sci.* 47, 65–72. <https://doi.org/10.1080/00071660500475244>

- Surai, P.F., Karadas, F., Pappas, A.C., Sparks, N.H.C., 2006. Effect of organic selenium in quail diet on its accumulation in tissues and transfer to the progeny. *Br. Poult. Sci.* 47, 65–72. <https://doi.org/10.1080/00071660500475244>
- Surai, P.F., Kochish, I.I., 2019. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: The case of selenium. *Poult. Sci.* 98, 4231–4239. <https://doi.org/10.3382/ps/pey406>
- Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I., Kidd, M.T., 2019. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants* 8, 1–36. <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>
- Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I., Velichko, O.A., 2018. Selenium in poultry nutrition: From sodium selenite to organic selenium sources. *J. Poult. Sci.* 55, 79–93. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170132>
- Tavaniello, S., 2013. Effect of cross-breed of meat and egg line on productive performance and meat quality in Japanese quail (*Coturnix japonica*) from different generations. Tese de doutorado.
- Wan, X.L., Ju, G.Y., Xu, L., Yang, H.M., Wang, Z.Y., 2019. Dietary selenomethionine increases antioxidant capacity of geese by improving glutathione and thioredoxin systems. *Poult. Sci.* 98, 3763–3769. <https://doi.org/10.3382/ps/pez066>
- Wen, J., Livingston, K.A., Persia, M.E., 2019. Effect of high concentrations of dietary vitamin D3 on pullet and laying hen performance, skeleton health, eggshell quality, and yolk vitamin D3 content when fed to W36 laying hens from day of hatch until 68 wk of age. *Poult. Sci.* 98, 6713–6720. <https://doi.org/10.3382/ps/pez386>
- Wideman, R.F., Blankenship, J., Pevzner, I.Y., Turner, B.J., 2015. Efficacy of 25-OH Vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. *Poult. Sci.* 94, 1821–1827. <https://doi.org/10.3382/ps/pev160>
- Williams, A.W., Boileau, T.W.M., Erdman, J.W., 1998. Factors Influencing the Uptake and Absorption of Carotenoids. *Exp. Biol. Med.* 218, 106–108. <https://doi.org/10.3181/00379727-218-44275>
- Yeh, Y.L., Chou, P.C., Chen, Y.H., Lai, L.S., Chung, T.K., Walzem, R.L., Huang, S.Y., Chen, S.E., 2020. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves

cardiac function and livability in broiler breeder hens—amelioration of blood pressure and vascular remodeling. *Poult. Sci.* 99, 3363–3373.  
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.015>

Zehnder, D., Bland, R., Williams, M.C., Ninch, R.W.M.C., Howie, A.J., Stewart, P.M., Hewison, M., 2001. Extrarenal Expression of 25-Hydroxyvitamin D 3 -1 $\alpha$ -Hydroxylase\*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 888–894.  
<https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7220>

Zhang, L., Lu, L., Li, S., Zhang, G., Ouyang, L., Robinson, K., Tang, Y., Zhu, Q., Li, D., Hu, Y., Liu, Y., 2016. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 induces avian  $\beta$ -defensin gene expression in chickens. *PLoS One* 11, 1–14.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154546>



## II - OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da suplementação de Cantaxantina, Selênio levedura e Vitamina D<sub>3</sub> na dieta de reprodutores machos e fêmeas de codornas Japonesas sobre o desempenho produtivo e reprodutivo, assim como o estado oxidativo dos reprodutores, embriões e da progênie.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### Artigo 1

Avaliar os efeitos da suplementação de cantaxantina, vitamina D<sub>3</sub>, associação de cantaxantina e Vitamina D<sub>3</sub> e selênio orgânico na dieta de matrizes de codornas de postura, frente a produção, a qualidade de ovos e as variáveis bioquímicas séricas e oxidativas.

#### Artigo 2

Avaliar os efeitos residuais na progênie de matrizes que receberam a suplementação de cantaxantina, vitamina D<sub>3</sub>, associação de cantaxantina e Vitamina D<sub>3</sub> e selênio orgânico na dieta frente a incubação, a qualidade, desempenho produtivo, capacidade antioxidante e peroxidação lipídica de pintinho.

## II – Artigo 1

### **Substâncias bioativas na dieta de reprodutores de codorna japonesa promove melhora no *status redox***

#### Destaques

- Avaliou-se suplementação de aditivos antioxidantes na dieta de codornas;
- Foram utilizadas cantaxantina, 25-hidroxycolecalciferol e selênio levedura;
- Codornas japonesas são bons modelos para estudos de substâncias antioxidantes em estudos reprodutivos.

Resumo: Com a utilização de cantaxantina (Cx), selênio levedura (SeLev) e o metabólito da vitamina D 25(OH)D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) na dieta de reprodutores de codornas japonesas objetivou-se avaliar o desempenho produtivo, qualidade de ovos, atividade antioxidante e bioquímica sérica. Dois experimentos foram realizados (Exp. I e Exp. II) com a distribuição das aves em um delineamento inteiramente ao acaso com quatro tratamentos no Exp. I (basal, Cx, VD<sub>3</sub> e SeLev) e três tratamentos no Exp. II (basal, Cx+VD<sub>3</sub> e SeLev), cada experimento contou com 10 unidades experimentais, formadas por 5 fêmeas e 2 machos. O desempenho produtivo das aves não foi influenciado pelas dietas (Exp. I e Exp. II). A espessura de casca, índice de gema e porcentagem de gema foram superiores no tratamento Cx+VD<sub>3</sub> quando comparados aos demais no Exp. II. A coloração da gema apresentou diferença entre os tratamentos nos dois experimentos, sendo a intensidade de a\* maior nos tratamentos com Cx. Os resultados para bioquímica sérica apresentaram diferenças para triglicérides e proteínas totais em ambos sexos, o tratamento basal apresentou os valores mais elevados. No Exp. II o soro das fêmeas, o tratamento basal apresentou as maiores médias para a avaliação das três análises. De modo geral, em ambos experimentos a capacidade antioxidante observada pela inibição dos radicais

DPPH e ABTS+, no soro sanguíneo, tecido hepático de machos e fêmeas e na gema do ovo foram superiores nos tratamentos com antioxidantes quando comparados com o basal. A peroxidação lipídica na gema do ovo foi menor nos tratamentos SeLev e basal, frente aos demais experimentos. A suplementação de dietas para reprodutores de codornas com nutrientes antioxidantes pode ser indicada para melhorar o status antioxidante.

**Palavras-chave:** antioxidante; carotenoide; estresse oxidativo; selênio; vitamina D.

## Introdução

A indústria avícola está a todo momento em busca de tecnologias que diminuam o estresse causado pelo ambiente externo, já que os genótipos modernos, em contrapartida à precocidade e melhor desempenho, têm a necessidade de um ambiente controlado para expressar todo seu potencial. Aliado aos fatores ambientais, é necessário que a nível celular o organismo esteja recebendo nutrientes que estimulem os mecanismos responsáveis por combater os danos causados pelo estresse, que são em sua maioria representados pelas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Esses mecanismos são comumente chamados de sistema antioxidante (Surai et al., 2018).

Os radicais livres são produzidos continuamente pelo organismo animal, o problema é quando ocorre desbalanço entre a produção e neutralização destes radicais, que leva a danos moleculares resultando em comprometimento do desenvolvimento da ave (Surai et al., 2016). Uma das formas usadas para minimizar esses problemas é a nutrição adequada com ênfase na suplementação de minerais, vitaminas e carotenoides, que atuam favorecendo a atividade antioxidante no organismo (Galli et al., 2018).

Provavelmente, o micromineral mais utilizado com essa finalidade em produção de aves é o selênio. Na alimentação das aves ele pode ser fornecido na forma inorgânica como selenito de sódio ou na forma orgânica, através da fermentação de leveduras, apresentando este, maior facilidade de absorção e melhor biodisponibilidade para o organismo. O selênio está envolvido na atividade de diversas enzimas que atuam na defesa antioxidante como a glutathione peroxidase (GSH-Px), que catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio, e a superóxido dismutase (SOD), que é a responsável pela dismutação do ânion superóxido (Han et al., 2017; Surai et al., 2019). Sabe-se que o efeito protetor dessas enzimas é transmitido da reprodutora para sua progênie, assim a suplementação de selênio orgânico na dieta materna favorece o desenvolvimento do embrião (Han et al., 2017; Surai et al., 2007; Wan et al., 2019).

Comumente utilizados como pigmentantes de tecido muscular em frangos de corte, ou para incremento de cor na gema de ovos (Alay e Karadas, 2016; Karadas et al., 2016) os carotenoides também apresentam atividade antioxidante de extrema importância no organismo (Bonagurio et al., 2020; Rosa et al., 2012). Basicamente são classificados em dois grupos: os carotenos, incluindo licopeno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, e as xantofilas, como a luteína e a cantaxantina. Por serem moléculas lipofílicas, os carotenoides são considerados eficientes na proteção contra as espécies reativas de oxigênio em nível celular, pois atuam diminuindo principalmente a oxidação lipídica das membranas (Agarwal et al., 2012). O uso da cantaxantina como alternativa antioxidante tem apresentado resultados positivos em matrizes de frango de corte e de codornas. A melhora no estado antioxidante dos reprodutores está diretamente relacionada com o aumento dos índices de incubação e de qualidade de pintinhos (Bonagurio et al., 2020; Bonilla et al., 2017; Surai et al., 2003; Surai, 2012).

O metabólito 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>) é considerado a forma de armazenamento mais eficiente de vitamina D no organismo animal, pois sua forma estrutural faz desnecessária a conversão enzimática da vitamina D<sub>3</sub> em 25(OH)D<sub>3</sub> pelo fígado (Wideman et al., 2015). A vitamina D possui papel bem descrito no metabolismo do cálcio (Fritts e Waldroup, 2005; Ren et al., 2016), porém, sua atividade antioxidante vem sendo considerada após a descoberta do receptor VDR em tecidos que não têm ligação direta com esse metabolismo. Este receptor vem sendo relacionado à prevenção de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e renais em humanos, por haver evidências sobre a capacidade de induzir a expressão de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante como GSH-Px e SOD (Mokhtari et al., 2017). A associação da vitamina D com a cantaxantina também vem apresentando resultados positivos quanto a capacidade antioxidante adquirida pelo embrião da dieta materna (Araujo et al., 2019; Bonagurio et al., 2020; Saunders-Blades e Korver, 2015).

Diante da importância do sistema redox no organismo das aves, objetivou-se avaliar a inclusão de diferentes substâncias que possuem capacidade antioxidante na dieta de reprodutores (as) de codornas japonesas sobre o desempenho produtivo, qualidade de ovos, perfil bioquímico sérico e a atividade antioxidante do tecido hepático.

## 1. Material e Métodos

Todos os procedimentos de manejo e metodológicos, bem como os protocolos de eutanásia foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em experimentação da Universidade Estadual de Maringá (protocolo nº 7846161115).

### 1.1 Animais e manejo

Dois experimentos foram realizados em reprodutores de codornas de postura

(*Coturnix coturnix japônica*), com período experimental de 12 semanas (3 ciclos produtivos de 28 dias) cada. Os experimentos foram realizados no Setor de Coturnicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá (CCA/UEM), localizada na cidade de Maringá, Estado do Paraná.

Os dois experimentos foram realizados na mesma instalação, um galpão de produção dotado de gaiolas de arame galvanizado (25 × 39 cm), com bebedouros do tipo *nipple* e comedouros do tipo calha. O alimento e a água eram fornecidos à vontade e o programa de luz adotado foi de 17 horas de luz (natural + artificial) durante todo o período experimental. A temperatura e a umidade foram medidas diariamente durante todo o período experimental com auxílio de termo-higrômetro digital, registrando como média no Exp. I a temperatura máxima de 31,13°C e mínima de 19,84°C e a umidade máxima 66,83% e mínima 39,08%. No Exp. II as médias para temperatura foram 31,28°C e 19,24°C e para umidade 67,02% e 34,15%, máxima e mínima respectivamente.

Em ambos os experimentos houve adaptação dos animais com as dietas por 14 dias antes do início do primeiro ciclo experimental. As rações foram baseadas em milho e farelo de soja e atenderam as exigências com base nas recomendações de Rostagno et al. (2017). As rações foram preparadas e misturadas a cada 15 dias e armazenadas em sacos escuros e ambiente seco e protegido da luz.

Com exceção da expressão gênica e atividade da enzima Superóxido Dismutase, as demais análises também foram as mesmas para ambos os experimentos.

## 1.2 Delineamento experimental e dietas – Experimentos I e II

Foram formuladas cinco dietas para os experimentos:

Basal (SS): dieta com 0,3 ppm selênio (selenito de sódio - Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>);

SeLev: dieta basal sem SS + 0,3 ppm Se orgânico Levedura;

Cx: Dieta SS: + 6 ppm de cantaxantina;

Cx+VD<sub>3</sub>: Dieta SS + 6 ppm cantaxantina + 2.760 UI de 25-hidroxicolicalciferal;

VD<sub>3</sub>: Dieta SS + 2.760 UI de 25-hidroxicolicalciferal.

Para as aves do Exp. I foram fornecidas as dietas: Basal, SeLev, Cx e VD<sub>3</sub>. No Exp. II foram utilizadas apenas as dietas: Basal, SeLev e Cx+VD<sub>3</sub>.

No Exp. I foram utilizados 280 reprodutores, 200 fêmeas e 80 machos, com 16 semanas de idade. As aves foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente ao acaso com quatro tratamentos cada um com dez repetições de 7 aves (5 fêmeas e 2 machos com peso médio (167 g para fêmeas e 129 g para machos)).

No Exp. II, 150 fêmeas ( $\pm 172$ g) e 60 machos ( $\pm 130$ g) com 18 semanas de idade foram distribuídos de forma inteiramente ao acaso em 3 tratamentos cada um com dez repetições, sendo a gaiola a unidade experimental e cada uma delas composta por 5 fêmeas e 2 machos.

### 1.3 Desempenho produtivo e qualidade de ovos - Experimentos I e II

Após a adaptação das aves, deu-se o início do período experimental que consistiu em 3 ciclos de 28 dias cada. Diariamente eram contabilizadas as possíveis mortalidades e a postura de cada gaiola individualmente. O desempenho produtivo foi mensurado a cada ciclo através da taxa de postura, consumo diário de ração (CDR g/ave), massa de ovos (MO, g) e conversão alimentar (CA kg/kg e CA kg/dúzia). Com exceção da taxa de postura as demais variáveis foram consideradas com lote misto, pela presença dos machos na mesma gaiola.

Durante três dias consecutivos da última semana de cada ciclo produtivo em cada experimento, foram realizadas as análises de qualidade dos ovos, sendo essa avaliada

através do peso médio dos ovos (PM ovos), a gravidade específica (GE), percentagem de casca de albúmen e gema (% casca, % albúmen, % gema), unidade Haugh (UH), índice de gema (IG) e espessura da casca (ESP casca) em milímetros. Após identificação e pesagem de todos os ovos íntegros de cada repetição em balança semianalítica ( $\pm 0.001\text{g}$ ) três ovos eram então selecionados pelo peso médio para as análises.

Para a análise de gravidade específica (g/L) os ovos foram mergulhados em soluções salinas de diferentes densidades (Pym,1969), variando de 1,060 a 1,090  $\text{g/cm}^3$  com intervalo de 0,005 para cada solução, sendo pertencentes a cada densidade os ovos que flutuavam nas mesmas.

A qualidade interna foi determinada com os ovos provenientes da análise de gravidade específica. Com auxílio de uma tesoura cirúrgica os ovos foram seccionados na porção equatorial e acomodados em superfície plana e lisa de vidro. As medidas de altura do albúmen e altura da gema foram determinadas e expressas em milímetros (mm) com um paquímetro digital (Digimess, com precisão de 0,02 mm). A altura da gema era realizada posicionando o paquímetro bem ao centro da gema, e a altura do albúmen no ponto mais próximo da gema. Por meio da medida da altura de albúmen (mm) e peso unitário do ovo (g) foram calculados os valores da unidade Haugh determinada pela equação:  $UH = 100 \log (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37})$ , em que: H = altura de albúmen (mm); W = peso do ovo (gramas).

Com auxílio de um paquímetro manual ( $\pm 0,02$  mm) foi mensurado o diâmetro da gema e com base na média dos valores obtidos foi então calculado o índice de gema (altura/diâmetro). O índice de gema foi calculado através da altura de gema (mm) dividida pelo diâmetro de gema (mm) multiplicado por 100.

Os dados de peso de gema e peso de casca serviram para quantificar as porcentagens de gema e casca em relação ao peso do ovo, de acordo com a equação:



% do componente = (peso do componente (g) / peso do ovo (g)) × 100. O peso do albúmen foi obtido subtraindo o peso do ovo, da gema e da casca, e sua porcentagem foi dada pela diferença dos demais × 100.

Após a realização das medidas anteriores, as cascas foram lavadas preservando a membrana interna e secas em estufa de ventilação forçada por 72 horas para a determinação da porcentagem da casca, que é obtida pela relação do peso da casca com o peso do ovo. Após retiradas da estufa e em temperatura ambiente foram pesadas em balança de precisão digital (0,001 g), e em seguida foi realizada a medição da espessura com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo<sup>®</sup>, modelo 700-118 “Quick Mini”) em três pontos na região central de cada casca.

A coloração da gema foi determinada através de um colorímetro Minolta CR-400, no sistema CIELab, previamente calibrado em superfície branca de acordo com padrões pré-estabelecidos segundo Bible e Singha (1993) e Mutschler et al. (1992). Foram avaliados os valores de cor: a\*, b\* e L. Sendo o valor de a\* a captação da cor na região do vermelho (+a\*) ao verde (-a\*), o valor b\* coloração no intervalo do espectro amarelo (+b\*) ao azul (-b\*), e o valor de L fornece a luminosidade, que varia do branco (L=100) ao preto (L=0).

#### 1.4 Obtenção de amostras e tecidos - Experimentos I e II

Ao fim do último ciclo experimental de cada experimento, as codornas foram pesadas e dentro do peso médio de cada tratamento, foram selecionados dez fêmeas e dez machos para a colheita de sangue. Essas aves estiveram em jejum prévio de seis horas, e a colheita foi realizada pela veia da asa. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e alíquotas foram retiradas para análises de perfil sérico bioquímico e atividade antioxidante e armazenadas em freezer -20°C. Das fêmeas foram

coletadas mucosa de vagina e de ambas as amostras de fígado para antioxidantes. Os tecidos coletados para análise de expressão gênica foram obtidos de cinco codornas por tratamento, de acordo com o peso médio, mas que não foram submetidas a jejum prévio, destas aves foram coletados amostra de fígado e mucosa da vagina.

### 1.5 Bioquímica Sérica - Exp I e II

No soro de machos e fêmeas foram analisados os níveis séricos de proteína total, colesterol e triglicérides. O soro foi analisado pelo método colorimétrico utilizando *kits* comerciais (Gold Analisa Diagnóstica Ltda), seguindo os procedimentos operacionais padrões descritos nos mesmos.

### 1.6 Atividade da enzima Superóxido Dismutase - Exp I

A atividade da enzima Superóxido Dismutase no fígado das matrizes foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a auto-oxidação do pirogalol, adaptada de Marklund e Marklund (1974). Aproximadamente 250 mg de tecido congelado foi homogeneizado em solução tampão (Tris-HCl 200mM + EDTA 2mM; pH 8,2), centrifugado (10.000 rpm; 10 193 min a 4°C) e o sobrenadante foi coletado. A dosagem da proteína foi realizada no sobrenadante (Lowry et al., 1951), e em uma cubeta de quartzo uma alíquota do sobrenadante ( $\pm 25 \mu\text{L}$ ;  $\geq 0,5 \text{ mg proteína/ml}$ ) foi adicionado juntamente com solução tampão ( $\pm 975 \mu\text{l}$ ) e pirogalol ( $70 \mu\text{L}$ ; 15mM) e colocados no espectrofotômetro (Thermo Scientific™, 197 Evolution™ 300 UV-VIS, Waltham, USA). As leituras foram realizadas a 420 nm durante 180 segundos. A quantidade suficiente para inibir a reação enzimática em 50% (IC50) foi definida como 1 unidade de SOD, e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

### 1.7 Capacidade antioxidante DPPH e ABTS e Peroxidação lipídica - Exp I e II

A capacidade antioxidante do fígado de machos e fêmeas foi realizada pela análise de inibição (%) dos radicais ABTS<sup>+</sup> (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A partir de 100 mg de fígado (1:19; m/v em metanol) e 100µl de soro (1:10; v/v em metanol) extratos foram preparados após homogeneização (Phoenix lufenco, AP22, Araraquara, BR) e centrifugação a 3000 rpm por 20 min (MPW Med. Instruments, MPW-351R, Varsóvia, PL) e coleta de sobrenadante.

A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999) com modificações. O cátion ABTS<sup>+</sup> foi formado incubando ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) por 16 horas à temperatura ambiente em condições escuras. Para a análise o radical ativado ABTS foi diluído com etanol até a absorbância de  $0,70 \pm 0,02$ , e 1960 µl dessa solução foi misturada com 40 µl do soro sanguíneo. A absorbância foi medida após 6 min a 734 nm e a atividade antioxidante (%) foi calculada usando a equação:

$$\text{Atividade antioxidante de ABTS (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{Amostra A}}{\text{Amostra At0}}\right)\right) \times 100 \quad , \quad \text{onde:}$$

Amostra A = absorbância da amostra em 6 minutos e, Amostra At0= absorbância da amostra no tempo zero.

O método de inibição do radical DPPH também foi utilizado para análise antioxidante no fígado de fêmeas e machos (n=05) de acordo com Li et al. (2009), com modificações. O soro sanguíneo (150 µl) foi misturado com 2,85 mL da solução de DPPH (60 µM) e incubado por 30 minutos no escuro e a absorbância medida em 515 nm. A atividade antioxidante foi calculada usando a equação:

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{\text{AmostraA}}{\text{AmostraAt0}}\right) * 100. \quad \text{Em que: Amostra A =}$$

absorbância da amostra em 30 minutos e, Amostra  $A_{t0}$  = absorbância da amostra no tempo zero.

A peroxidação lipídica foi mensurada através da produção de malonaldeído (MDA) de acordo com metodologia adaptada de Vital et al. (2016) nas amostras de fígado de machos e fêmeas. O tecido foi misturado em solução de TCA - Ácido Tricloroacético (15% TCA, 0,1% ácido etilenodiamino tetra-acético e 0,1% ácido gálico) (1:19, m/v) e centrifugado a 4°C por 15 min a 3.000 rpm (MPW Med. Instruments, MPW-351R, Varsóvia, PL) sendo então o sobrenadante coletado. Em tudo protegido da luz, adicionou-se a solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% TBA, 562,5 µM HCl e 15% TCA, em água destilada) e extrato (1:1, v/v), seguido de banho fervente durante 15 minutos a 100°C. Após o banho as amostras foram resfriadas e realizou-se leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific™, Evolution™ 212 300 UV-VIS, Waltham, USA) a 532 nm de comprimento de onda. TBARS foi expresso em µg e MDA/g de tecido calculado usando curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) 1mM como padrão.

## 1.8 Expressão Gênica

Ao final do experimento, cinco matrizes por tratamento foram eutanasiadas e amostras de fígado e mucosa da vagina foram coletadas. Essas amostras foram conservadas em nitrogênio líquido, e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C.

O RNA foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 500 µL para cada 100 mg de tecido. Previamente todo o material utilizado foi tratado com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para triturar o tecido foi utilizado homogenizador elétrico Polytron (tecido + Trizol) até a sua completa dissociação. Em seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio nas amostras, sendo estas homogeneizadas

manualmente por 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um tubo limpo, adicionando em seguida 250 µL de isopropanol por tubo, esse foi incubado a temperatura ambiente (25°C), por 10 minutos. Logo após, as amostras foram suavemente homogeneizadas, e centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 75%. Procedendo mais uma centrifugação do material, desta vez a 7500 x g por 5 minutos, e logo após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Por fim, deixando o pelete secando por 15 minutos e em seguida o ressuspendendo em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), no comprimento de onda de 260 nm. E, a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain e visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para esta reação, em um tubo estéril e RNA free foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µL de 10 X DNase I reaction buffer e 1 µL DNase I amplification grade (1 U/µL). A reação foi então incubada à temperatura ambiente, por 15 minutos. Em seguida, inativada a DNase I adicionando 1 µL de EDTA a 25 mM, e a reação foi aquecida a 65°C por 10 minutos. Essa etapa tem o objetivo de remover possíveis contaminações com DNA genômico.

A síntese do DNA complementar (cDNA), foi realizada utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA), seguindo as normas do fabricante. Logo após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foram realizadas utilizando o composto fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). Esse composto quando em solução

apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR o acúmulo do corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta a formação dos amplicons, podendo desta forma ser detectada e quantificada.

Os primers utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes *SOD1* e *GPX7*, depositados no site do National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) as sequências podem ser vistas na Tabela 3. Para todos a temperatura de anelamento foi 60°C. Foram testados dois basals endógenos, os genes da  $\beta$ -actina e do GAPDH, sendo utilizado o gene da  $\beta$ -actina (número de acesso L08165), por ter apresentado melhor eficiência na reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 20  $\mu$ L e em duplicatas.

O método  $2^{-\Delta ct}$  foi utilizado para as análises de expressão gênica relativa, sendo seus resultados expressos em unidade arbitrária (UA). Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

## 1.9 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística pelo Teste de Tukey, com nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1999).

## 2. Resultados

### 2.1 Desempenho produtivo e qualidade de ovos

Na Tabela 3 são observados os resultados correspondentes ao desempenho produtivo, qualidade de ovos e coloração da gema referentes aos experimentos I e II. O desempenho produtivo não diferiu entre as dietas ( $P > 0,05$ ).

As variáveis de qualidade de ovos não foram influenciadas pelo consumo de substâncias antioxidantes no exp I. A inclusão de Cx+VD<sub>3</sub> na dieta dos reprodutores promoveu aumento nos índices de espessura da casca (esp casca), índice de gema (IG) e porcentagem de gema (% gema) frente o basal e SeLev no exp II (P<0,05). As duas fontes de Se usadas no Exp. II foram capazes de aumentar o índice da Unidade Haugh comparadas ao Cx+VD<sub>3</sub> (P<0,05).

No Exp. I a Cx na dieta reduziu a luminosidade da gema quando comparado aos demais tratamentos, mas seu uso aumentou a intensidade de a\* nos dois experimentos (P<0,05). Também em ambos os experimentos, administração de Cx, VD<sub>3</sub> e SeLev nas dietas também aumentou a intensidade de b\* (P<0,05).

## 2.2 Bioquímica sérica

O fornecimento de Cx, VD<sub>3</sub> e SeLev na dieta das fêmeas resultou na diminuição do colesterol (mg/dL), triglicérides séricos (mg/dL) e proteínas totais nos dois experimentos (Tabela 4), sendo observado o mesmo comportamento no soro dos machos para triglicérides e proteínas totais (P<0,05). As dietas Cx+VD<sub>3</sub> e SeLev diminuíram a concentração total de colesterol no soro dos machos apenas no Exp. II.

## 2.3 Atividade antioxidante e peroxidação lipídica

Na gema do ovo, no tecido hepático e no soro dos reprodutores (as) foi avaliado a capacidade de inibição dos radicais DPPH e ABTS+. De modo geral, a inclusão de substâncias com capacidade antioxidante nas rações experimentais promoveram aumento na capacidade redutora dos radicais (Tabela 5).

No Exp. I, a capacidade de redução dos dois radicais foi superior nos tratamentos antioxidantes para o tecido hepático e soro de ambos os sexos (P<0,05), e na gema do

ovo, apenas a capacidade redutora do radical DPPH apresentou resultados superiores nos tratamentos Cx, VD<sub>3</sub> e SeLev frente o basal.

No Exp. II, o uso de SeLev e Cx+VD<sub>3</sub> influenciaram a atividade de inibição do radical ABTS+ no tecido hepático de reprodutores e matrizes (P<0,05) com aumento da atividade nestes tratamentos em relação ao basal (P<0,05) (Tabela 5). A administração de antioxidantes também resultou em aumento na captura do radical DPPH no fígado de machos e fêmeas, no soro das fêmeas e na gema de ovo frente o tratamento basal (P<0,05).

Os resultados encontrados para a peroxidação lipídica na gema do ovo, e no tecido hepático das reprodutoras(es) são apresentados na Tabela 6. Em ambos experimentos para a concentração de MDA na gema de ovo liofilizada o tratamento SeLev e basal apresentaram as menores médias (P<0,05).

No Exp. I a concentração de MDA não diferiu estatisticamente (P>0,05) no tecido hepático das reprodutoras, já no Exp. II a maior média de concentração foi observada no fígado das reprodutoras que consumiram a dieta Cx+VD<sub>3</sub>. No tecido hepático dos machos no Exp. I e no Exp. II o tratamento SeLev diminui a concentração do MDA em comparação com os demais antioxidantes e o selenito de sódio.

#### 2.4 Atividade enzimática (SOD) e expressão gênica – Exp. I

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada no fígado das matrizes de codorna de postura ao final do Exp. I e os resultados estão apresentados na Tabela 7. Não houve efeito das substâncias antioxidantes adicionadas na dieta sobre essa variável (P>0,05).

A análise da expressão dos genes *GPX7* e *SOD1* foi realizadas no tecido hepático e na mucosa da vagina na transição útero-vagina das fêmeas. Não houve efeito significativo para os tratamentos testados no Exp. I (P>0,05) (Tabela 8).



### 3. Discussão

#### 3.1 Desempenho produtivo e qualidade de ovos

A administração de substâncias antioxidantes como a Cx e a VD<sub>3</sub> ou o Se na forma de Se levedura na dieta dos reprodutores e matrizes de codornas japonesas não influenciaram os resultados do desempenho produtivo nos experimentos. Estudos apontam que a inclusão dessas substâncias na dieta de espécies avícolas não alteram as variáveis de desempenho produtivo quando comparados com uma dieta basal usual (Alay e Karadas, 2016; Bonagurio et al., 2020; Han et al., 2012). Estes são os resultados da criação de aves em condições experimentais adequadas. O consumo de ração e a conversão alimentar considerou o macho por ser o objetivo destes experimentos a produção de ovos férteis, e no caso de codornas o macho permanece com as fêmeas nas gaiolas e consome a mesma ração. Desta forma, o consumo de 24,22 e de 22,61 g/ave/dia e a CA de 2,135 e de 2,22 kg/kg para os Experimentos I e II respectivamente, estão de acordo com a idade das codornas estudadas, e com grupos reprodutores da espécie.

Em plantéis de reprodutoras os índices relacionados a qualidade externa e interna dos ovos férteis são importantes para que se possa ter estimativa do desempenho da incubação consequentemente melhorando as variáveis de fertilidade e eclodibilidade dos lotes. No Exp. I, Cx e VD<sub>3</sub> fornecidas de forma isolada nas dietas das reprodutoras não foram capazes de alterar as variáveis estudadas para qualidade de ovos. No Exp. II, quando a associação de Cx+VD<sub>3</sub> foi administrada, as médias das variáveis de qualidade de ovos foram maiores para espessura da casca, índice de gema e porcentagem de gema. Desta forma, a associação entre essas substâncias parecer ser a melhor indicação para produção de ovos em reprodutores de codornas. De forma diferente, o SeLev não interferiu nas variáveis de desempenho produtivo ou de qualidade de ovos, sendo os

valores encontrados comparáveis ao tratamento basal com selênio na forma de selenito de sódio nos dois experimentos.

A casca é responsável pela proteção do conteúdo do ovo contra impactos mecânicos e também microbiológicos, além de ser responsável pelas trocas gasosas e de água com o meio durante o período de armazenagem e incubação (Narinc et al., 2015). A vitamina D<sub>3</sub> atua diretamente no metabolismo do cálcio (Wen et al., 2019) e, dessa forma, possui efeito direto nas variáveis relacionadas a qualidade da casca. Nos resultados deste trabalho as fêmeas que receberam na dieta Cx associados com 2.760 UI de VD<sub>3</sub> produziram ovos com cascas mais espessas (Exp II).

O IG e a percentagem de gema estão diretamente relacionados ao frescor e qualidade do ovo. Conforme o tempo decorre após a postura do ovo, a membrana vitelínica responsável por recobrir a gema começa a se tornar mais permeável, dessa forma a gema começa a absorver porção do albúmen líquido, ficando maior e, conseqüentemente, diminuindo seus valores de IG e aumentando sua porcentagem (Nasri et al., 2020). O IG para ovos frescos de codornas japonesas está estimado entre 0,48 a 0,52, variando de acordo com o avanço da idade da poedeira (Gonzalez, 1995). Neste trabalho, o tratamento Cx+VD<sub>3</sub> (Exp II) apresentou os maiores valores para ambas as variáveis, essa diferença pode ser pela ação do carotenoide.

No Exp. II foi observado que a unidade Haugh foi menor no tratamento Cx+VD<sub>3</sub> quando comparado ao tratamento basal, diferente de Bonagurio et al. (2020) que não encontrou diferenças significativas na associação de diferentes níveis de cantaxantina e vitamina D<sub>3</sub> nas variáveis relacionadas a qualidade de ovo em reprodutores de codornas de corte e de Ren et al. (2016) que estudaram essa associação em patas. Ao avaliar o efeito da vitamina D<sub>3</sub> isoladamente em galinhas poedeiras durante sete fases do ciclo produtivo (0 dia a 68 semanas) Wen et al. (2019) descrevem resultados similares aos encontrados

neste trabalho. Os autores sugerem que a medida da UH pode não estar associada diretamente a vitamina D<sub>3</sub> dietética ou outra substância e que por estarem dentro da faixa de normalidade da unidade para aves, essas diferenças não seriam biologicamente relevantes (Persia et al., 2013).

No dois experimentos analisados, a inclusão de 6 ppm de Cx na dieta influenciou a coloração da gema. No Exp. I a luminosidade, a intensidade de vermelho (a\*) e de amarelo (b\*) foram influenciados pelas dietas. Já no Exp. II apenas a intensidade de vermelho (a\*) e de amarelo (b\*) foram modificadas. A zeaxantina e a luteína são exemplos de carotenoides presentes no milho, que é a base da dieta de codornas, sendo estes os responsáveis pela intensidade de amarelo na gema. Os pigmentos carotenoides de ocorrência natural, como a astaxantina e a cantaxantina, podem ser aplicados na alimentação animal de modo que os produtos alimentícios resultantes sejam atraentes para o consumidor. Dessa forma, a diferença entre o tratamento com a inclusão de Cx em ambos experimentos, frente aos demais, é explicada pela presença da cantaxantina na dieta, que utilizando a base amarela formada pelos outros carotenoides é capaz de conferir a gema do ovo a coloração vermelho-alaranjada (Fassani et al., 2019).

### 3.2 Bioquímica sérica

Os componentes sanguíneos servem como indicadores da condição fisiológica do animal as condições ambientais e nutricionais ao qual está sendo exposta. Neste estudo a administração de substâncias antioxidantes diminuiu os valores de colesterol e triglicérides nas fêmeas e machos. O uso principalmente da associação de Cx+VD<sub>3</sub> bem como de SeLev parecem exercer efeito metabólico importante no sangue das aves.

Por estarem submetidas a condição comercial ideal, pode-se inferir que a diminuição do triglicérides no soro de aves alimentadas com antioxidantes é resultante da

melhor distribuição dos ácidos graxos para incorporação e uso no metabolismo lipídico (Sigolo et al., 2019) da mesma forma, a diminuição do colesterol em matrizes também foi observada em estudos envolvendo antioxidantes. Estudando a suplementação de vitamina E para matrizes pesadas Zaghari et al. (2013) encontraram a redução no colesterol do soro das aves, e em contrapartida houve aumento de colesterol na gema, assim, os autores relatam que as substâncias antioxidantes atuam promovendo a diminuição do colesterol do soro, para aumentar sua disponibilidade na formação dos folículos ovarianos.

As diferenças nos valores de colesterol e triglicérides entre machos e fêmeas, podem ser explicadas pelas diferenças metabólicas relacionadas a produção dos ovos. Nas fêmeas ocorre aumento da síntese de triglicérides e de colesterol para incorporação de lipídios no oócito. A concentração de proteínas totais também é relacionada a produção de ovos visto que ela está associada aos precursores de gema vitelogenina e lipoproteínas (Scholtz et al., 2009; Walzem et al., 1999).

### 3.3 Capacidade antioxidante e peroxidação lipídica

A capacidade antioxidante de um organismo pode ser medida através dos radicais DPPH e ABTS<sup>+</sup>, que são enzimas relacionadas com a eficácia dos sistemas antioxidantes do organismo e sua capacidade proteger o organismo contra o efeito nocivo de reações que causam oxidação (Wan et al., 2019). Em ambas as metodologias, o aumento do valor obtido na análise representa maior capacidade de sequestro dos radicais e, portanto, maior capacidade antioxidante daquele tecido. Com exceção da capacidade de redução do DPPH no fígado das reprodutoras no Exp. II que não apresentou diferenças significativas, nos demais tecidos a capacidade de redução diferiu estatisticamente entre os tratamentos com substâncias antioxidantes e o tratamento basal ( $P < 0,05$ ). Desta forma, os resultados aqui descritos sugerem que as aves que receberam Cx, VD<sub>3</sub> ou SeLev apresentaram

melhor capacidade antioxidante nesses tecidos. Estes mesmos resultados foram descritos por Bonagurio et al. (2020) ao analisar a capacidade redutora do DPPH no soro e no fígado de reprodutores de codornas europeias alimentadas com diferentes níveis da associação de Cx+VD<sub>3</sub>.

As dietas contendo antioxidantes deste estudo também apresentaram maior capacidade redutora do radical ABTS. Wan et al. (2019) ao suplementar gansos com 0,3 mg de selenometionina também encontrou maior capacidade redutora desse radical frente os animais que receberam o selenito de sódio, inferindo que o selênio na forma orgânica melhora a capacidade antioxidante das aves.

Com relação a peroxidação lipídica, neste trabalho maiores valores de concentração de MDA foram encontrados, em geral, na gema e no fígado das aves provenientes da dieta com presença de Cx ou da associação de Cx+VD<sub>3</sub>. A Cx é um carotenoide lipofílico e muitos estudos relatam maior atividade antioxidante na gema de ovos provenientes de aves que foram submetidas a algum estresse ou armazenados (Galli et al., 2018; Surai et al., 2003). Dos muitos alvos biológicos do estresse oxidativo, os lipídios são a classe de biomoléculas mais envolvida. A oxidação lipídica dá origem a vários produtos secundários com alta toxicidade sendo o malonaldeído (MDA) o mais estudado (Del Rio et al., 2005). A maior quantidade de MDA nos tecidos é interpretada como maior peroxidação lipídica em geral e, portanto, aquele tecido possui menor capacidade de conter a peroxidação, provavelmente por não dispor dos mecanismos antioxidantes ou de quantidade suficiente desses para conter a peroxidação dos lipídios.

Os resultados deste trabalho com ovos frescos de codornas japonesas reprodutoras não mostraram diferença para os valores de MDA em gema ou fígado liofilizado entre os tratamento SS e o de SeLev. Resultados semelhantes foram encontrados por Jing et al. (2015) ao comparar o uso de selenito de sódio, selenometionina e selênio levedura na

dieta de galinhas poedeiras, frente uma dieta sem nenhuma fonte de selênio, os autores encontraram menor concentração de MDA em todas as fontes de selênio fornecidas, sugerindo que a suplementação de qualquer uma delas para animais criados em condições ideais já seria suficiente para a redução no conteúdo de MDA. Essa capacidade de redução do MDA mesmo em condições experimentais de criação, demonstra a capacidade de armazenamento do selênio no tecido animal para posterior uso. Além disso, estaria disponível para a transferência materna para a progênie que dessa forma seria um reforço para o pinto de um dia, visto que o processo de incubação e nascimento estão associados ao aumento da geração de radicais livres (Rosa et al., 2012; Sahin et al., 2008; Surai et al., 2018)

#### 3.4 Atividade enzimática e expressão gênica

Os resultados deste estudo demonstraram que a inclusão de Cx, VD<sub>3</sub> ou SeLev não foi capaz de modular a expressão gênica da *SOD1* e da *GPX7* nem a atividade da enzima SOD no fígado das fêmeas. As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas em condições fisiológicas oriundas da produção de energia nas mitocôndrias, e uma rede de defesa antioxidante é responsável pela manutenção dos níveis de EROS no organismo, evitando o comprometimento da imunidade do animal (Surai et al., 2019). Segundo Surai, (2016) a atividade antioxidante das células aumenta com alguns fatores que podem atuar como agentes estressantes, sejam eles ambientais ou nutricionais.

As aves deste trabalho foram criadas em condições experimentais consideradas adequadas e recebendo rações nutricionalmente balanceadas, assim, o estímulo causado no organismo pode não ter sido o suficiente para que esses mecanismos fossem ativado.

## Conclusão

A inclusão de 6 ppm de cantaxantina e de 2760 UI de vitamina D<sub>3</sub> isolados ou em associação e de 0,3 ppm de Se na forma de selênio levedura na dieta de reprodutores de codornas japonesas melhora o status redox do fígado e do soro sanguíneo. Sendo indicada a sua suplementação.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Referências

- Agarwal, M., Parameswari, R.P., Vasanthi, H.R., Das, D.K., 2012. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules* 17, 4755–4769. <https://doi.org/10.3390/molecules17044755>
- Alay, T., Karadas, F., 2016. The effects of carotenoids in quail breeder diets on egg yolk pigmentation and breeder performance. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* 66, 206–214. <https://doi.org/10.1080/09064702.2017.1330360>
- Araujo, L.F., Araujo, C.S.S., Pereira, R.J.G., Bittencourt, L.C., Silva, C.C., Cisneros, F., Hermes, R.G., Sartore, Y.G.A., Dias, M.T., 2019. The dietary supplementation of canthaxanthin in combination with 25OHD3 results in reproductive, performance, and progeny quality gains in broiler breeders. *Poult. Sci.* 98, 5801–5808. <https://doi.org/10.3382/ps/pez377>
- Bonagurio, L.P., Cruz, F.K., Kaneko, I.N., Matumoto-Pintro, P.T., Murakami, A.E., Santos, T.C., 2020. Dietary supplementation with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol has beneficial effects on bone and oxidative metabolism in European quail breeders. *Poult. Sci.* 99, 4874–4883. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.021>
- Bonilla, C.E.V., Rosa, A.P., Londero, A., Giacomini, C.B.S., Orso, C., Fernandes, M.O., Paixão, S.J., Bonamigo, D. V., 2017. Effect of broiler breeders fed with corn or sorghum diet and canthaxanthin supplementation on production and reproductive performance. *Poult. Sci.* 96, 1725–1734. <https://doi.org/10.3382/ps/pew442>
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15, 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>



- Fassani, E.J., Abreu, M.T., Silveira, M.M.B.M., 2019. Egg yolk color of commercial laying hens receiving commercial pigment in diet. *Cienc. Anim. Bras.* 20, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v20e-50231>
- Fritts, C.A., Waldroup, P.W., 2005. Comparison of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in broiler diets designed to minimize phosphorus excretion. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 156–166. <https://doi.org/10.1093/japr/14.1.156>
- Galli, G.M., Da Silva, A.S., Biazus, A.H., Reis, J.H., Boiago, M.M., Topazio, J.P., Migliorini, M.J., Guarda, N.S., Moresco, R.N., Ourique, A.F., Santos, C.G., Lopes, L.S., Baldissera, M.D., Stefani, L.M., 2018. Feed addition of curcumin to laying hens showed anticoccidial effect, and improved egg quality and animal health. *Res. Vet. Sci.* 118, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.022>
- Gonzalez, M., 1995. Influence of age on physical traits of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Ann. Zootech.* 44, 307–312. [https://doi.org/10.1016/0003-424X\(96\)89756-4](https://doi.org/10.1016/0003-424X(96)89756-4)
- Han, J.C., Wang, Y.L., Qu, H.X., Liang, F., Zhang, J.L., Shi, C.X., Zhang, X.L., Li, L., Xie, Q., Wang, C.L., Yan, Y.Y., Dong, X.S., Cheng, Y.H., 2012. One alpha-hydroxycholecalciferol improves growth performance, tibia quality, and meat color of broilers fed calcium- and phosphorus-deficient diets. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25, 267–271. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11320>
- Han, X.J., Qin, P., Li, W.X., Ma, Q.G., Ji, C., Zhang, J.Y., Zhao, L.H., 2017. Effect of sodium selenite and selenium yeast on performance, egg quality, antioxidant capacity, and selenium deposition of laying hens. *Poult. Sci.* 96, 3973–3980. <https://doi.org/10.3382/ps/pex216>
- Jing, C.L., Dong, X.F., Wang, Z.M., Liu, S., Tong, J.M., 2015. Comparative study of DL-selenomethionine vs sodium selenite and seleno-yeast on antioxidant activity and

- selenium status in laying hens. *Poult. Sci.* 94, 965–975.  
<https://doi.org/10.3382/ps/pev045>
- Karadas, F., Erdoğan, S., Kor, D., Oto, G., Uluman, M., 2016. The effects of different types of antioxidants (Se, vitamin E and carotenoids) in broiler diets on the growth performance, skin pigmentation and liver and plasma antioxidant concentrations. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 18, 101–115. <https://doi.org/10.1590/18069061-2015-0155>
- Mokhtari, Z., Hekmatdoost, Z., Nourian, M., 2017. Antioxidant efficacy of vitamin D. *J. Parathy. Dis.* 5, 11–16.
- Narinc, D., Aygun, A., Karaman, E., Aksoy, T., 2015. Egg shell quality in Japanese quail: Characteristics, heritabilities and genetic and phenotypic relationships. *Animal* 9, 1091–1096. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000506>
- Nasri, H., van den Brand, H., Najjar, T., Bouzouaia, M., 2020. Egg storage and breeder age impact on egg quality and embryo development. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 104, 257–268. <https://doi.org/10.1111/jpn.13240>
- Persia, M.E., Higgins, M., Wang, T., Trample, D., Bobeck, E.A., 2013. Effects of long-term supplementation of laying hens with high concentrations of cholecalciferol on performance and egg quality. *Poult. Sci.* 92, 2930–2937.  
<https://doi.org/10.3382/ps.2013-03243>
- Ren, Z., Jiang, S., Zeng, Q., Ding, X., Bai, S., Wang, J., Luo, Y., Su, Z., Xuan, Y., Yao, B., Cisneros, F., Zhang, K., 2016. Effect of dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on the performance of duck breeders under two different vitamin regimens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/s40104-016-0062-3>
- Rosa, A.P., Scher, A., Sorbara, J.O., Boemo, L.S., Forgiarini, J., Londero, A., 2012. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler

- breeders. *Poult. Sci.* 91, 660–666. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01582>
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P. C.; Oliveira, R., Lopes, D.C., Euclides, R.F. 2017. *Composição de alimentos e exigências nutricionais* (3ed. vol. 1). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Sahin, N., Onderci, M., Sahin, K., Kucuk, O., 2008. Supplementation with organic or inorganic selenium in heat-distressed quail. *Biol. Trace Elem. Res.* 122, 229–237. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8075-6>
- Saunders-Blades, J.L., Korver, D.R., 2015. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poult. Sci.* 94, 1233–1246. <https://doi.org/10.3382/ps/pev002>
- Scholtz, N., Halle, I., Flachowsky, G., Sauerwein, H., 2009. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. *Poult. Sci.* 88, 1186–1190. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00546>
- Sigolo, S., Khazaei, R., Seidavi, A., Ayasan, T., Gallo, A., Prandini, A., 2019. Effects of supra-nutritional levels of vitamin E and vitamin C on growth performance and blood parameters of Japanese quails. *Ital. J. Anim. Sci.* 18, 140–146. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1500496>
- Surai, A.P., Surai, P.F., Steinberg, W., Wakeman, W.G., Speake, B.K., Sparks, N.H.C., 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *Br. Poult. Sci.* 44, 612–619. <https://doi.org/10.1080/00071660310001616200>
- Surai, P.F., 2016. Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. *J. Anim. Res. Nutr.* 01. <https://doi.org/10.21767/2572-5459.100008>
- Surai, P.F., 2012. The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in

- the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 2. *Worlds. Poult. Sci. J.* 68, 717–726. <https://doi.org/10.1017/S0043933912000840>
- Surai, P.F., Fisinin, V.I., Karadas, F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* 2, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.01.001>
- Surai, P.F., Karadas, F., Pappas, A.C., Sparks, N.H.C., 2007. Effect of organic selenium in quail diet on its accumulation in tissues and transfer to the progeny. *Br. Poult. Sci.* 47, 65–72. <https://doi.org/10.1080/00071660500475244>
- Surai, P.F., Kochish, I.I., 2019. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: The case of selenium. *Poult. Sci.* 98, 4231–4239. <https://doi.org/10.3382/ps/pey406>
- Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I., Kidd, M.T., 2019. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants* 8, 1–36. <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>
- Surai, P.F., Kochish, I.I., Fisinin, V.I., Velichko, O.A., 2018. Selenium in poultry nutrition: From sodium selenite to organic selenium sources. *J. Poult. Sci.* 55, 79–93. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170132>
- Walzem, R.L., Hansen, R.J., Williams, D.L., Hamilton, R.L., 1999. Symposium: Assembly and physiology of apolipoprotein B-containing lipoproteins: Not just for heart disease anymore! Introduction. *J. Nutr.* 129, 467–472.
- Wan, X.L., Ju, G.Y., Xu, L., Yang, H.M., Wang, Z.Y., 2019. Dietary selenomethionine increases antioxidant capacity of geese by improving glutathione and thioredoxin systems. *Poult. Sci.* 98, 3763–3769. <https://doi.org/10.3382/ps/pez066>
- Wen, J., Livingston, K.A., Persia, M.E., 2019. Effect of high concentrations of dietary vitamin D3 on pullet and laying hen performance, skeleton health, eggshell quality,

and yolk vitamin D3 content when fed to W36 laying hens from day of hatch until 68 wk of age. *Poult. Sci.* 98, 6713–6720. <https://doi.org/10.3382/ps/pez386>

Wideman, R.F., Blankenship, J., Pevzner, I.Y., Turner, B.J., 2015. Efficacy of 25-OH Vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. *Poult. Sci.* 94, 1821–1827. <https://doi.org/10.3382/ps/pev160>

Zaghari, M., Sedaghat, V., Shivazad, M., 2013. Effect of vitamin E on reproductive performance of heavy broiler breeder hens. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 808–813. <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00718>

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais para codornas de postura (*Coturnix coturnix japonica*).

Ingredientes %	Exp. I e II	Exp. I e II	Exp. I e II	Exp. I	Exp. I
	Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>	Cx	VD <sub>3</sub>
Milho	61,450	61,450	61,450	61,450	61,450
Farelo de Soja	28,700	28,700	28,700	28,700	28,700
Calcário	6,600	6,600	6,600	6,600	6,600
Óleo de soja	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Fosfato Bicálcico	1,420	1,420	1,420	1,420	1,420
Premix vit+min <sup>1,2</sup>	0,400	0,400 <sup>2</sup>	0,400	0,400	0,400
Sal comum	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
DL- Metionina (98,5 %)	0,340	0,340	0,340	0,340	0,340
L-Lisina (76,5%)	0,440	0,440	0,440	0,440	0,440
Inerte <sup>3</sup>	0,100	0,070	0,000	0,000	0,075
Selênio levedura <sup>4</sup>	-	0,030	-	-	-
Cantaxantina <sup>5</sup>	-	-	0,100	0,100	-
Vitamina D <sub>3</sub> <sup>6</sup>	-	-	0,025	-	0,025
<b>Composição Calculada</b>					
Proteína bruta %	18,95	18,95	18,95	18,95	18,95
Energia metabolizável (kcal/kg)	2806	2806	2806	2806	2806
Cálcio (%)	2,99	2,99	2,99	2,99	2,99
Fósforo Disp (%)	0,3664	0,3664	0,3664	0,3664	0,3664
Sódio	0,1769	0,1769	0,1769	0,1769	0,1769
Lys dig %	1,1914	1,1914	1,1914	1,1914	1,1914
Met dig %	0,6010	0,6010	0,6010	0,6010	0,6010
Met + Cys dig %	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928
Selênio inorgânico <sup>7</sup>	0,30	-	0,30	0,30	0,30
Selênio Levedura (ppm)	-	0,30	-	-	-
Cantaxantina (ppm)	-	-	6	6	-
25-OH-D <sub>3</sub> (UI)	-	-	2.760	-	2.760

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico e mineral – Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A – 2.500.000 UI; Vit. D<sub>3</sub> – 750.000 UI; Vit. E – 6.250 UI; Vit. B1 – 880 mg; Vit. B2 – 1.600 mg/Kg; Vit. B6 – 1.300 mg/kg; Vit. B12 – 5.000 UI; Vit. K3 – 780 mg; Pantotenato de Cálcio – 3.300 mg; Niacina – 6.000 mg/Kg; Ácido fólico - 480 mg/Kg; Biotina – 50,0 mg/Kg; Colina – 75 g/Kg; Antioxidante (Butil Hidroxi Tolueno – BHT) – 1.000 mg/Kg; Zinco – 13 g/ Kg; Ferro – 13 g/Kg; Manganês – 15 g/Kg; Cobre – 3.000 mg/Kg; Cobalto – 50 mg/Kg; Iodo – 250 mg/Kg;

<sup>2</sup>O suplemento vitamínico foi adquirido sem a inclusão de selênio, que foi adicionado posteriormente sendo Selenito de sódio para a ração basal, Cx, Cx+VD<sub>3</sub> e VD<sub>3</sub> e selênio orgânico levedura para a dieta SeLev;

<sup>3</sup>Caulim

<sup>4</sup>Produto à base de levedura enriquecida com selênio e levedura seca de cervejaria, com 1.000 mg se/kg;

<sup>5</sup>Produto com nível de garantia de mínima de 6000 mg de Cx/kg;

<sup>6</sup>Produto com nível de garantia de mínima de 2.760.000 UI de 25-OH-D<sub>3</sub>

<sup>7</sup>Selenito de sódio - 0,3 ppm

**Tabela 2.** Sequências de primers utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - qRT-PCR).

Gene	T anelamento (°C)	Sequência do primer (5'-3')
<i>SOD1</i>	60	F- GGAGTGGCAGAGGTAGAAATAG R-AGGTCCAGCATTTCAGTTAG
<i>GPX7</i>	60	F-TGGTGCCTCCTTTCCTATGT R-GTTCCAGGTTGGTTCTTCTCCT
<i>β-actina</i>	60	F-GCCAACAGAGAGAAGATGAC R-CACCAGAGTCCATCACAATAC

**Tabela 3.** Desempenho produtivo, qualidade interna e externa e coloração de gema de ovos de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo substâncias antioxidantes (n=10).

	Exp. I							Exp. II						
	Dietas experimentais				Média	EPM	P-valor	Dietas experimentais				Média	EPM	P-valor
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx				Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>				
<b>Desempenho produtivo</b>														
CDR (g/ave/dia)	24,41	24,12	23,74	24,62	24,22	0,126	0,073	22,58	22,59	22,65	22,60	<0,001	0,978	
CA (kg/kg)	2,153	2,125	2,120	2,141	2,135	0,028	0,974	2,212	2,226	2,223	0,443	0,016	0,995	
CA (kg/dz)	0,464	0,453	0,450	0,455	0,453	0,005	0,815	0,443	0,443	0,443	2,220	0,003	0,931	
MO (g)	8,96	8,95	9,02	8,94	8,95	0,108	0,995	7,17	7,19	7,16	7,15	0,067	0,971	
PO (%)	80,71	81,88	82,18	82,12	81,88	0,887	0,935	85,77	85,93	85,93	85,88	0,351	0,980	
<b>Qualidade de ovo</b>														
Peso (g)	10,76	10,67	10,72	10,62	10,69	0,20	0,835	10,79	10,73	10,74	10,75	0,077	0,962	
Esp casca (mm)	0,205	0,205	0,206	0,208	0,206	0,005	0,093	0,202 <sup>b</sup>	0,202 <sup>b</sup>	0,206 <sup>a</sup>	0,203	0,004	0,004	
IG	0,49	0,49	0,48	0,48	0,485	0,002	0,119	0,481 <sup>b</sup>	0,475 <sup>b</sup>	0,492 <sup>a</sup>	0,483	0,002	0,010	
% Gema	31,60	31,52	31,72	30,75	31,399	0,151	0,146	31,02 <sup>b</sup>	31,728 <sup>b</sup>	32,13 <sup>a</sup>	31,61	0,170	0,020	
% Casca	7,45	7,67	7,50	7,68	7,547	0,036	0,079	7,55	7,61	7,525	7,56	0,051	0,777	
% Albúmen	60,97	61,392	60,95	62,86	61,543	0,289	0,151	61,37	61,03	60,99	61,13	0,218	0,749	
UH	87,04	87,05	86,97	86,83	86,972	0,167	0,981	88,56 <sup>a</sup>	87,61 <sup>ab</sup>	86,69 <sup>b</sup>	84,622	0,282	0,020	
GE (g/cm <sup>3</sup> )	1,060	1,070	1,070	1,070	1,066	0,000	0,094	1,065	1,066	1,065	1,066	0,000	0,628	
<b>Coloração da gema</b>														
Luminosidade	52,98 <sup>a</sup>	52,83 <sup>a</sup>	53,44 <sup>a</sup>	51,94 <sup>b</sup>	0,116	0,116	0,0001	53,072	52,794	53,212	53,026	0,265	0,810	
Intensidade a*	-2,03 <sup>b</sup>	-1,94 <sup>b</sup>	-1,78 <sup>b</sup>	13,02 <sup>a</sup>	1,816	1,035	<0,001	-1,991 <sup>b</sup>	-1,882 <sup>b</sup>	12,279 <sup>a</sup>	2,801	1,247	<0,001	
Intensidade b*	31,97 <sup>b</sup>	32,48 <sup>a</sup>	32,72 <sup>a</sup>	32,01 <sup>a</sup>	32,299	0,135	0,0281	31,775 <sup>b</sup>	32,947 <sup>a</sup>	32,708 <sup>a</sup>	32,471	0,166	0,004	

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio; CDR= consumo de ração, CA= conversão alimentar, MO= massa de ovos, PO= porcentagem de postura; IG= índice de gema; UH= Unidade Haugh, GE= gravidade específica.



**Tabela 4.** Bioquímica sérica de reprodutores e matrizes de codornas alimentadas com dietas contendo substâncias antioxidantes (n=10).

	Exp I							Exp II					
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx	Média	EPM	P-valor	Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>	Média	EPM	P-valor
Machos													
TG (mg/dL)	145,96 <sup>a</sup>	105,24 <sup>b</sup>	144,87 <sup>a</sup>	126,24 <sup>ab</sup>	134,34	5,447	0,023	170,375 <sup>a</sup>	122,87 <sup>b</sup>	129,54 <sup>b</sup>	141,13	25,59	<0,001
Col (mg/dL)	249,52	232,03	277,65	233,99	240,68	6,484	0,072	252,95 <sup>a</sup>	235,41 <sup>b</sup>	242,95 <sup>b</sup>	243,77	11,60	0,0005
PT (g/L)	4,00 <sup>a</sup>	3,569 <sup>b</sup>	3,56 <sup>b</sup>	3,45 <sup>b</sup>	3,64	0,039	<0,001	4,17 <sup>a</sup>	3,68 <sup>b</sup>	3,51 <sup>b</sup>	3,68	0,361	<0,001
Fêmeas													
TG (mg/dL)	800,65 <sup>a</sup>	571,44 <sup>b</sup>	601,53 <sup>b</sup>	652,34 <sup>ab</sup>	643,38	26,62	0,022	782,64 <sup>a</sup>	563,42 <sup>b</sup>	543,21 <sup>b</sup>	645,72	22,34	<0,001
Col (mg/dL)	175,75 <sup>a</sup>	127,00 <sup>ab</sup>	125,56 <sup>b</sup>	157,10 <sup>ab</sup>	148,29	5,983	0,011	202,50 <sup>a</sup>	156,250 <sup>b</sup>	182,60 <sup>a</sup>	180,32	5,060	<0,001
PT (g/L)	4,85 <sup>a</sup>	3,266 <sup>b</sup>	3,60 <sup>b</sup>	3,38 <sup>bc</sup>	3,61	0,102	<0,001	4,92 <sup>a</sup>	3,86 <sup>b</sup>	3,73 <sup>b</sup>	4,16	0,108	<0,001

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura; TG= triglicérides, Col= colesterol, PT= proteínas totais; EPM= erro padrão médio

**Tabela 5.** Capacidade redutora dos radicais ABTS<sup>+</sup> e DPPH na gema de ovo, tecido hepático e soro de reprodutores e matrizes de codorna de postura alimentadas com dietas contendo substâncias antioxidantes (n=3).

Variável	Exp I				Média	EPM	P-valor	Exp II				Média	EPM	P-valor
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx				Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>				
<i>Capacidade de inibição ABTS (%)</i>														
Soro fêmea	62,94 <sup>b</sup>	63,31 <sup>b</sup>	64,32 <sup>b</sup>	66,80 <sup>a</sup>	64,35	0,480	0,0004	58,53	59,18	59,73	59,15	0,312	0,335	
Fígado fêmea	44,68 <sup>b</sup>	47,42 <sup>a</sup>	47,29 <sup>a</sup>	48,62 <sup>a</sup>	47,05	0,453	0,0001	49,95 <sup>b</sup>	53,30 <sup>a</sup>	53,62 <sup>a</sup>	52,29	0,660	0,009	
Soro macho	43,34 <sup>b</sup>	41,23 <sup>c</sup>	42,10 <sup>bc</sup>	45,50 <sup>a</sup>	43,44	0,504	<0,001	46,97	43,48	43,48	44,64	0,796	0,101	
Fígado macho	42,05 <sup>b</sup>	45,63 <sup>a</sup>	47,61 <sup>a</sup>	45,95 <sup>a</sup>	45,31	0,640	0,0002	41,78 <sup>b</sup>	44,76 <sup>a</sup>	45,82 <sup>a</sup>	44,15	0,632	0,006	
Gema	9,61	10,48	10,71	11,63	10,61	0,434	0,491	20,55	19,78	20,69	20,33	0,291	0,441	
<i>Capacidade de inibição DPPH (%)</i>														
Soro fêmea	31,15 <sup>b</sup>	34,29 <sup>a</sup>	34,75 <sup>a</sup>	35,00 <sup>a</sup>	33,80	0,490	0,0002	39,41 <sup>b</sup>	42,70 <sup>a</sup>	42,50 <sup>a</sup>	41,54	0,551	0,003	
Fígado fêmea	41,69 <sup>b</sup>	46,04 <sup>a</sup>	45,64 <sup>a</sup>	45,03 <sup>a</sup>	44,60	0,540	<0,001	44,07 <sup>b</sup>	55,26 <sup>a</sup>	54,45 <sup>a</sup>	51,26	1,806	<0,001	
Soro macho	26,69 <sup>b</sup>	28,21 <sup>a</sup>	27,60 <sup>ab</sup>	29,02 <sup>a</sup>	27,88	0,291	0,005	32,47	34,44	34,19	33,70	0,398	0,061	
Fígado macho	42,04 <sup>b</sup>	45,94 <sup>a</sup>	46,25 <sup>a</sup>	45,64 <sup>a</sup>	45,94	0,535	0,0001	44,88 <sup>b</sup>	51,21 <sup>a</sup>	51,16 <sup>a</sup>	49,08	1,052	<0,001	
Gema	6,02 <sup>b</sup>	14,03 <sup>a</sup>	11,75 <sup>ab</sup>	10,13 <sup>b</sup>	14,03	1,040	0,0138	18,03 <sup>b</sup>	21,32 <sup>a</sup>	20,66 <sup>a</sup>	20,01	0,522	0,0004	

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio.

**Tabela 6.** Análise de peroxidação lipídica determinada pela concentração de MDA/g de tecido liofilizado pelo método de TBARS na gema do ovo e tecido hepático de reprodutores(as) de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo diferentes substâncias antioxidantes (n=3).

Exp. I							
MDA/g	Basal	SeLev	Cx	VD <sub>3</sub>	Média	EPM	P-valor
Gema	2,826 <sup>b</sup>	3,022 <sup>b</sup>	3,623 <sup>a</sup>	2,942 <sup>b</sup>	3,103	0,102	0,0024
Fígado fêmea	15,409	14,882	16,217	16,910	15,854	0,312	0,077
Fígado macho	16,566 <sup>ab</sup>	15,293 <sup>c</sup>	16,402 <sup>b</sup>	16,889 <sup>a</sup>	16,288	0,186	<0,001
Exp II							
MDA/g	Basal	SeLev	CX+VD <sub>3</sub>	Média	EPM	P-valor	
Gema	3,169 <sup>b</sup>	3,061 <sup>b</sup>	3,539 <sup>a</sup>	3,256	0,080	0,006	
Fígado fêmea	15,077 <sup>b</sup>	15,534 <sup>b</sup>	17,103 <sup>a</sup>	15,904	0,351	0,0135	
Fígado macho	13,782 <sup>ab</sup>	13,313 <sup>b</sup>	14,587 <sup>a</sup>	13,894	0,215	0,016	

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio

**Tabela 7.** Atividade da enzima Superóxido Dismutase no fígado de codornas japonesas alimentadas com substâncias antioxidantes (n=4).

	Tratamentos				Média	EPM	P-valor
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx			
USOD/mg de proteína	1,359	1,166	1,406	1,160	1,274	0,047	0,386

Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio; EMP= erro padrão médio

**Tabela 8.** Expressão relativa dos genes da glutatona peroxidase (*GPX7*) e da superóxido dismutase (*SOD1*) na mucosa da vagina de reprodutoras de codornas japonesas com 26 semanas (n=5).

	Tratamentos				Média	EMP	Valor de P
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx			
<i>GPX7</i>							
Vagina	0,021	0,014	0,014	0,018	0,017	0,001	0,183
Fígado fêmea	0,007	0,002	0,005	0,005	0,005	0,000	0,200
<i>SOD1</i>							
Vagina	0,164	0,167	0,128	0,179	0,160	0,010	0,319
Fígado fêmea	0,007	0,002	0,005	0,005	0,005	0,000	0,200

Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio; EMP= erro padrão médio

## IV– Artigo 2

### **Substâncias antioxidantes melhoram os parâmetros de fertilidade das matrizes e a qualidade de pintos de codorna**

#### **Resumo**

Foram avaliados o desempenho da progênie, qualidade da incubação e fertilidade frente a administração de substâncias antioxidantes na dieta das matrizes e reprodutores de codornas. Foram realizados três experimentos: Experimento I composto por quatro tratamentos sendo: Basal: com 0,3 ppm de selenito de sódio (SS); SeLev: dieta basal sem SS + 0,3 ppm selênio orgânico Levedura; CX: dieta basal + 6 ppm de cantaxantina; VD<sub>3</sub>: dieta basal + 2.760 UI de 25-hidroxicalciferol. Experimento II: dieta SS; dieta basal + associação de Cantaxantina e Vitamina D3 e T3; ração formulada sem selenito de sódio com a inclusão de Selênio Orgânico Levedura, Exp. III foram utilizadas as dietas SS, SeLev, CX, CX+ VD<sub>3</sub> e VD<sub>3</sub>. Os ovos oriundos dos reprodutores foram coletados e incubados para coleta de amostras de vitelo e fígado de embriões (15 dias de incubação e dia da eclosão e 3 dias de idade). O desempenho da progênie foi avaliado até 35 dias de idade. Os dados foram submetidos a análise de variância e considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Houve diferença significativa no comprimento das aves sendo que em ambos os experimentos os pintos dos tratamentos com antioxidantes foram mais compridos. O consumo de ração foi maior a conversão alimentar foi pior nos tratamentos com substâncias antioxidantes quando comparados com o tratamento basal nos dois experimentos. Em ambos os experimentos, os tratamentos com antioxidantes apresentaram resultados superiores frente o basal para a atividade antioxidante dos radicais ABTS+ e DPPH no vitelo e no fígado com 1 dia de idade, o radical ABTS+ apresentou o mesmo comportamento no vitelo com 15 dias de incubação, a peroxidação lipídica também foi melhor nos tratamentos antioxidantes. A utilização de SeLev, CX, CX+ VD<sub>3</sub> e VD<sub>3</sub> promoveram melhora na probabilidade de fertilidade e PHMP. A adição de substâncias com potencial antioxidante na dieta de matrizes confere status antioxidante melhor na sua progênie até os 15 dias de idade.

**Palavras-chave:** Carotenoide, fertilidade, hidroxicalciferol, selênio levedura, reprodução.

## 1. Introdução

A nutrição do embrião durante a fase de incubação e nos primeiros dias pós-eclosão é dependente dos nutrientes recebidos do conteúdo do ovo que são obtidos da dieta materna. Assim, o sucesso do desenvolvimento embrionário depende de condições adequadas de incubação aliados a qualidade dos nutrientes que a reprodutora recebe (Surai et al., 2016).

A suplementação de vitaminas e minerais na dieta dos reprodutores tem mostrado efetiva melhor desempenho da incubação e posteriormente nas primeiras semanas de vida das aves. Dentre os minerais, o selênio (Se) tem papel importante por participar ativamente do mecanismo antioxidante das aves. A suplementação de Se orgânico na dieta de matrizes pode aumentar a concentração de Se no tecido de codornas por até duas semanas após a eclosão (Surai et al., 2006) promovendo proteção a mais no pinto recém-nascido que será exposto a diversos agentes estressores.

Dentre as substâncias que auxiliam no desenvolvimento embionário, A vitamina D na forma do metabólito 25(OH)D<sub>3</sub> se faz mais disponível ao organismo auxiliando na calcificação do embrião favorecendo seu desenvolvimento, e conseqüentemente melhorando parâmetros como eclodibilidade (Soares et al., 1995).

Os carotenoides desempenham papel antioxidante na eliminação de radicais causadores do estresse oxidativo (Agarwal et al., 2012; Surai et al., 2016). A cantaxantina é transferida da gema para o embrião e distribuída em órgãos e tecidos (Surai et al., 2003), e o efeito antioxidante já é relatado, mas ainda há um campo vasto para elucidar seu efeito na progênie, assim como o estudo de sua associação com a vitamina D<sub>3</sub> (Bonilla et al., 2017; Bonagurio et al., 2020). Dessa forma, a associação de Cx e o metabólito 25-(OH)D<sub>3</sub> vêm demonstrando efeito sobre diversos parâmetros na avicultura, como melhora na capacidade antioxidante, na qualidade da casca do ovo e nos índices

reprodutivos (Araujo et al., 2019; Bonagurio et al., 2020).

Utilizando codornas como modelo animal, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes substâncias com potencial antioxidante na dieta de reprodutores de codornas japonesas e seu efeito sobre o desempenho reprodutivo, de incubação e da progênie bem como na atividade antioxidante e peroxidação lipídica do fígado e vitelo.

## 2. Material e Métodos

A pesquisa envolvendo animais foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (nº 7846161115).

### 2.1 *Delineamento experimental e dietas*

Três experimentos foram conduzidos na cidade de Maringá, estado do Paraná, Brasil (23°25' de latitude sul e 51°57' de longitude oeste de Greenwich e 550m de altitude). As dietas foram formuladas baseadas em milho e farelo de soja (Tabela 1), de acordo com a composição dos ingredientes e exigências nutricionais para codornas em fase de postura das tabelas brasileiras de aves e suínos (Rostagno et al. 2017). Os tratamentos formulados foram:

Controle (SS): dieta com 0,3 ppm selênio (selenito de sódio -  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ );

SeLev: dieta controle sem SS + 0,3 ppm Se orgânico Levedura;

Cx: Dieta SS + 6 ppm de cantaxantina;

Cx+VD<sub>3</sub>: Dieta SS + 6 ppm cantaxantina + 2.760 UI de 25-hidroxicolicalciferol;

VD<sub>3</sub>: Dieta SS + 2.760 UI de 25-hidroxicolicalciferol.

Para as aves do Exp. I foram fornecidas as dietas: Basal, SeLev, Cx e VD<sub>3</sub>. No Exp. II foram utilizadas apenas as dietas: Basal, SeLev e Cx+VD<sub>3</sub>. As aves do Exp. III receberam os cinco tratamentos.

As aves foram adaptadas as dietas por 14 dias antes do início do primeiro ciclo experimental. As rações foram preparadas e misturadas a cada 15 dias e armazenadas em sacos escuros e ambiente seco e protegido da luz.

Os experimentos foram realizados na mesma instalação, um galpão de produção dotado de gaiolas de arame galvanizado (25 × 39 cm), com bebedouros do tipo *nipple* e comedouros do tipo calha. O alimento e a água eram fornecidos à vontade e o programa de luz adotado foi de 17 horas de luz (natural + artificial) durante todo o período experimental. A temperatura e a umidade foram medidas diariamente durante todo o período experimental com auxílio de termo-higrômetro digital.

#### *Exp. I*

Duzentas fêmeas e 80 machos com 16 semanas de idade, foram selecionados pelo peso médio ( $\pm 167$  g para fêmeas e 129 g para machos) distribuídas em delineamento experimental inteiramente ao acaso com quatro tratamentos, dez repetições de 7 aves (5 fêmeas e 2 machos). As médias para temperatura foram 31,28°C e 19,24°C e para umidade 67,02% e 34,15%, máxima e mínima respectivamente.

#### *Exp. II*

Duzentos e dez reprodutores de codornas de postura (150 fêmeas com peso médio 172g e 60 machos com peso médio de 130g) com 18 semanas de idade foram distribuídos em 3 tratamentos, cada um com dez repetições, sendo a gaiola a unidade experimental e cada uma delas composta por cinco fêmeas e dois machos. As médias para temperatura foram 31,28°C e 19,24°C e para umidade 67,02% e 34,15%, máxima e mínima.

### *Exp. III*

No Experimento III foram utilizadas 100 fêmeas ( $\pm 164\text{g}$ ) e 50 machos ( $\pm 124\text{g}$ ) com 18 semanas de idade, distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso, cinco dietas e dez repetições por tratamento. O efeito foi avaliado em três situações: apenas as fêmeas receberam as dietas experimentais; ambos os sexos e apenas os machos receberam as respectivas dietas e as fêmeas consumiram a dieta basal (Quadro 1).

A temperatura apresentou amplitude entre  $30,17^{\circ}\text{C}$  e  $18,26^{\circ}\text{C}$  máxima e mínima e umidade entre  $70,25\%$  e  $32,56\%$ .

### *2.2 Desempenho da incubação e qualidade do pintinho (Exp. I e II)*

O protocolo experimental de coleta, armazenagem, incubação e análises foram os mesmos para ambos os experimentos. Os ovos das gaiolas foram coletados por 4 dias consecutivos, identificados por gaiola e armazenados em sala refrigerada ( $18$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da incubação. Os ovos foram incubados em incubadora automática Petersime<sup>®</sup> a  $60\%$  de umidade e  $37,4^{\circ}\text{C}$ , com viragem automática. Ao atingir 348 horas de incubação, os ovos foram transferidos para a câmara de eclosão com temperatura de  $37,0^{\circ}\text{C}$  e umidade de  $70\%$ , até o momento da eclosão totalizando 408 horas de incubação ( $\pm 18$  dias).

Os ovos eclodidos e não eclodidos foram contabilizados e as variáveis de incubação foram calculadas. Os ovos que não eclodiram foram abertos e identificados como ovos inférteis e ou embriões mortos. O desenvolvimento embrionário foi utilizado para classificar a mortalidade em inicial e média (1 a 11 dias), e final (12 dias até eclosão). O número de ovos em cada categoria foi utilizado para estimar as variáveis de:

Eclodibilidade (%) =  $(\text{total de ovos eclodidos} \div \text{total de ovos incubados}) \times 100$ ;

Fertilidade (%) =  $(\text{ovos férteis} \div \text{ovos totais}) \times 100$ ;



Infertilidade (%) =  $(total\ de\ ovos\ brancos \div total\ de\ ovos\ incubados) \times 100$ ;

Mortalidade<sub>total</sub> (%) =  $(total\ de\ ovos\ férteis\ não\ eclodidos \div total\ de\ ovos\ férteis) \times 100$ ;

Mortalidade<sub>inicial</sub> (%) =  $(total\ de\ ovos\ férteis\ não\ eclodidos\ (início\ e\ meio) \div mortalidade\ total) \times 100$ ;

Mortalidade<sub>tardia</sub> (%) =  $(total\ de\ ovos\ férteis\ não\ eclodidos\ e\ na\ casca\ (final) \div mortalidade\ total) \times 100$ .

Com os pintos nascidos a termo foi realizada a avaliação de qualidade pelo escore de Pasgar® e são contabilizados o reflexo; a cicatrização do umbigo; o grau de absorção do vitelo; presença de lesão no bico e problemas locomotores. Esse escore confere nota de 1 a 10 a cada ave descontando um ponto a cada irregularidade observada. As aves também foram pesadas em balança semianalítica e utilizando uma régua, as aves tiveram medido seu comprimento, sendo esse considerado da falange média ao bico. Foram analisadas 50 aves por tratamento, sendo cada ave uma unidade experimental.

### 2.3 Desempenho da progênie (Exp I e II)

O desempenho da progênie foi analisado em pintinhos provenientes de cada tratamento em que os reprodutores(as) receberam as dietas experimentais. Cada tratamento foi composto por três unidades experimentais com 30 aves cada com peso médio de 7,93 g para o Exp. I e 7,96 g para o Exp. II. As aves foram alojadas em um galpão convencional, com boxes (2,5 x 1 m) com cama de palha de arroz. Até aos 14 dias de idade campânulas de aquecimento foram utilizadas a fim de garantir o conforto térmico das aves iniciando com 35°C até a temperatura ambiente. Cada box era dotado de um bebedouro infantil tipo “copo”, que a partir da segunda semana foi substituído por um

bebedouro pendular, e durante todo o período foi utilizado comedouro tubular com regulagem de altura.

Diariamente foram contabilizadas as mortalidades, e a cada semana o consumo de ração foi anotado através da diferença do peso do balde no primeiro dia da semana e no último. Aos quatorze e aos 35 dias de idade, as aves foram pesadas para posterior tomada dos parâmetros de desempenho produtivo, que foram avaliados através do consumo médio de ração (g), ganho de peso (g) peso médio (g) e conversão alimentar. A proporção macho:fêmea foi contabilizada por unidade experimental no último dia do experimento e utilizado como covariável na análise estatística.

#### *2.4 Capacidade antioxidante DPPH e ABTS (Exp. I e II)*

A capacidade antioxidante foi medida no fígado de pintos de 1 dias de idade e 3 dias após o nascimento, e no vitelo aos 15 dias de incubação e no dia da eclosão. Ela foi realizada pela análise de inibição (%) dos radicais ABTS<sup>+</sup> (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A partir de 100 mg de tecido (1:19; m/v em metanol) extratos foram preparados e em seguida homogeneizados (Phoenix lufenco, AP22, Araraquara, BR) e centrifugados a 3000 rpm por 20 min (MPW Med. Instruments, MPW-351R, Varsóvia, PL) e realizada a coleta de sobrenadante para análise.

A determinação da atividade antioxidante realizada pelo método ABTS<sup>+</sup> foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999) com modificações. O cátion ABTS<sup>+</sup> foi formado incubando ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) por 16 horas à temperatura ambiente em condições escuras. Para a análise o radical ativado ABTS foi diluído com etanol até a absorbância de  $0,70 \pm 0,02$ , e 1960 µl dessa

solução. A absorvância foi medida após 6 min a 734 nm e a atividade antioxidante (%) foi calculada usando a equação:

$$ABTS (\%) = \left( 1 - \left( \frac{\text{amostra A}}{\text{amostra At0}} \right) \right) \times 100, \text{ em que: Amostra A = absorvância da amostra}$$

em 6 minutos e, Amostra At0= absorvância da amostra no tempo zero.

O método de inibição do radical DPPH também foi utilizado para análise antioxidante no fígado e vitelo de codornas (n=03) de acordo com Li et al. (2009), com modificações. A solução do radical DPPH (Sigma-Aldrich, D9132, Saint Louis, EUA) foi preparada em metanol (60 µM) a qual foi adicionada 2850 µl a 150 µl de extrato das amostras. As leituras deram-se após 30 min (ao abrigo da luz) a 515 nm de comprimento de onda, sendo a inibição calculada pela seguinte equação:

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = \left( 1 - \left( \frac{\text{abs amostra}}{\text{abs DPPH}} \right) \right) \times 100, \text{ sendo Abs amostra =}$$

absorvância da amostra e Abs DPPH = absorvância do radical DPPH.

### 2.5 Peroxidação lipídica Exp (I e II)

No tecido hepático (1 dia e 3 dias de idade) e no vitelo de codornas aos 15 dias de incubação e 1 dia de idade foi determinada a peroxidação lipídica através da mensuração da produção de malonaldeído (MDA) por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com metodologia adaptada de Vital et al. (2016). O tecido hepático e o vitelo foram misturados em solução de TCA - Ácido Tricloroacético (15% TCA, 0,1% ácido etilenodiamino tetra-acético e 0,1% ácido gálico) (1:19, m/v) e centrifugado a 4°C por 15 min a 3.000 rpm (MPW Med. Instruments, MPW-351R, Varsóvia, PL) sendo então o sobrenadante coletado. Em tudo protegido da luz, adicionou-se a solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% TBA, 562,5 µM HCl e 15% TCA, em água destilada) e extrato (1:1, v/v), seguido de banho fervente durante 15 minutos a 100°C. Após o banho as amostras foram resfriadas e realizou-se leitura em

espectrofotômetro (Thermo Scientific™, Evolution™ 212 300 UV-VIS, Waltham, USA) a 532 nm de comprimento de onda. TBARS foi expresso em  $\mu\text{g}$  e MDA/g de tecido calculado usando curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) 1mM como padrão.

## 2.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada no tecido hepático de pintinhos no primeiro dia de vida, e foi estimada a partir da capacidade de inibição da autoxidação do pirogalol em meio alcalino a 420 nm (Marklund e Marklund, 1974).

Os pintinhos foram insensibilizados e posteriormente sacrificados e o fígado coletado e acondicionado em tubos criogênicos e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Aproximadamente 250 mg de tecido hepático congelado foi homogeneizado em solução tampão d(Tris-HCL 200 Mn + EDTA 2mM) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ) o sobrenadante foi coletado e seguindo a metodologia de Lowry et l (1951) a proteína foi dosada. Em cubeta de quartzo foi adicionado  $\pm 25 \mu\text{L}$  de sobrenadante juntamente com solução tampão ( $\pm 975 \mu\text{l}$ ) e pirogalol ( $70 \mu\text{L}$ ; 15mM) e colocados diretamente em espectrofotômetro (Thermo Scientific™, Evolution™ 300 UV-VIS, Waltham, USA).

As leituras foram realizadas a 420 nm durante 180 segundos e os resultados calculados para UI/mg proteína. A quantidade suficiente para inibir a reação enzimática em 50% (IC50) foi definida como 1 unidade de SOD, e os resultados foram expressos em USOD/mg de proteína.

### 2.7 *Interação ovo:espermatozóide - Exp III*

Machos e fêmeas ficaram separados por vinte dias antes de cada situação experimental (Quadro 1). Para o início do período experimental os machos eram colocados nas gaiolas das fêmeas formando casais e permaneciam por 24 horas para que a cópula fosse realizada, e depois foram retirados das gaiolas. Os ovos foram coletados diariamente por um período de 12 dias consecutivos, armazenados a 4°C e analisados.

Os ovos foram abertos com auxílio de uma tesoura, observada a fertilidade pela forma do disco germinativo (Figura 1), a gema era separada da clara, e sobre o disco germinativo era posicionado um fragmento de papel filtro perfurado centralmente que serviu como molde para o corte do fragmento de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> da membrana perivitelinica. Esse corte era então limpo com solução de NaCl 1% para retirada do vitelo, e colocado sob lâmina histológica, a fixação era realizada com solução de formol 10% durante 2 minutos, depois as lâminas foram lavadas com água destilada, e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) por 5 minutos, novamente lavadas com água destilada e secavam a temperatura ambiente. Depois de secas as lâminas coradas foram analisadas em microscópio ótico de luz e todos os PHMP foram contados em uma área de 25,79 mm<sup>2</sup> na lente objetiva de 4x (Figura 1).

### 2.8 *Análise Estatística*

Os dados de desempenho de progênie e qualidade de pintinho foram submetidos ao teste de Tukey com nível de 5% de significância utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS, 1999),

Os dados de desempenho de incubação foram analisados para determinar a probabilidade de fertilidade ou infertilidade, eclodibilidade ou mortalidade total e

mortalidade inicial ou tardia foram analisadas em procedimentos GENMOD do SAS, com distribuição binomial e função de ligação, sendo  $\text{LOGIT} = \text{Exp}(\beta) / 1 + \text{Exp}(\beta)$ .

O efeito das dietas e dos dias após a cópula sobre o número de PHMP foi analisado por distribuição de Poisson e função Log, sendo  $\text{Log} = \text{Exp}(\beta)$ .

### **3. Resultados**

#### *3.1 Desempenho da incubação e qualidade do pintainho*

Na Tabela 2, observam-se os achados para o desempenho da incubação referentes aos Exp. I e II através da fertilidade, infertilidade, eclodibilidade e mortalidade embrionária. Os resultados para porcentagem de fertilidade e infertilidade não foram influenciados pela dieta das matrizes. As dietas suplementadas com SeLev, Cx, Cx+VD<sub>3</sub> e VD<sub>3</sub> resultaram em maior taxa de eclodibilidade total e sobre os ovos férteis, e em menor mortalidade em comparação com a dieta basal com SS.

A pontuação do score de Pasgar® não apresentou diferenças entre os tratamentos (Tabela 3). Também foi observado que o peso dos pintos não diferiu estatisticamente entre as dietas das matrizes. Já o comprimento dos pintos provenientes das matrizes que receberam substâncias antioxidantes na dieta foi maior quando comparados ao suplementado com selenito de sódio ( $P < 0,05$ ).

#### *3.2 Desempenho da progênie*

Os dados apresentados na Tabela 7 são referentes ao desempenho da progênie analisados no período de 1-14 dias e 15-35 dias de idade. O consumo de ração para ambos os experimentos foi afetado no período inicial (1 a 14 dias), sendo que os pintos provenientes das matrizes que receberam a dieta SS apresentaram maior consumo de

ração que os demais ( $P < 0,05$ ) e conseqüentemente pior conversão alimentar nos Experimentos I e II no período de 1-14 dias. Para o período de 15 a 35 dias de idade as variáveis não foram influenciadas pelas dietas dos reprodutores e matrizes ( $P > 0,05$ ).

### 3.3 *Atividade da enzima antioxidante (SOD), capacidade antioxidante e peroxidação lipídica*

A capacidade de inibição dos radicais DPPH e ABTS+ foi avaliada no vitelo (15 dias de incubação e 1 dia de idade) e no tecido hepático dos pintos com 1 dia de idade e 3 dias. Os pintos resultantes dos tratamentos Cx, VD<sub>3</sub>, SeLev e Cx+VD<sub>3</sub> apresentaram capacidade antioxidante melhor, quando analisada a redução do radical ABTS+, quando comparados ao tratamento basal, no tecido hepático e vitelo coletados no dia 1.

Em relação a capacidade redutora do radical DPPH, maior capacidade antioxidante foi observada no vitelo e no fígado das aves que também foram provenientes dos tratamentos antioxidantes, mas apenas no primeiro dia de vida para ambos os tecidos, nos dois experimentos ( $P < 0,05$ ).

Através da concentração de malonaldeído (MDA) foi mensurada a peroxidação lipídica das amostras de vitelo (15 dias de incubação e 1 dia de idade) e tecido hepático (1 dia e 3 dias de idade). O valor de MDA nas amostras do tratamento SS foi superior aos antioxidantes no vitelo nas duas idades e para o fígado no dia 1 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5).

A atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase não apresentou diferenças entre os tratamentos estudados apresentados em média 1,242 de atividade (Tabela 6).

### 3.4 *Interação espermatozoide:ovo*

A interação entre os espermatozoides e o ovo foi estudada pela contagem de PHMP

em uma área sobre o disco germinativo e pela probabilidade de fertilidade dos ovos.

Na Figura 3 são apresentados os resultados das contagens dos pontos de hidrólise na membrana perivitelínica. A contagem de PHMP no tratamento em que o casal foi avaliado, apresentou contagem superior a 190 PHMP no primeiro dia pós-cópula para os antioxidantes, enquanto para o tratamento basal foi de 130 PHMP ( $P < 0,05$ ).

No estudo em que as fêmeas receberam as dietas experimentais e todos os machos a basal, houve diferença estatística para o número de PHMP e entre os dias após a cópula ( $P < 0,05$ ).

No tratamento em que apenas os machos receberam os antioxidantes a partir do 5º dia após a cópula já foi notada diminuição na probabilidade de fertilidade (Figura 2 C), sendo que nesta avaliação, o tratamento Cx+VD<sub>3</sub> apresentou duração provável de fertilidade superior aos demais ( $P < 0,05$ ). O número de PHMP para a administração de antioxidantes apenas na dieta dos machos também foi diferente entre o tratamento Cx+VD<sub>3</sub> e os demais (Figura 3 C).

## **4. Discussão**

### *4.1 Desempenho da incubação e qualidade do pintinho*

Os resultados demonstram que a inclusão de substâncias como Selênio levedura, cantaxantina e 25(OH)D<sub>3</sub> possuem a capacidade de melhorar variáveis de desempenho relacionadas a incubação. Um incremento de quase 10% na taxa de eclodibilidade e, conseqüente, diminuição na de mortalidade são de grande valia para a indústria de ovos férteis.

O uso do selênio orgânico vem sendo demonstrado efetivo frente o uso do SS, pelo fato que o SS não é armazenado como reservas no corpo. Dessa forma, a transferência da



matriz para o ovo e o embrião podem ficar comprometidas (Surai et al., 2007). Neste estudo, a suplementação com selênio orgânico melhorou a taxa de eclodibilidade, assim como promoveu a redução da porcentagem da mortalidade total. Também em codornas japonesas, Madkour et al. (2015), verificaram aumento nas porcentagens de fertilidade e eclodibilidade dos ovos independentes da idade das matrizes (jovens as 16 semanas e velhas 40 semanas de idade), que foram suplementadas com Se orgânico levedura (doses de 0,3, 0.5 e 1.0 mg SeLev/Kg dieta) frente codornas que receberam SS na dieta.

O metabólito  $25(\text{OH})\text{D}_3$  é transportado para o ovo fértil, aumentando potencialmente o status da vitamina D e a eficiência das funções dependentes da vitamina D no organismo do embrião. Araújo et al. (2019), também encontraram resultados positivos nos parâmetros de incubação ao submeter matrizes de corte a duas dietas, sendo uma dieta com a suplementação de  $\text{Cx}+25(\text{OH})\text{D}_3$  e uma dieta basal. Os autores encontraram melhores resultados para as porcentagens de fertilidade, eclodibilidade e redução na taxa de mortalidade embrionária dos ovos resultantes das matrizes alimentadas com  $\text{Cx}+\text{VD}_3$  na dieta em comparação com a basal. Resultados parecidos também foram relatados por Saunders-Blades e Korver (2015), que ao estudarem a suplementação do metabólito 25-OHD ou  $25(\text{OH})\text{D}_3$  na dieta de matrizes de corte avaliando seus efeitos isoladamente e frente uma dieta basal, observaram redução da mortalidade embrionária durante todo o período de incubação.

O uso da cantaxantina isoladamente é utilizado para pigmentação do ovo, mas o potencial antioxidante dessa molécula também vem sendo averiguado e indicando resultados de melhora de fertilidade e aumento no número de ovos férteis (Rosa et al., 2012; Surai et al., 2003). Estes resultados também se assemelham ao de Rosa et al., (2012) que relataram aumento na eclodibilidade total e eclodibilidade de ovos férteis de galinhas alimentadas com 6 ppm de cantaxantina.

Dentre as características utilizadas como parâmetro para predição da qualidade do pinto ao nascimento algumas das mais utilizadas são o escore de Pasgar, o comprimento do pinto e o peso do pinto ao nascimento pela facilidade de serem realizadas no momento da eclosão dos ovos. E, neste estudo, o escore de Pasgar e o peso do pinto não diferiram entre os tratamentos, considerando que as matrizes e reprodutores de todos os tratamentos apresentavam a mesma idade e dessa forma, a homogeneidade de pesos pode ser atribuída a maior uniformidade do peso dos ovos dentre os tratamentos.

O comprimento do pinto vem se mostrando um método confiável de avaliação da qualidade visual em frangos de corte, diferente do peso da ave que está incluso um porcentual de gema residual que torna difícil a estimativa (Mukhtar et al., 2013). As aves que foram resultantes das matrizes com antioxidantes na dieta apresentaram comprimento superior aos descendentes das aves SS. Em frangos de corte cada centímetro extra que os pintos apresentaram no primeiro dia de vida, representa aumento de 18 gramas no peso corporal aos sete dias de idade (Molenaar e Reijrink, 2011). O comprimento do pinto pode estar relacionado a diversos fatores como níveis de metabólitos circulantes no organismo, assim os antioxidantes na dieta das matrizes podem ter contribuído para o aumento de metabólitos no organismo dos embriões e favorecido seu desenvolvimento (Decuypere e Bruggeman, 2007).

Bonagurio et al, (2022) também encontrou um efeito quadrático positivo no comprimento do pintinho de 1 dia de vida e na pontuação Pasgar em aves que receberam cantaxantina e VD<sub>3</sub>, os autores associam esses resultados a capacidade antioxidante das substâncias. Estes resultados comprovam que, independentemente do antioxidante que seja suplementado seu uso mesmo em aves em condições ideais de produção e durante a incubação, promovem melhora nos parâmetros de incubação.

#### 4.2 *Desempenho da progênie*

A conversão alimentar depende do consumo de ração do animal em determinado período, e a resposta dada na transformação desse alimento em produto, carne ou ovos. Quando há alto consumo de ração, conseqüentemente haverá taxa de conversão alimentar pior. E, neste experimento, no período de 1 - 14 dias de idade a conversão alimentar diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) sendo que os animais provenientes das matrizes que receberam o tratamento SS apresentaram a pior taxa de conversão alimentar. No entanto, esse aumento de consumo não refletiu em aumento de ganho de peso aos 14 ou 35 dias de idade.

A nutrição materna é relevante não somente para o desenvolvimento do embrião durante o processo de incubação, mas diversos estudos apontam que ela também pode interferir no desenvolvimento inicial pós-eclosão das aves (Bonagurio et al., 2020; Bonilla et al., 2017; Surai et al., 2016). Pappas et al. (2006) não encontrou diferença no ganho de peso e consumo de ração, mas a concentração de selênio nos tecidos dos pintos provenientes de matrizes recebendo suplementação de selênio orgânico se mantiveram elevadas durante as duas primeiras semanas de vida, confirmando que a nutrição materna auxilia na reserva de selênio nos tecidos corporais da sua progênie. Diferindo desta pesquisa, Zhang et al. (2011) descrevem que com a suplementação de cantaxantina na dieta das matrizes, não encontraram diferença no ganho de peso nos primeiros 21 dias pós-eclosão nem no consumo de ração de frangos de corte.

Araujo et al. (2019) encontraram melhor taxa de conversão alimentar para a progênie oriunda de matrizes de frango de corte que receberam a combinação de Cx + VD<sub>3</sub>, mas que também foram suplementadas com a mistura até os 21 dias de idade. No período de 15 a 35 dias de idade não foram encontradas diferenças para os parâmetros de desempenho.

#### 4.3 Atividade antioxidante e peroxidação lipídica

Os resultados de capacidade antioxidante encontrado nos tecidos dos pintos no dia da eclosão, pode sugerir maior capacidade ou até mesmo necessidade de enzimas para minimizar os efeitos da oxidação. Através da oxidação de seus ácidos graxos, o saco vitelino é a principal fonte de energia que o embrião usa para seu desenvolvimento durante a incubação e também é responsável por fornecer outros nutrientes para o embrião (Speake et al., 1998). Ocorre aceleração do metabolismo aeróbico e aumento a produção de espécies reativas quando a respiração corioalantoide passa a ser pulmonar a partir da transferência dos ovos para a eclosão e vida exterior (Visschedijk, 1968).

O Se depositado em ovos de matrizes pode efetivamente fornecer proteção antioxidante para o crescimento e desenvolvimento do embrião, melhorando a taxa de sobrevivência do embrião e a taxa de incubação dos ovos de matrizes (Surai et al., 2018). Xiao et al., (2016) compararam a administração de SS ou selenometionina na dieta de reprodutores da raça *Lingnan Yellow* e seus efeitos no status antioxidante do fígado de embriões que foram submetidos ao estresse térmico no dia final da incubação, foram relatados maiores níveis de expressão da *GPXI*, *TrxRI*, e como neste estudo encontraram diminuição nas concentrações de MDA evidenciando que o Se orgânico da dieta materna aumentou a capacidade antioxidante e diminuiu a concentração de ROS. E, nesta pesquisa foram identificadas, mesmo que sem uma fonte adicional de estresse, que as substâncias utilizadas para fim de proteção antioxidante forneceram proteção superior a dieta basal.

Poucas informações são encontradas sobre o uso individual da Cx frente a capacidade antioxidante adquirida da dieta das matrizes, mas, sabe-se que ela é depositada na gema e desta forma é distribuída aos demais tecidos do embrião (Surai et al., 2003). Zhang et al. (2011), ao fornecerem 6mg Cx/kg de dieta para galinhas chinesas e avaliarem sua progênie tiveram resultado significativo sobre a atividade das enzimas antioxidantes e

sobre a diminuição da peroxidação lipídica em pintinhos recém-nascidos, com persistência desses efeitos até aos 7 dias pós-eclosão. Da mesma forma, acredita-se que este efeito foi obtido nas aves provenientes dos tratamentos com Cx.

A maior capacidade de redução do radical ABTS<sup>+</sup> no vitelo aos 15 dias de incubação pode estar relacionada a seu efeito protetor no organismo contra reações de oxidação que ocorrem nos tecidos e membranas animal nesse período, pode-se analisar que nos dois experimentos a maior atividade desse radical foi encontrada no tratamento VD<sub>3</sub> (Exp. I) e no Cx+VD<sub>3</sub> (Exp. II). Sabe-se que a maior atividade da enzima 1- $\alpha$  hidroxilase ocorre entre os dias 12 e 15 da incubação do embrião de codornas e pode ter auxiliado esse aumento da vitamina no tecido nesse período.

Por ser rico em ácidos graxos poli-insaturados o tecido embrionário está susceptível a oxidação lipídica. A incubação é um momento de grande estresse para o embrião, dessa forma o corpo desprende de mecanismos de defesa para auxiliar a contenção da oxidação, sendo a enzima superóxido dismutase (SOD) um destes mecanismos e também a análise do conteúdo de MDA no tecido (Del Rio et al., 2005; Surai, 2016). A análise da atividade da SOD não apresentou diferenças entre os tratamentos, sugerindo que não houve necessidade da ativação desse mecanismo para combater possíveis fontes de geração de EROs.

E, neste estudo os valores de MDA reduziram com a suplementação de antioxidantes frente o basal, no vitelo em ambas idades do embrião. Esse achado reforça a afirmação de que a incubação é um momento de estresse oxidativo para as aves e que substâncias com potencial antioxidante atenuam o estresse oxidativo no metabolismo do embrião durante a incubação e pós eclosão (Araújo et al, 2019).

Os resultados para atividade antioxidante reforçam a ideia já apresentada por outros autores que a diminuição nos níveis de MDA ou aumento na atividade de DPPH e ABTS<sup>+</sup>

resultante dos tratamentos Cx, VD<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub> e SeLev, pode refletir no desenvolvimento muscular e a taxa de crescimento. Confirmando que um organismo com bom status antioxidante pode apresentar diversas vantagens durante seu desenvolvimento como maior comprimento dos pintos ao nascimento, melhor taxa de conversão alimentar e aumento no peso corporal (Jing et al., 2015; Xia et al., 2020; Wang et al., 2021).

#### 4.4 *Interação espermatozoide:ovo*

Os resultados de PHMP demonstram que nos tratamentos SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> e sua associação o número de PHMP foi superior ao tratamento basal, nos três métodos de avaliação. A contagem se manteve superior a 20 PHMP até o sexto dia pós-cópula, sendo possível obter ovos férteis até o 8º dia. Para codornas europeias, estima-se que esse período de armazenamento possa chegar até 10 dias após o acasalamento (Miranda et al., 2013). E, nesta pesquisa foi demonstrado que com contagem acima de 10 PHMP para os tratamentos com antioxidante, ainda é possível obter uma porcentagem de fertilidade acima de 85% quando somente as fêmeas ou o casal recebiam SeLev, Cx, VD<sub>3</sub> e sua associação.

Quando ocorre a cópula, os espermatozoides ascendem em direção à junção uterovaginal e ficam armazenados em glândulas infundibulares que possuem ambiente favorável para sua sobrevivência por um tempo variável, e são liberados durante o período de ovulação (Birkhead e Fletcher, 2008). No momento da fertilização os espermatozoides se ligam a membrana perivitelínica do ovo e liberam a acrosina, uma enzima que é capaz de hidrolisar as fibras e permitindo a entrada do espermatozoide na região do blastodisco para a fertilização do óvulo (Baskt, 2014).

Os lipídios estão entre os principais componentes das membranas espermáticas envolvidos em uma série de processos que acabam por influenciar seu potencial

fertilizante (Surai, 2000). Por exemplo, em mamíferos de aves eles atuam como possível fonte de energia durante o armazenamento *in vitro* sob condições aeróbicas, mas também são parte integrante da membrana do esperma e, portanto, envolvidos nos vários estágios de maturação, capacitação e reação acrossômica. Quando apenas os machos receberam os antioxidantes a combinação de Cx+VD<sub>3</sub> houve aumento do número de PHMP. O sêmen é um tecido rico em PUFAS sendo suscetíveis a oxidação, diminuindo a qualidade e potencial de fertilidade das aves, conseqüentemente, o aumento na capacidade antioxidante destes tecidos aumentam a fertilidade e o selênio e a Cx+VD<sub>3</sub> podem atenuar essa oxidação (Surai, 2002).

## **5. Conclusões**

A suplementação de selênio levedura, cantaxantina e Vitamina D<sub>3</sub> na dieta de reprodutores é indicado por promover melhorias na produção de pintos de codorna. A maior atividade antioxidante das aves, resultante da suplementação desses aditivos, pode ser um dos fatores que contribuíram para a melhoria dos parâmetros de desenvolvimento embrionário. A suplementação de selênio levedura, cantaxantina e Vitamina D<sub>3</sub> também incrementa o número de pontos de hidrólise na membrana perivitelínica, que favorece a fertilidade do ovo, principalmente quando administrados na dieta do casal ou da fêmea.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Referências

Agarwal, M.; Parameswari, R. P.; Vasanthi, H. R. and Das, D. K. 2012. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules* 4:4755–4769. <https://doi.org/10.3390/molecules17044755>

Araújo, L. F.; Araújo, C. S. S.; Pereira, R. J. G.; Bittencourt, L. C.; Silva, C. C.; Cisneros, F. and Dias, M. T. 2019. The dietary supplementation of canthaxanthin in combination with 25OHD3 results in reproductive, performance, and progeny quality gains in broiler breeders. *Poultry Science* 11:5801–5808. <https://doi.org/10.3382/ps/pez377>

Bakst, M. R.; Eastridge, J. and Malecki, I. A. 2014. The inner perivitelline layer sperm hole assay: Use of filter paper rings for the isolation of the perivitelline layer overlying the germinal disc and new observations on its morphology. *Journal of Applied Poultry Research* 23:121–128. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00873>

Birkhead, T. R. and Fletcher, F. 1993. Sperm storage and the release of sperm from the sperm storage tubules in Japanese Quail *Coturnix japonica*. *IBIS* 136:101-105. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1994.tb08137>

Bonagurio, L. P.; Cruz, F. K.; Kaneko, I. N.; Matumoto-Pintro, P. T.; Murakami, A. E. and Santos, T. C. 2020. Dietary supplementation with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol has beneficial effects on bone and oxidative metabolism in European quail breeders. *Poultry Science* 10:4874–4883. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.021>

Bonagurio, L. P.; Murakami, A. E.; Cruz, F. K.; Kaneko I. N.; Gasparino, E.; Oliveira, C. A. L.; Poveda-Lozano, C. A.; Silva, C. C.; Santos, T. C. 2022. Dietary supplementation with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol on the incubation performance and fertility of European quail breeders. *Poultry Science* 101:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101823>

Bonilla, C. E. V.; Rosa, A. P.; Londero, A.; Giacomini, C. B. S.; Orso, C.; Fernandes, M. O.; Paixão, S. J. and Bonamigo, D. V. 2017. Effect of broiler breeders fed with corn or sorghum diet and canthaxanthin supplementation on production and reproductive performance. *Poultry Science* 96:1725–1734. <https://doi.org/10.3382/ps/pew442>



Decuypere, E. and Bruggeman, V. 2007. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. *Poultry Science* 86:1037–1042. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1037>

Del Rio, D.; Stewart, A. J. and Pellegrini, N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15:316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>

Jing, C. L.; Dong, X. F.; Wang, Z. M.; Liu, S. and Tong, J. M. 2015. Comparative study of DL-selenomethionine vs sodium selenite and seleno-yeast on antioxidant activity and selenium status in laying hens. *Poultry Science* 94:965–975. <https://doi.org/10.3382/ps/pev045>

Madkour, M.; Ali, H. M.; Yassein, S. A.; Abdel-Fattah, S. A.; El-Allawy, Hewida M. and El-Wardany, I. 2015. Effect of dietary organic selenium supplement on growth and reproductive performance of Japanese quail breeders and their progeny and its relation to antioxidation and thyroid activity. *International Journal of Poultry Science* 6:317-324

Miranda, J. L. P. S.; Xavier, P. R.; Mahecha, G. A. B. and Marques Júnior, A. P. 2013. Stay period of sperm in sperm-storage glands and in infundibular glands in quails *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 65:19-28

Molenaar, R. M. and Reijrink, I. M. 2011. Chick Length And Organ Development. *HatchTech Incubation Technology*, pp. 1–2.

Mukhtar, N.; Khan, S. H. and Anjum, M. S. 2013. Hatchling length is a potential chick quality parameter in meat type chickens. *World's Poultry Science Journal* 69:889–896. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000883>

Pappas, A. C.; Acamovic, T.; Surai, P. F. & McDevitt, R. M. 2006. Maternal organo-selenium compounds and polyunsaturated fatty acids affect progeny performance and levels of selenium and docosahexaenoic acid in the chick tissues. *Poultry Science* 85:1610–1620. <https://doi.org/10.1093/ps/85.9.1610>

Rosa, A. P.; Scher, A.; Sorbara, J. O.; Boemo, L. S.; Forgiarini, J. and Londero, A. 2012. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science* 91:660–666. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01582>

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R.; Lopes, D. C.; Euclides, R. F. 2017. *Composição de alimentos e exigências nutricionais* (3ed. vol. 1). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa

Saunders-Blades, J. L. and Korver, D. R. 2015. Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny in vitro early innate immune function. *Poultry Science* 94:1233–1246 <https://doi.org/10.3382/ps/pev002>

Soares, J. H.; Kerr, J. M. and Gray, R. W. 1995. 25-Hydroxycholecalciferol Poultry Nutrition. *Poultry Science* 74:1919–1934. <https://doi.org/10.3382/ps.0741919>

Speake, B. K.; Noble, R. C. and Murray, A. M. B. 1998. The utilization of yolk lipids by the chick embryo. *World's Poultry Science Journal* 54:331–334. <https://doi.org/10.1079/wps19980022>

Surai, P. F. 2000. Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *British Poultry Science* 41:235–243. <https://doi.org/10.1080/713654909>

Surai, P. F. 2006. *Selenium in Nutrition and Health*. 1<sup>a</sup> ed. Nottingham University Press. Nottingham.

Surai, P. F. 2016. Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition* 01:01-08. <https://doi.org/10.21767/2572-5459.100008>

Surai, A. P.; Surai, P. F.; Steinberg, W.; Wakeman, W. G.; Speake, B. K. and Sparks, N. H. C. 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* 44:612–619. <https://doi.org/10.1080/00071660310001616200>

Surai, P. F.; Fisinin, V. I. and Karadas, F. 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition* 1:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.01.001>

Surai, P. F.; Karadas, F.; Pappas, A. C. and Sparks, N. H. C. 2007. Effect of organic selenium in quail diet on its accumulation in tissues and transfer to the progeny. *British Poultry Science* 47:65–72. <https://doi.org/10.1080/00071660500475244>

Surai, P. F.; Kochish, I. I.; Fisinin, V. I. and Velichko, O. A. 2018. Selenium in poultry nutrition: From sodium selenite to organic selenium sources. *Journal of Poultry Science* 55:79–93. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170132>

Visschedijk, A. H. 1968. The air space and embryonic respiration. *British Poultry Science* 1:173–184.

Wang, Z.; Kong, L.; Zhu, L.; Hu, X.; Su, P. and Song, Z. 2021. The mixed application of organic and inorganic selenium shows better effects on incubation and progeny parameters. *Poultry Science* 100:1132–1141. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.037>

Xia, W. G.; Chen, W.; Abouelezz, K. F. M.; Ruan, D.; Wang, S.; Zhang, Y. N.; Fouad, A. M.; Li, K. C.; Huang, X. B. and Zheng, C. T. 2020. The effects of dietary Se on productive and reproductive performance, tibial quality, and antioxidant capacity in laying duck breeders. *Poultry Science* 99:3971-3978. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.04.006>

Xiao, X.; Yuan, D.; Wang, Y. X. and Zhan, X. A. 2016. The Protective Effects of Different Sources of Maternal Selenium on Oxidative Stressed Chick Embryo Liver. *Biological Trace Element Research* 172:201–208. [https://doi.org/10.1007/s12011-015-0541-](https://doi.org/10.1007/s12011-015-0541-0)

Zhang, W.; Zhang, K. Y.; Ding, X. M.; Bai, S. P.; Hernandez, J. M.; Yao, B. and Zhu, Q. 2011. Influence of canthaxanthin on broiler breeder reproduction, chick quality, and performance. *Poultry Science* 90:1516–1522. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01126>

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais para codornas de postura e progênie.

Ingredientes %	Postura					Progênie	
	Experimentos I, II e II					Inicial	Crescimento
	Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>	Cx	VD <sub>3</sub>	1-14d	15-35d
Milho	61,450	61,450	61,450	61,450	61,450	54,03	58,55
Farelo de Soja	28,700	28,700	28,700	28,700	28,700	38,90	35,94
Calcário	6,600	6,600	6,600	6,600	6,600	1,05	0,89
Óleo de soja	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	2,23	1,28
Fosfato Bicálcico	1,420	1,420	1,420	1,420	1,420	2,20	1,75
Premix vit+min <sup>1,2</sup>	0,400	0,400 <sup>2</sup>	0,400	0,400	0,400	1,00	1,00
Sal comum	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,43	0,46
DL- Metionina (98,5 %)	0,340	0,340	0,340	0,340	0,340	0,15	0,12
L-Lisina (76,5%)	0,440	0,440	0,440	0,440	0,440	0,01	0,01
Inerte <sup>3</sup>	0,100	0,070	0,000	0,000	0,075	-	-
Selenito de sódio						-	-
Selênio levedura <sup>4</sup>	-	0,030	-	-	-	-	-
Cantaxantina <sup>5</sup>	-	-	0,100	0,100	-	-	-
Vitamina D <sub>3</sub> <sup>6</sup>	-	-	0,025	-	0,025	-	-
<b>Composição Calculada</b>							
Proteína bruta %	18,95	18,95	18,95	18,95	18,95	22,00	21,00
EM (kcal/kg)	2806	2806	2806	2806	2806	2,900	2,900
Cálcio (%)	2,99	2,99	2,99	2,99	2,99	1,092	0,91
Fósforo Disp (%)	0,3664	0,3664	0,3664	0,3664	0,3664	0,513	0,43
Sódio	0,1769	0,1769	0,1769	0,1769	0,1769	0,205	0,21
Lys dig %	1,1914	1,1914	1,1914	1,1914	1,1914	1,095	1,03
Met dig %	0,6010	0,6010	0,6010	0,6010	0,6010	0,447	0,41
Met + Cys dig %	0,928	0,928	0,928	0,928	0,928	0,744	0,69
Selênio inorgânico <sup>7</sup> (ppm)	0,30	-	0,30	0,30	0,30	-	-
Selênio Levedura (ppm)	-	0,30	-	-	-	-	-
Cantaxantina (ppm)	-	-	6	6	-	-	-
25-OH-D <sub>3</sub> (UI)	-	-	2.760	-	2.760	-	-

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico e mineral para matrizes – Níveis de garantia por kg de ração: Vit. A – 2.500.000 UI; Vit. D<sub>3</sub> – 750.000 UI; Vit. E – 6.250 UI; Vit. B1 – 880 mg; Vit. B2 – 1.600 mg/Kg; Vit. B6 – 1.300 mg/kg; Vit. B12 – 5.000 UI; Vit. K3 – 780 mg; Pantotenato de Cálcio – 3.300 mg; Niacina – 6.000 mg/Kg; Ácido fólico -480 mg/Kg; Biotina – 50,0 mg/Kg; Colina – 75 g/Kg; Antioxidante (Butil Hidroxi Tolueno – BHT) – 1.000 mg/Kg; Zinco – 13 g/ Kg; Ferro – 13 g/Kg; Manganês – 15 g/Kg; Cobre – 3.000 mg/Kg; Cobalto – 50 mg/Kg; Iodo – 250 mg/Kg;

<sup>2</sup>Quantidade por kg do produto – Vitamina A 931.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>: 189.000 UI; Vitamina E: 1.500 mg; Vitamina K3: 156 mg; Vitamina B1: 150 mg; Vitamina B2: 500 mg; Vitamina B6: 310 mg; Vitamina B12: 1.200 mg; Pantotenato de cálcio: 1.250 mg; Niacina: 3.000 mg; Ácido Fólico: 75 mg; Biotina: 4 mg; Colina: 45 g; Zinco: 5 g; Ferro: 5 g; Manganês: 6.05 g; Cobre: 600 mg; Iodo: 77.5 mg; Se: 25.7 mg; Bacitracina de zinco: 2.200 mg; Butil Hidroxi Tolueno (BHT): 1.500 mg; Veículo Q.S.P. (Caulim) 1.000 g/Kg.

<sup>3</sup> Caulim

<sup>4</sup> Produto à base de levedura enriquecida com selênio e levedura seca de cervejaria, com 1.000 mg se/kg;

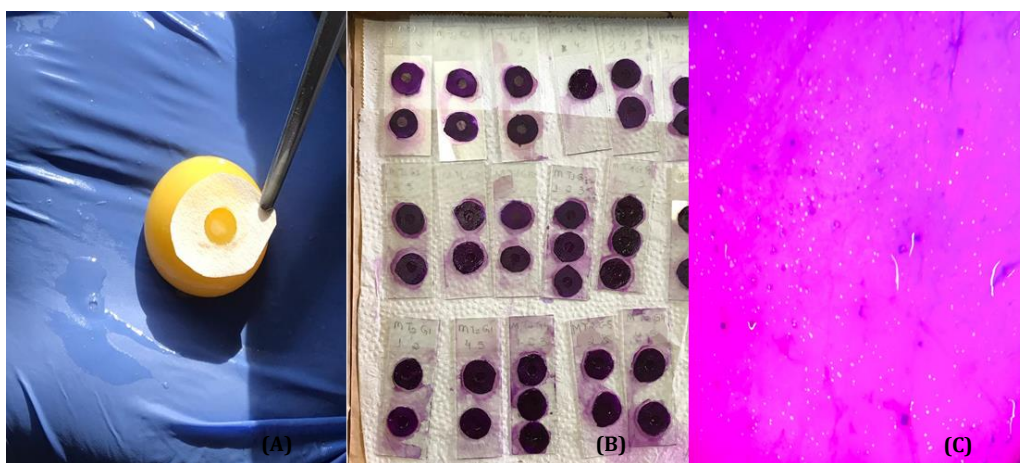
<sup>5</sup> Produto com nível de garantia de mínima de 6000 mg de Cx/kg;

<sup>6</sup> Produto com nível de garantia de mínima de 2.760.000 UI de 25-OH-D<sub>3</sub>.

**Quadro 1.** Tratamentos experimentais do experimento de acordo com o efeito de sexo e das dietas.

			Efeito da dieta				
			SS	SeLev	Cx	Cx+VD <sub>3</sub>	VD <sub>3</sub>
Efeito de sexo	M+F-	M	sim	sim	sim	sim	Sim
		F	sim	não	não	não	Não
	M-F+	M	sim	não	não	não	não
		F	sim	sim	sim	sim	Sim
	M+F+	M	sim	sim	sim	sim	Sim
		F	sim	sim	sim	sim	sim

Em que: (+) recebia a dieta, (-) não recebia



**Figura 1.** Seções histológicas da membrana perivitelínica na região do disco germinativo de ovos de codornas japonesas. (A) Colocação de filtro de papel sobre o disco germinativo. (B) Lâmina corada e finalizada. (C) Imagem de microscópio em lentes objetivas de 4x da membrana perivitelínica com pontos de hidrólise.

**Tabela 2.** Probabilidade de ocorrência para as variáveis de desempenho de incubação de ovos oriundos de codornas japonesas alimentadas com antioxidantes.

	Experimento I					Experimento II			
	Dietas experimentais				P-valor	Dietas experimentais			P-valor
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx		Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>	
Fertilidade %	94,44	97,11	95,15	94,51	0,586	92,89	95,88	96,15	0,339
Infertilidade %	5,56	2,89	4,85	5,49	0,586	7,10	4,11	3,84	0,339
Eclodibilidade total	80,86b	89,60a	90,30a	89,02a	0,040	75,74b	88,23a	87,18a	0,003
Eclodibilidade férteis	85,62b	92,26a	94,90a	94,19a	0,017	81,53b	92,02a	90,66a	0,009
% Mortalidade total	14,38a	7,74b	5,10b	5,81b	0,017	13,37a	6,13b	7,33b	0,009
% Início e meio	36,36	55,55	12,50	30,79	0,485	3,82	1,22	2,66	0,314
% Final e casca	63,64	55,55	87,50	69,21	0,485	9,55	4,90	4,66	0,152
Valores de $\beta$									
Fertilidade %	2,4732	3,5145	2,9768	3,4476		2,5713	3,2188	3,1478	
Infertilidade %	-2,4732	-3,5145	-2,9768	-3,4476		-2,5713	-3,2188	-3,1478	
Eclodibilidade total	1,4413	2,1531	2,2314	2,0933		1,1385	1,19169	2,0149	
Eclodibilidade férteis	1,7842	2,4785	2,9245	2,7864		1,4847	2,2736	2,4457	
% Mortalidade total	-1,7842	-2,4785	-2,9245	2,7864		-1,4847	-2,2736	-2,4457	
% Início e meio	-2,8973	-3,7136	-5,05	-3,631		-3,2261	-3,5981	-4,3883	
% Final e casca	-2,2954	-2,8717	-3,0647	-3,4012		-2,2478	-3,017	-2,9640	

SS= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura.  $\beta = (\text{EXP})/1+(\text{EXP})$ .

**Tabela 3.** Escore de Pasgar e qualidade da progênie resultante de codornas japonesas alimentadas com substâncias antioxidantes (n=50).

Variável	Experimento I							Experimento II					
	Dietas							Dietas					
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx	Média	EPM	P-valor	Basal	Cx+VD <sub>3</sub>	SeLev	Média	EPM	P-valor
Pasgar®	9,46	9,72	9,72	9,72	9,65	0,760	0,224	9,72	9,70	9,72	9,71	0,042	0,976
Peso	7,847	7,885	7,91	8,08	7,93	0,633	0,263	7,967	7,972	7,967	7,96	0,036	0,998
Comprimento	11,02b	11,61a	11,56a	11,53a	11,43	0,475	0,001	11,07b	11,58a	11,49a	11,38	0,036	0,001

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); SS= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, SeLev = selênio levedura.

**Tabela 4.** Estado oxidativo mensurado pela inibição do radical DPPH (%) e ABTS no vitelo e no fígado de embrião e de pintinhos (n= 3) de codornas japonesas alimentadas com diferentes substâncias antioxidantes.

Variável	Experimento I							Experimento II					
	Basal	Cx	VD <sub>3</sub>	SeLev	Média	EPM	P-valor	Basal	Cx+VD <sub>3</sub>	SeLev	Média	EPM	P-valor
<b>ABTS</b>													
Vitelo 15 dias	37,168b	39,726a	40,548a	38,904a	39,08	0,410	0,001	39,726b	44,840a	43,698a	42,75	0,799	0,001
Vitelo 1 dia	34,840b	44,885a	45,022a	43,927a	42,17	1,296	0,001	43,972b	53,060a	52,876a	49,98	1,525	0,001
Fígado 1 dia	49,543b	51,690ab	53,060a	51,826ab	51,53	0,473	0,032	52,648b	56,118a	55,890a	54,88	0,613	0,004
Fígado 3 dias	35,936	36,118	35,525	36,118	36,08	0,245	0,391	37,351	37,397	38,264	37,67	0,300	0,428
<b>DPPH</b>													
Vitelo 15 dias	14,577	16,921	15,086	15,596	15,54	0,374	0,125	21,580	22,087	22,137	21,93	0,287	0,740
Vitelo 1 dia	24,516b	32,773a	31,957a	30,020a	29,81	1,029	0,001	23,910b	37,082a	36,423a	32,47	2,157	0,001
Fígado 1 dia	36,753b	39,828a	39,677a	38,520ab	38,69	0,418	0,004	39,224b	42,145a	42,044a	41,13	0,538	0,009
Fígado 3 dias	27,574	28,593	29,357	27,472	28,25	0,330	0,115	24,063	24,823	24,113	24,33	0,512	0,837

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); SS= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub>= cantaxantina+vitamina D<sub>3</sub>; SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio.

**Tabela 5.** Peroxidação lipídica (TBARS) do tecido hepático e vitelo de codornas oriundas de reprodutores suplementados com antioxidantes na dieta (n=3).

Variável	Experimento I							Experimento II					
	Basal	SeLev	VD <sub>3</sub>	Cx	Média	EPM	P-valor	Basal	SeLev	Cx+VD <sub>3</sub>	Média	EPM	P-valor
Vitelo 15 dias	1,420a	0,554b	0,618b	0,901b	0,87	0,113	0,002	1,483a	0,940b	0,882b	1,10	0,104	0,005
Vitelo 1 dia	2,577a	2,216b	2,044b	2,160b	2,25	0,066	0,002	2,714a	2,118b	2,197b	2,34	0,100	0,002
Fígado 1 dia	3,838a	2,685b	2,692b	2,566b	2,77	0,16	0,001	3,601a	2,768b	2,525b	2,96	0,16	0,004
Fígado 3 dias	3,036	2,693	2,644	2,743	2,77	0,06	0,06	2,312	2,158	2,331	2,26	0,04	0,27

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); SS= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub>= cantaxantina+vitamina D<sub>3</sub>; SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio.

**Tabela 6.** Atividade enzimática da SOD no tecido hepático de codornas de um dia de idade oriundas de reprodutores suplementados com antioxidantes na dieta.

USOD/mg prot	Tratamentos					Média	EPM	P-valor
	Basal	Cx	Cx+ VD <sub>3</sub>	VD <sub>3</sub>	SeLev			
Fígado	1,451	1,260	1,260	1,151	1,090	1,242	0,065	0,5178

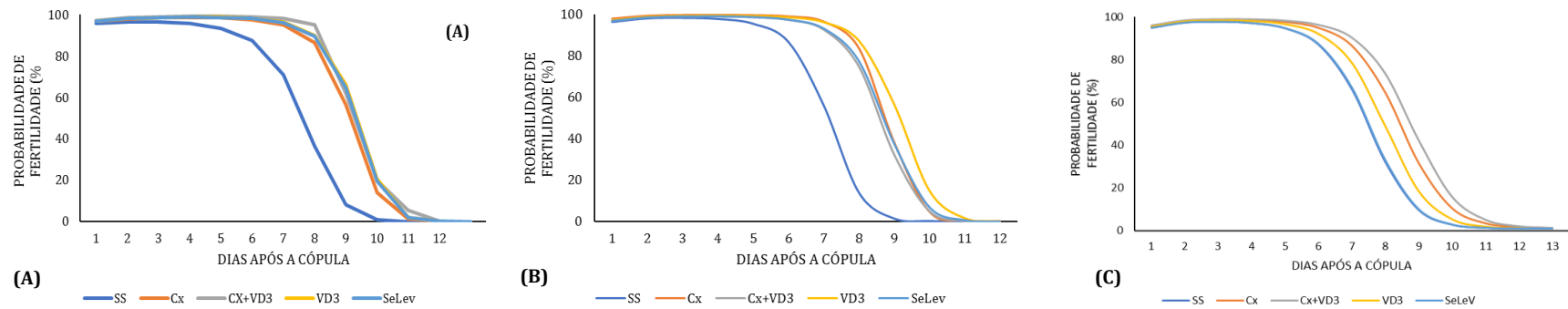
Basal= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub>= cantaxantina+vitamina D<sub>3</sub>; SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio.



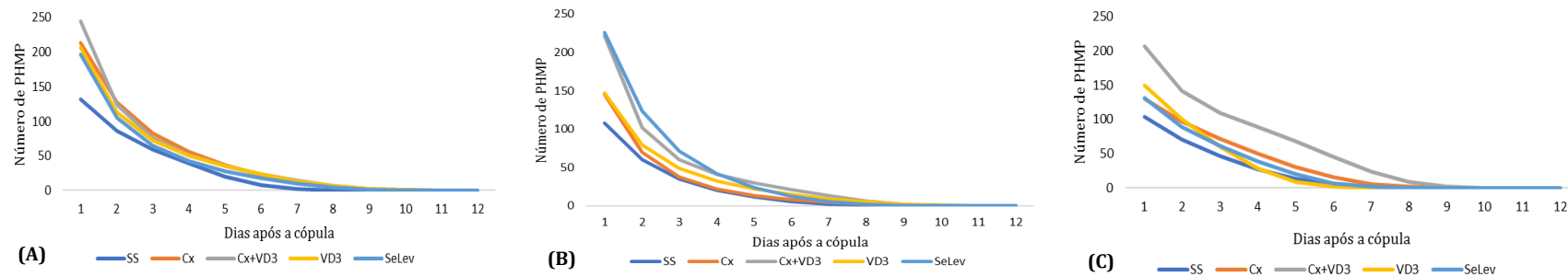
**Tabela 7.** Desempenho da progênie de reprodutores (as) de codornas japonesas recebendo antioxidantes na dieta.

Variável	Experimento I							Experimento II					
	Basal	Cx	VD <sub>3</sub>	SeLev	Média	EPM	P-valor	Basal	Cx+ VD <sub>3</sub>	SeLev	Média	EPM	P-valor
<b>1-14 dias</b>													
Consumo de ração (g)	114,132	95,644	97,698	98,926	101,60	0,002	0,059	119,900a	106,120b	106,650b	110,90	0,002	0,0205
Ganho de peso (g)	41,911	41,020	42,393	41,384	41,677	0,001	0,800	39,404	38,462	39,522	39,130	0,000	0,817
Conversão alimentar	2,963a	2,352b	2,244b	2,368b	2,482	0,100	0,015	3,04a	2,79b	2,72b	2,85	0,051	0,018
Peso médio 14 dias	49,440	48,420	49,943	48,743	49,136	0,001	0,751	47,100	46,408	46,346	46,617	0,000	0,815
Peso médio nascimento	7,527	7,400	7,550	7,358	7,460	0,00	0,784	7,674	7,884	7,663	7,747	0,000	0,154
<b>15-35 dias</b>													
Consumo de ração (g)	315,89	305,95	293,33	284,36	300,00	0,006	0,456	216,45	204,50	186,45	202,467	0,006	0,110
Ganho de peso (g)	76,186	76,634	73,416	74,768	75,250	0,001	0,476	72,528	73,450	68,290	71,422	0,001	0,217
Conversão alimentar	4,46	4,33	4,27	4,41	4,370	0,118	0,983	4,54	4,48	5,05	4,69	0,136	0,654
Peso médio 35 dias	126,255	125,940	126,814	125,800	126,200	0,001	0,994	122,136	122,162	125,857	123,385	0,000	0,121

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); Basal= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub>= cantaxantina+vitamina D<sub>3</sub>; SeLev = selênio levedura; EPM= erro padrão médio.



**Figura 2.** (A) Probabilidade de fertilidade quando o casal recebeu as dietas experimentais; (B) probabilidade de o ovo estar fértil quando as fêmeas receberam as dietas experimentais; (C) probabilidade de fertilidade quando machos receberam as dietas (n= 10 casais).



**Figura 3.** (A) PHMP quando o casal recebeu as dietas experimentais; (B) Número de PHMP quando as fêmeas receberam as dietas experimentais; (C) PHMP quando machos receberam as dietas (n=10).

**Tabela 8.** Valores estimados de  $\beta$  para pontos de hidrólise na membrana perivitelínica e probabilidade de fertilidade do ovo.

Dieta	Recebimento das dietas experimentais		
	Machos (+) Fêmeas (+)	Machos (-) Fêmeas (+)	Machos (+) Fêmeas (-)
<b>Probabilidade de Fertilidade %</b>			
Basal	$-3,1625\text{dia}+0,0235\text{dia}^2+0,0081\text{dia}^3$	$-3,4726\text{dia}+0,1468\text{dia}^2+0,0025\text{dia}^3$	$-3,2713\text{dia} +0,3267\text{dia}^2-0,011\text{dia}^3$
Cx	$-3,5001\text{dia}+0,0235\text{dia}^2+0,0081\text{dia}^3$	$-3,8226\text{dia}+0,1468\text{dia}^2+0,0025\text{dia}^3$	$-3,2763\text{dia} +0,3267\text{dia}^2-0,011\text{dia}^3$
VD <sub>3</sub>	$-3,4625+0,0235\text{dia}^2+0,0081\text{dia}^3$	$-3,8076\text{dia}+0,1468\text{dia}^2+0,0025\text{dia}^3$	$-3,1113\text{dia}+0,3267\text{dia}^2-0,011\text{dia}^3$
Cx+VD <sub>3</sub>	$-3,6015\text{dia}+0,0235\text{dia}^2+0,0081\text{dia}^3$	$-3,7983\text{dia}+0,1468\text{dia}^2+0,0025\text{dia}^3$	$-3,0589\text{dia}+0,3267\text{dia}^2-0,011\text{dia}^3$
SeLev	$-3,5067\text{dia}+0,0235\text{dia}^2+0,0081\text{dia}^3$	$-3,9141\text{dia}+0,1468\text{dia}^2+0,0025\text{dia}^3$	$-3,1925\text{dia}+0,3267\text{dia}^2-0,011\text{dia}^3$
<b>PHMP</b>			
Basal	$6,0168- 0,7902\text{dia} + 0,1727\text{dia}^2 - 0,0229\text{dia}^3$	$5,0518 -0,4555\text{dia} +0,0541\text{dia}^2 -0,012\text{dia}^3$	$5,3896 -0,7807\text{dia} +0,0854\text{dia}^2 -0,0096\text{dia}^3$
Cx	$6,0168 -0,74\text{dia} +0,0959\text{dia}^2 -0,0089\text{dia}^3$	$5,2399 -0,4271\text{dia} +0,0683\text{dia}^2 -0,011\text{dia}^3$	$5,872 -0,9887\text{dia} +0,1031\text{dia}^2 -0,0074\text{dia}^3$
VD <sub>3</sub>	$6,17 -0,9804\text{dia} +0,1536\text{dia}^2 -0,0123\text{dia}^3$	$5,9227 -0,7328\text{dia} +0,1532\text{dia}^2 -0,0149\text{dia}^3$	$5,8024 -0,9215\text{dia} +0,1204\text{dia}^2 -0,0088\text{dia}^3$
Cx+VD <sub>3</sub>	$6,4418 -1,0991\text{dia} +0,1699\text{dia}^2 -0,0129\text{dia}^3$	$5,4102 -0,4484 \text{dia} +0,0656\text{dia}^2 -0,0206\text{dia}^3$	$6,5325 -1,3379\text{dia} +0,2229\text{dia}^2 -0,0161\text{dia}^3$
SeLev	$6,1037-0,9486\text{dia} +0,134\text{dia}^2 -0,0109\text{dia}^3$	$5,434 -0,6737\text{dia} +0,1403\text{dia}^2 -0,0206\text{dia}^3$	$6,1215 -0,7671\text{dia} +0,7314\text{dia}^2 -0,0076\text{dia}^3$

Basal= selenito de sódio; Cx= cantaxantina, VD<sub>3</sub>= Vitamina D<sub>3</sub>, Cx+VD<sub>3</sub>= cantaxantina+vitamina D<sub>3</sub>; SeLev = selênio levedura. As equações são referentes a figura 2 (probabilidade de fertilidade) e figura 3 (PHMP)

#### IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, este trabalho demonstrou que a suplementação de antioxidantes como Cantaxantina, Vitamina D<sub>3</sub> e Selênio orgânico levedura, pode trazer efeitos benéficos para as aves, mesmo em condições consideradas normais para a produção. As substâncias foram capazes de prover incremento na atividade antioxidante dos tecidos dos reprodutores(as) e, também em sua progênie, sendo um dos pontos desta hipótese de que essas substâncias poderiam ser utilizadas pelos pintos como forma para proteção antioxidante durante a incubação.