

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ÁCIDO ASCÓRBICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE
E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE
DESEMPENHO E METABOLISMO MITOCONDRIAL**

Tatiane Almeida Viana Lopes

**CRUZ DAS ALMAS – BA
2017**

**ÁCIDO ASCÓRBICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE E SEUS
EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E
METABOLISMO MITOCONDRIAL**

Tatiane Almeida Viana Lopes
Médica Veterinária
Universidade Federal da Bahia, 2009

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção Animal).

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro
Coorientador: Prof. Dr. Jerônimo Ávito de Brito

**CRUZ DAS ALMAS – BA
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

L864a	<p>Lopes, Tatiane Almeida Viana. Ácido ascórbico em rações de frango de corte e seus efeitos sobre características de desempenho e metabolismo mitocondrial / Tatiane Almeida Viana Lopes. _ Cruz das Almas, BA, 2017. 49 f.; il.</p> <p>Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro. Coorientador: Jerônimo Ávito de Brito.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Frangos de corte – Alimentação e rações. 2.Metabolismo energético – Mitocôndria. 3.Estresse oxidativo – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.513</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**ÁCIDO ASCÓRBICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE E SEUS
EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E
METABOLISMO MITOCONDRIAL**

**Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Tatiane Almeida Viana Lopes**

Aprovada em: 09 de fevereiro de 2017

Prof.^o Dr. Alexandre Moraes Pinheiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Orientador

Prof.^o Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Examinador Externo

Prof.^a Dra. Manuela Oliveira de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família por todo suporte e confiança de sempre.
Pai e Arthur (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Deus, por me permitir esta conquista.

Marcelo do Vale, por todo apoio, paciência, incentivo, e companheirismo.

Professor Alexandre, pela oportunidade que me forneceu e pela disponibilidade sempre que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Bioquímica Veterinária (Antônio Wesley, Kêu, Diana e Wellyson) pela grande ajuda com as análises.

Aos funcionários do setor de avicultura e aos membros do Núcleo de Estudos em Avicultura do Recôncavo, pelo auxílio no árduo trabalho de campo.

Aos colegas do mestrado, principalmente Yane e Zilda, por compartilhar as dificuldades e os bons momentos.

Eric Balbino por estar sempre disposto em ajudar.

Professor Jerônimo Brito pela coorientação no trabalho.

ÁCIDO ASCÓRBICO EM RAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E METABOLISMO MITOCONDRIAL

RESUMO: As vitaminas são compostos orgânicos que desempenham importantes funções no organismo. O ácido ascórbico é descrito como um elemento de ação antioxidante e assim age no combate aos radicais livres. O excesso dessas moléculas leva ao estresse oxidativo, o que pode comprometer as funções celulares e conseqüentemente o desempenho animal. As mitocôndrias são os principais alvos do estresse oxidativo, e uma disfunção mitocondrial pode causar impacto sobre o desempenho de animais de produção. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico sobre características de desempenho, biometria e metabolismo mitocondrial de células hepáticas de frangos de corte. Foram utilizados 832 pintos de 01 dia de idade, machos da linhagem Cobb-500 os quais foram alojados em um galpão experimental dividido em 32 boxes. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 04 tratamentos (0; 2,5; 5 e 10 mg/kg de ácido ascórbico) e 08 repetições, cada repetição foi constituída por 26 aves. Avaliou-se consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), e conversão alimentar (CA). Além da viabilidade, peso e biometria de órgãos e anexos digestivos e metabolismo mitocondrial. Os resultados mostraram que a suplementação de dietas com ácido ascórbico protegido, realizada na fase pré-inicial de criação exerceu efeito benéfico em características como ganho de peso e conversão alimentar, na fase inicial de criação. Não houve efeito sobre a biometria de vísceras (baço, bolsa cloacal e coração) e do trato digestório (intestino delgado, pâncreas e fígado). Foi observado que as aves que receberam 2,5mg/kg de ácido ascórbico apresentaram maior consumo de oxigênio após estímulo com succinato. Na suplementação de dietas de frango, na fase pré-inicial, o ácido ascórbico protegido exerceu efeito benéfico para o metabolismo mitocondrial na dose de 2,5mg/kg e para as características de desempenho como conversão alimentar (1-10 dias e 1-21 dias) e ganho de peso (1-21 dias) nas condições experimentais testadas. Diante disso conclui-se que a utilização do ácido ascórbico protegido em doses mais baixas do que as utilizadas na suplementação de rações de frangos de corte, melhoram o metabolismo mitocondrial hepático e o desempenho desses animais nas fases estudadas.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, frangos de corte, mitocôndria, suplementação, vitamina C

ASCORBIC ACID IN BROILERS FEEDS AND THEIR EFFECTS ON PERFORMANCE AND MITOCHONDRIAL METABOLISM

ABSTRACT: Vitamins are organic compounds that play important roles in the organism. Ascorbic acid is described as an antioxidant element and thus acts scavengers free radicals. The excess of these molecules causes oxidative stress, which can consequently compromise cellular functions in the animal performance. Mitochondria are the main targets of oxidative stress, and a mitochondrial dysfunction can cause an impact in the performance of animals' production. The purpose of this work was to evaluate the effect of ascorbic acid supplementation on performance characteristics, biometrics and mitochondrial metabolism of broilers hepatic cells. A total of 832 1-day-old chicks, males of the Cobb-500 breed, which were housed in an experimental shed divided into 32 cages. A completely randomized design with 04 treatments (0; 2.5; 5 and 10 mg/kg of ascorbic acid) and 08 repetitions, 26 birds per repetition. Feed intake (FI), Weight Gain (WG), and Feed Conversion Ratio (FCR) were evaluated. In addition to viability, weight and biometry of digestive organs and annexes and the mitochondrial metabolism. The results showed that the supplementation of diets with protected ascorbic acid, carried out in the pre-starter had a beneficial effect on characteristics such as weight gain and feed conversion, in the starter. There was no effect on viscera biometry (spleen, cloacal sac and heart) and digestive tract (small intestine, pancreas and liver). It was observed that birds receiving 2.5mg/kg of ascorbic acid had higher oxygen consumption after succinate stimulation. In pre-starter chicken diets supplementation, ascorbic acid had a beneficial effect on mitochondrial metabolism at the dose of 2.5mg/kg and for performance characteristics as feed conversion (1-10 days and 1-21 days) and weight gain (1-21 days) under the experimental conditions tested. In conclusion, the use of protected ascorbic acid at lower doses than those used in the supplementation of broiler feeds improves hepatic mitochondrial metabolism and the performance of these animals in the studied phases.

Key words: Broilers, mitochondria, oxidative stress, supplementation, vitamin C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Vitaminas na nutrição de frangos de corte	3
2.2 Ácido ascórbico	4
2.3 Ácido ascórbico e sistema imunológico	7
2.4 Ácido ascórbico na suplementação da dieta de frangos de corte.....	9
2.5 Estresse oxidativo e ação antioxidante do ácido ascórbico.....	11
CAPÍTULO 1 – ÁCIDO ASCÓRBICO AUMENTA O METABOLISMO	
MITOCONDRIAL HEPÁTICO DE FRANGOS DE CORTE.....	17
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
APÊNDICE	39
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	40

1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte cresceu intensamente no Brasil nas últimas décadas, garantindo ao país uma posição de destaque entre os maiores produtores mundiais de carne de frango. Segundo o relatório anual de 2016 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2015 o Brasil produziu um total de 13,14 e exportou 4,3 milhões de toneladas de carne de frango, o que gerou uma receita de 7,16 bilhões de dólares. O país é o segundo produtor mundial e ocupa a liderança na exportação de carne de frango no mundo (ABPA, 2016).

As dietas para frangos de corte são formuladas com a combinação de ingredientes em proporções adequadas para atender as exigências das aves em cada fase de criação e assim atingir o perfil nutricional desejado, visando ótimo desempenho. Entre os componentes utilizados na formulação estão os suplementos de micronutrientes, como as vitaminas e os minerais (FÉLIX *et al.* 2009).

As vitaminas são compostos orgânicos, que desempenham importantes funções no organismo, muitas delas agem como coenzimas sob condições fisiológicas e por isso desempenham papel relevante no metabolismo. Assim são fundamentais para a saúde, a reprodução e o crescimento, devendo receber a devida atenção na nutrição animal (GETOFF, 2013b; SAKOMURA, 2014).

O ácido ascórbico ou vitamina C age como cofator em processos de síntese e está envolvido no metabolismo da vitamina D₃, além de estimular o sistema imunológico (JEONG *et al.* 2011; CHAMBIAL *et al.* 2013). Esta vitamina tem sido utilizada na suplementação de dietas de frangos de corte quando existem altas temperaturas no ambiente de criação (SAHIN *et al.* 2002; LOHAKARE *et al.* 2005a). Ela ameniza os efeitos deletérios causados pelo estresse por calor, contribuindo para a obtenção de melhores índices de desempenho (NASEEM *et al.* 2005; TOPLU *et al.* 2014). Apesar de serem capazes de sintetizar o ácido ascórbico, frangos de corte apresentam uma limitação na produção dessa vitamina em condições de estresse como fome, doenças infecciosas e alta temperatura ambiental. Nessas situações, os níveis

de ácido ascórbico no organismo dessas aves podem ser esgotados comprometendo o desenvolvimento (ANIM-AMAKYE *et al.* 2000).

Outro problema é que as aves jovens possuem uma capacidade limitada de síntese dessa vitamina (CHAND *et al.* 2014). Assim a suplementação da dieta na fase pré-inicial de criação é importante para suprir as exigências desses animais o que pode refletir no desempenho no período final de criação (VIEIRA, 2000).

O ácido ascórbico é uma substância de ação antioxidante (GETOFF, 2013a) esta função é de extrema importância para os mecanismos de defesa do organismo contra os intermediários reativos ou espécies reativas de oxigênio (ERO), também chamados de radicais livres, os quais são produzidos durante a respiração celular durante a redução do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons (ADIKWU e DEO, 2013).

Por ser um forte agente redutor o ácido ascórbico é facilmente convertido, de forma reversível, à sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico (HACISEVKI, 2009). A facilidade de oxidação faz com que essa vitamina seja instável principalmente na presença de alta temperatura, oxigênio, luz e meio alcalino (CHAMBIAL *et al.* 2013).

Uma vez que as mitocôndrias são responsáveis por processos oxidativos, alterações neste processo prejudicam a dinâmica da respiração celular. O excesso de radicais livres ou estresse oxidativo pode comprometer as funções celulares, a homeostase do organismo e conseqüentemente o desempenho animal (PIEKARSKI *et al.* 2014). A literatura aponta que as mitocôndrias são os principais alvos do estresse oxidativo (CABEZAS *et al.* 2012). Estudos mostram que há uma relação entre função mitocondrial e eficiência alimentar em frangos de corte (BOTTJE *et al.* 2002; TINSLEY *et al.* 2010). Isso indica que o funcionamento do metabolismo mitocondrial pode influenciar as características de desempenho desses animais.

Uma vez que a disfunção mitocondrial está relacionada ao desempenho desses animais e o efeito da suplementação com ácido ascórbico sobre o consumo de oxigênio mitocondrial nessa espécie é pouco conhecido, se torna relevante avaliar as alterações que a suplementação com esta vitamina pode causar no metabolismo mitocondrial de frangos de corte. Assim, o objetivo

deste trabalho consistiu em avaliar o efeito do ácido ascórbico sobre características de desempenho, biometria e metabolismo de mitocôndrias isoladas de fígado de frangos de corte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vitaminas na nutrição de frangos de corte

A avicultura é uma atividade de destaque no setor agropecuário e, fatores como genética, sanidade, manejo e nutrição permitiram o aumento na produção da carne de frango (RIBEIRO *et al.* 2008). Na produção avícola a nutrição se destaca como um fator determinante para melhores índices de desempenho, a formulação comercial de dietas para frangos de corte permite a combinação de ingredientes em proporções adequadas, atendendo às exigências de nutrientes em cada fase de criação (BERTECHINI, 2012). O fornecimento de uma dieta que atenda todas as exigências dos animais especialmente no período inicial de criação das aves se torna indispensável para obtenção de bons índices de desempenho, uma vez que este período é considerado crítico e perdas no desenvolvimento das aves nessa fase são limitantes (ARAÚJO *et al.* 2002).

Os microelementos como as vitaminas e os minerais são utilizados em dietas com o objetivo de alcançar o perfil nutricional adequado (FÉLIX *et al.* 2009). As vitaminas são compostos orgânicos precursores de coenzimas mediadoras ou participantes de reações bioquímicas fundamentais para o organismo. São necessárias em quantidades pequenas quando comparadas com proteínas e carboidratos, no entanto exercem importantes funções metabólicas e a omissão de uma única vitamina essencial na dieta de uma espécie irá produzir sinais e sintomas de deficiência (MCDOWELL, 2000; SAKOMURA, 2014).

Pode-se dividir as vitaminas em dois grupos de acordo com sua solubilidade, sendo estes constituídos pelas vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e hidrossolúveis (complexos de B e ácido ascórbico) (CHAMBIAL *et al.* 2013). As vitaminas lipossolúveis estão envolvidas principalmente com o desenvolvimento e a manutenção das estruturas dos tecidos e podem ser armazenadas no organismo. Já as hidrossolúveis participam como cofatores nas reações metabólicas e a maioria delas é exigida pelo organismo em quantidades menores quando comparadas às vitaminas lipossolúveis e são facilmente absorvidas (FÉLIX *et al.* 2009).

A utilização de algumas vitaminas na suplementação de frangos de corte é uma alternativa para melhorar a resposta imune das aves, uma vez que algumas destas podem exercer efeitos positivos sobre células do sistema imunológico (KHAN *et al.* 2012a).

2.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico também conhecido como vitamina C é um componente solúvel em água e doador de elétrons que ocorre nas formas reduzida (ácido ascórbico) e oxidada (ácido dehidroascórbico) (CHAMBIAL *et al.* 2013). É um forte agente redutor e é facilmente oxidado em uma reação reversível, o que permite a transformação de uma forma em outra (HACISEVKI, 2009) (Figura 1).

Esta vitamina é absorvida no estômago e no lúmen intestinal de uma maneira semelhante aos monossacarídeos, através de transporte ativo secundário. A absorção é realizada através de uma proteína de transporte e ocorre prontamente quando ingerida em quantidades pequenas e é limitada no caso de ingestão de quantidades excessivas (SAKOMURA, 2014). O ácido ascórbico é amplamente distribuído ao longo dos tecidos (MCDOWELL, 2000). Depois de absorvido pelo epitélio intestinal, difunde-se pelos capilares do sistema circulatório e a forma oxidada e livre é filtrada pela circulação renal (CHAMBIAL *et al.* 2013).

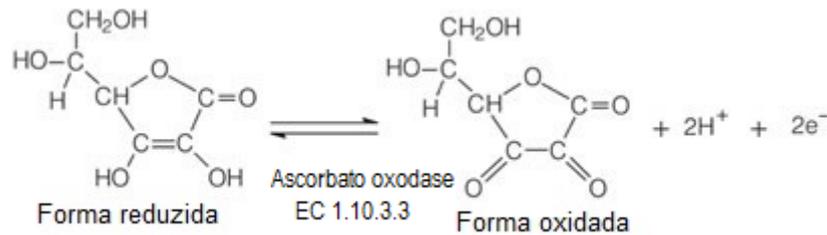


Figura 1 Estruturas do ácido ascórbico nas formas reduzida (ácido ascórbico) e oxidada (ácido dehidroascórbico) (Adaptado de FIORUCCI *et al.* 2003).

Em uma variedade de funções, o papel do ácido ascórbico no metabolismo celular pode ser explicado por suas propriedades redutoras, pois assim protege os componentes celulares dos danos oxidativos (HACISEVKI, 2009). Ele atua como coenzima nas reações de hidroxilação por isso está envolvido em uma série de processos biológicos como a síntese de colágeno e de carnitina (CHAMBIAL *et al.* 2013). Tem a capacidade de ceder e receber elétrons, o que lhe confere um papel essencial como antioxidante (GETOFF, 2013a). Além disso, estimula a atividade de células fagocíticas do sistema imunológico (JEONG *et al.* 2011). O ácido ascórbico interage com a vitamina E para auxiliá-la a retornar à sua forma ativa agindo na inibição da peroxidação dos lipídeos de membranas e na proteção de moléculas de DNA (ADIKWU e DEO, 2013).

O ácido ascórbico é sintetizado pela maioria das espécies animais, exceto os primatas, porquinhos da Índia, morcegos frugívoros peixes e algumas espécies de aves (LYKKESFELDT e MICHELS, 2014). Apesar de frangos de corte terem a capacidade de sintetizar essa vitamina para crescimento e desenvolvimento normais, certas condições estressantes como fome, doenças infecciosas e alta temperatura ambiental, podem esgotar os níveis de ácido ascórbico no organismo e limitar a síntese orgânica endógena (KHAN *et al.* 2012b). Além disso, aves jovens possuem a capacidade limitada de síntese de ácido ascórbico (CHAND *et al.* 2014).

Geralmente a síntese dessa vitamina ocorre a partir da glicose a qual é convertida em L-ácido ascórbico por reações de oxidação, nas aves galiformes

ocorre no rim onde a D-glicose é convertida D-glucuronolactona e, em seguida 2-gulonolactona é convertida a ácido ascórbico (LOHAKARE *et al.* 2005a) (Figura 2). Hooper *et al.* (2000) observaram que há diferença na atividade da enzima L- gulonolactona oxidase, presente no passo final da síntese de ácido ascórbico em aves domésticas. Os autores perceberam que, em aves adultas, a atividade desta enzima é maior em fêmeas do que em machos e que além do sexo e idade, fatores como a privação de água e alimento por um período de 48h reduziu significativamente a atividades dessa enzima.

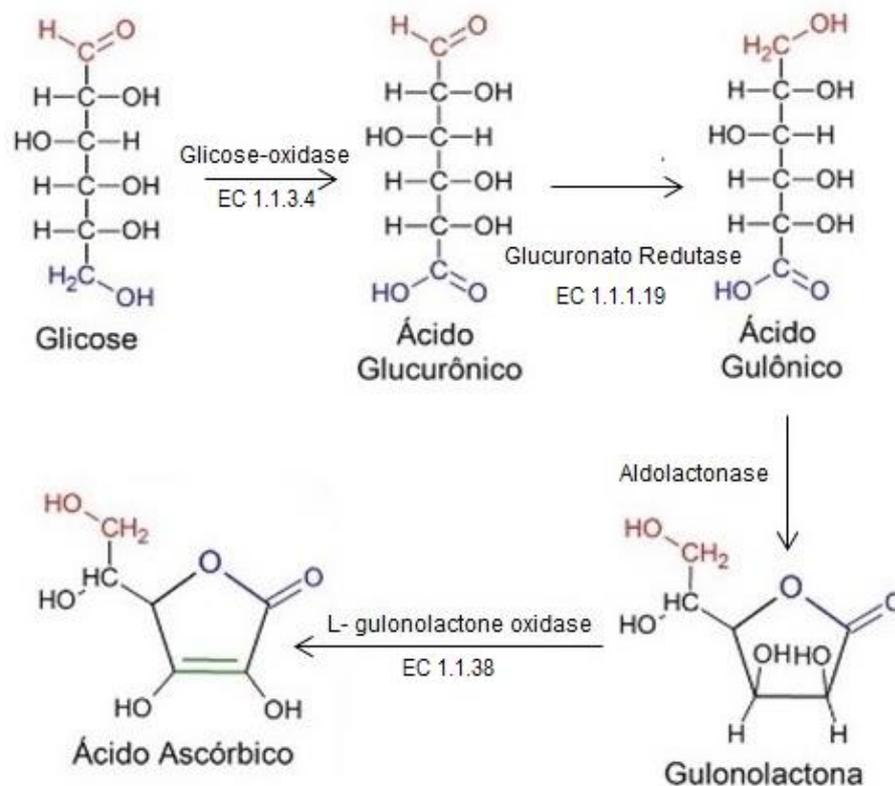


Figura 2 Resumo das reações da biossíntese de ácido ascórbico. (Adaptado de DAVIS *et al.* 1991)

Um aspecto particular do ácido ascórbico é a sua instabilidade. Como é um ácido, a vitamina C é completamente dissociada em pH neutro e alcalino. É muito suscetível à destruição através da oxidação, e esse processo é acelerado pelo calor e pela luz. Guilherme *et al.* (2009) observaram que esta vitamina sofre alterações quando exposta a altas temperaturas por períodos

prolongados. O ácido ascórbico é a menos estável de todas as vitaminas (MCDOWELL, 2000).

Por ser altamente suscetível à oxidação sob várias condições, algumas técnicas, como o revestimento da forma cristalina com etilcelulose, aumentam a estabilidade do ácido ascórbico alimentar. (CREEL *et al.* 2001). Devido à instabilidade da molécula do ácido ascórbico, novos componentes têm sido utilizados na formulação de ração, principalmente na alimentação de organismos aquáticos. O derivado fosforado ascorbil polifosfato, é uma das fontes utilizadas na alimentação desses animais pela boa estabilidade (FUJIMOTO e CARNEIRO, 2001). Trabalhando com galinhas poedeiras Salvador *et al.* (2009) utilizaram ascorbil polifosfato como fonte de vitamina C na suplementação da dieta de poedeiras e observaram que 100 ou 200mg/kg em associação com o colecalciferol proporcionou uma melhor conversão alimentar em poedeiras jovens e maior porcentual de gema dos ovos. Attia *et al.* (2016) utilizaram ácido ascórbico na forma de um produto estabilizado na suplementação de poedeiras e verificaram efeito benéfico da suplementação, juntamente com aminoácidos, no desempenho das aves.

A concentração de ácido ascórbico em rações sofre degradação fotoquímica, sendo assim necessários cuidados com o armazenamento de rações suplementadas com essa vitamina, dando prioridade aos ambientes com baixa luminosidade (GUILHERME *et al.* 2009).

2.3 Ácido ascórbico e sistema imunológico

O sistema imunológico possui interações celulares e moleculares complexas, que englobam respostas imunes, humoral e celular. Nessas respostas os linfócitos são as linhas de células primárias e os anticorpos são produzidos após contato inicial com antígenos (KHAN *et al.* 2012b). Em humanos o efeito do ácido ascórbico sobre o sistema imunológico é pronunciado sobre a resposta celular, esta vitamina estimula a proliferação de células T em resposta à infecção (CHAMBIAL *et al.* 2013). Segundo Jeong *et*

al. (2011) isso ocorre porque o ácido ascórbico impede a via que leva os linfócitos T à apoptose. Esses autores verificaram que culturas de células dendríticas de camundongos tratadas com ácido ascórbico apresentaram secreção aumentadas de interleucina 12. Para esses autores o ácido ascórbico estimulou a atividade de células T devido o aumento da secreção de IL-12 e assim direcionou os linfócitos T virgens a se diferenciarem em Th2.

Estudos com frangos de corte apontam que o ácido ascórbico, além da imunidade celular, também estimula a produção de anticorpos, como puderam observar Chand *et al.* (2014). Segundo esses autores, as aves que receberam dieta suplementada com 300mg/kg de ácido ascórbico apresentaram um aumento na média de títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle, doença infecciosa da bursa e bronquite Infecciosa. Segundo Khan *et al.* (2012b), o ácido ascórbico proporciona um aumento na resistência as doenças devido à manutenção da estabilidade das membranas dos leucócitos o que é fundamental para atividade fagocítica dos neutrófilos.

Segundo Anim-Amakye *et al.* (2000), a suplementação com 1.000mg/kg de ácido ascórbico na dieta de frangos de corte, por 31 dias, teve efeitos benéficos sobre a resposta de anticorpos à vacinação contra a doença infecciosa bursal. As aves que receberam dieta suplementada e foram desafiadas com uma cepa do vírus com a doença não apresentaram sinais clínicos e tiveram maiores títulos de anticorpos contra o vírus causador da doença infecciosa bursal quando comparadas com aves do grupo controle.

Frangos de corte que receberam suplementação com 100mg/kg de ácido ascórbico na ração apresentaram maior número de linfócitos TCD4⁺ e as aves que receberam 200mg/kg apresentaram maiores títulos de anticorpos contra doença de gumboro e de Newcastle (LOHAKARE *et al.* 2005b). A suplementação da dieta com ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico proporcionou aumentado peso relativo da bursa de Fabricius, timo e baço de frangos de corte submetidos a estresse por calor (34-36°C nas 3^a, 4^a e 5^a semanas de criação) (NASEEM *et al.* 2005). Segundo esses autores o ácido ascórbico diminui os níveis de corticosteroides, os quais causam atrofia de órgãos associados ao sistema imunológico.

2.4 Ácido ascórbico na suplementação da dieta de frangos de corte

A suplementação da dieta de frangos de corte com ácido ascórbico pode ser uma alternativa para melhorar características de desempenho destes animais, quando estão submetidos a situações de estresse como altas temperaturas no ambiente de criação (SAHIN *et al.* 2002; SAHIN *et al.* 2003; NASEEM *et al.* 2005).

Em países tropicais a temperatura ambiente é um dos principais fatores físicos que influenciam características de desempenho de frangos de corte como eficiência alimentar e ganho de peso (KHAN *et al.* 2012a). Quinteiro-Filho *et al.* (2010) verificaram que o estresse por calor (31 ± 1 e 36 ± 1 ° C) aumentou o nível de corticosterona no soro, diminuiu a ingestão de alimentos e o ganho de peso em frangos de corte.

Vários estudos apontam que o ácido ascórbico melhora características de desempenho como consumo de ração, conversão alimentar e ganho de peso de frangos de corte (NASEEM *et al.* 2005; LOHAKARE *et al.* 2005a; MALEBANE *et al.* 2010; CHAND *et al.* 2014). Lohakare *et al.* (2005b) verificaram que a suplementação da dieta com 200mg/kg de ácido ascórbico exerceu efeito benéfico sobre características de desempenho de frangos de corte como ganho de peso e rendimento de carcaça. Segundo esses autores, o aumento do ganho de peso ocorreu devido ao aumento na digestibilidade dos nutrientes, já a melhoria sobre o rendimento de carcaça se deu devido à modulação da liberação de hormônios corticosteroides que reduziu o desequilíbrio de eletrólitos e o catabolismo das reservas corporais o que preveniu a desidratação nas aves.

A suplementação de 300mg/kg de ácido ascórbico na dieta promoveu melhores índices de consumo de ração, peso corporal e conversão alimentar em frangos de corte (CHAND *et al.* 2014). Segundo esses autores, condições estressantes diminuem a produção de anticorpos devido ao aumento na secreção de corticosteroides. A suplementação da dieta com ácido ascórbico diminui a produção destes hormônios contribuindo desta maneira, para

melhoria das características de desempenho por proporcionar aumento no consumo de ração.

Sahin *et al.* (2003), avaliaram o efeito de uma dieta suplementada com 400mg de cromo por quilo de ração, e 250 mg/ de vitamina C por quilo de ração, sobre o desempenho de frangos de corte e observaram que tanto separadamente como em combinação, houve aumento no ganho de peso corporal, consumo de ração, maior eficiência alimentar e melhor rendimento de carcaça das aves. Segundo esses autores o ácido ascórbico aumenta a degradação dos corticosteroides que são liberados durante o estresse. Estes hormônios aceleram a degradação de proteínas corporais e causa a supressão da resposta imunológica em frangos de corte, inibem a migração de granulócitos e monócitos ao foco inflamatório e inibem a síntese de citocinas. A secreção de glicocorticoides é uma resposta à hipertermia em animais, nas aves, além deste efeito, o estresse por calor induz o catabolismo proteico (FURUKAWA *et al.* 2016).

Malebane *et al.* (2010) verificaram que a suplementação com ácido ascórbico melhorou características de desempenho como conversão alimentar, taxa de crescimento e peso vivo de frangos nas diferentes fases de criação. Naseem *et al.* (2005) viram que a suplementação dietética com ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico em frangos de corte expostos a altas temperaturas afetou benéficamente características como eficiência alimentar e conversão alimentar. Segundo Tuleun *et al.* (2010) a suplementação da dieta de frangos de corte com ácido ascórbico (250 mg/kg de ração) juntamente com um programa de iluminação contínua (24horas de luz) melhorou o ganho de peso, conversão alimentar, e reduziu a gravidade de anomalias nas pernas e assim auxiliou o crescimento dos pintinhos.

Segundo SAHIN *et al.* (2003) o modo de ação do ácido ascórbico na melhoria das características de desempenho de frangos de corte pode ser explicado pela modulação da liberação de hormônios corticosteroides reduzindo assim o catabolismo das reservas corporais das aves.

Na primeira semana de criação a suplementação da dieta com ácido ascórbico é interessante uma vez que pintinhos passam por um período de 36 a 48h entre o nascimento das aves até o alojamento, com restrição hídrica e

alimentar (HUSSEINY et al. 2008). Desta maneira, a suplementação nessa fase de criação é importante para suprir as exigências desses animais o que pode refletir no desempenho dos animais no período final de criação (VIEIRA, 2000).

O período de restrição alimentar após a eclosão, comum devido à variação no tempo até o alojamento dos animais, está associado com atraso no desenvolvimento do trato gastrointestinal (BRAND *et al.* 2010) e também com comprometimento do sistema imunológico (BAR-SHIRA *et al.* 2005). Além disso, foi observado que a restrição alimentar, por um período de 48h, diminui a atividade da enzima L- gulonolactona oxidase responsável pela etapa final da conversão da glicose em ácido ascórbico (HOOPER *et al.* 2000).

2.5 Estresse oxidativo e ação antioxidante do ácido ascórbico

As mitocôndrias são orgânulos, presentes em todas as células eucarióticas, possuem sistema duplo de membranas que delimita dois espaços distintos, a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas (Figura 3). Estes orgânulos geram a energia na forma de moléculas de ATP e têm seu próprio material genético (TAO *et al.* 2014). Realizam uma variedade de processos de geração de energia, tais como a fosforilação oxidativa, o ciclo de ácido cítrico e a β -oxidação (ARCOA e SATRÚSTEGUIA, 2005).

A fosforilação oxidativa resulta na produção de moléculas de ATP e é um processo essencial para a função celular (FEDERICO *et al.* 2012). Além disso, é responsável por cerca de 90% da produção de energia celular sendo o restante derivado da glicólise (PIEKARSKI *et al.* 2014). As mitocôndrias também estão envolvidas em várias atividades celulares como a apoptose, crescimento e envelhecimento (BENARD *et al.* 2007).

A cadeia respiratória mitocondrial é formada por um grupo de cinco complexos enzimáticos situados na membrana mitocondrial interna, são eles: complexo I (NADH oxidoreductase-ubiquinona); complexo II (succinato-oxidoreductase ubiquinona); complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidase

redutase); complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase) (Figura 3). O complexo I catalisa a transferência de dois elétrons do NADH para a ubiquinona (ou coenzima Q) formando-se NAD⁺ e ubiquinol. O complexo III catalisa a transferência de dois elétrons do ubiquinol para o citocromo c, o complexo IV catalisa a transferência de dois elétrons da forma reduzida do citocromo C para o oxigênio (CHINNERY e SCHON, 2003).

O complexo II possui subunidades para receber elétrons via FADH₂. No complexo V é onde ocorre a síntese de moléculas de ATP (HUTTEMANN *et al.* 2011). A integridade estrutural e funcional dos complexos da cadeia respiratória é importante para o bom funcionamento da mitocôndria e conseqüentemente para o fornecimento de energia para os vários processos celulares (IQBAL *et al.* 2004).

Cofatores reduzidos (NADH e FADH₂) são aceptores de elétrons do metabolismo energético que doam elétrons para a cadeia respiratória e a energia derivada do transporte desses elétrons é utilizada para bombear prótons (H⁺) para fora da matriz. O retorno desses prótons à matriz é acoplado à síntese de moléculas de ATP através da ATP sintase (BOTTJE e KONG, 2013).

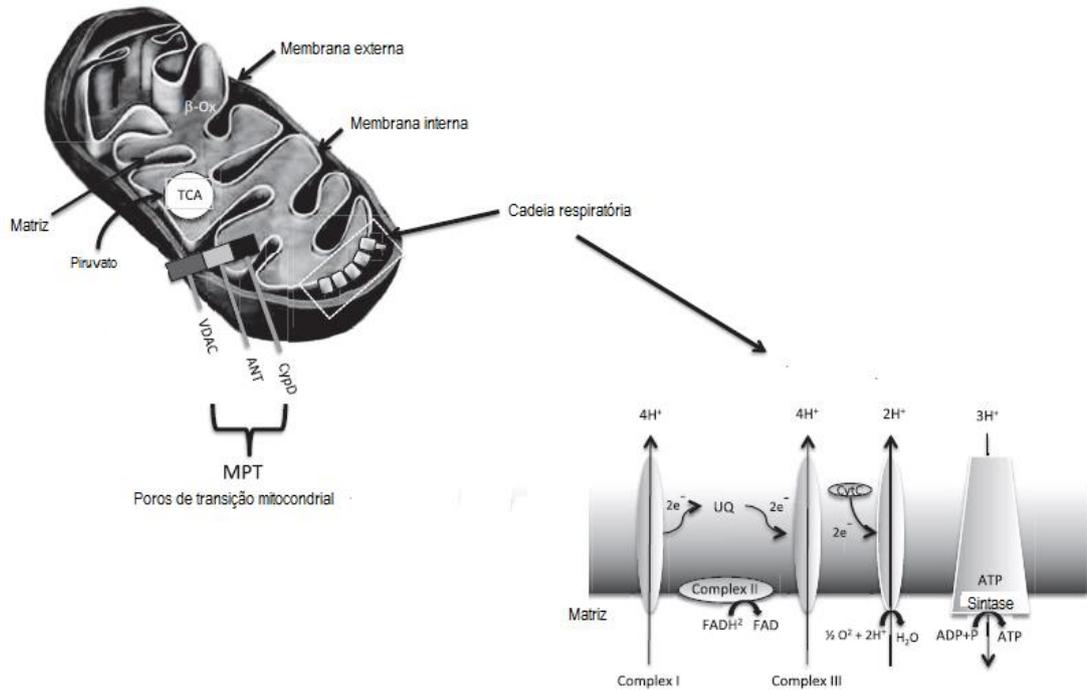


Figura 3 Esquema da estrutura mitocondrial com destaque para os complexos da cadeia respiratória (Adaptado de Davis e Williams, 2012).

As reações que ocorrem na cadeia respiratória mitocondrial produzem compostos como o ânion superóxido (O_2^\bullet), o radical hidroxila (HO^\bullet), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são denominados espécies reativas de oxigênio também chamados de radicais livres. Esse termo refere-se a um átomo ou molécula altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (SIES *et al.* 2005). Aproximadamente 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias é reduzido de forma univalente, dando origem assim aos radicais livres (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio forma o radical superóxido ($O_2 + e \rightarrow O_2^\bullet$). Por um processo denominado dismutação, o radical superóxido, ao receber íons de hidrogênio, gera peróxido de hidrogênio ($2O_2^\bullet + 2H \rightarrow H_2O_2$), esta reação é catalisada pela superóxido dismutase. Íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, e isto os torna potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres especialmente, por meio das reações de Fenton, quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre que resultam na formação do radical hidroxila ($Fe^{2+}/Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow OH^\bullet + OH + Fe^{3+}/Cu^{2+}$) e Haber-Weiss, na qual tais íons também

podem catalisar a reação entre peróxido de hidrogênio e radical superóxido gerando, da mesma forma, o radical hidroxila ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$) (BARBOSA *et al.* 2010).

Se não forem metabolizados pelas defesas antioxidantes os radicais livres podem oxidar biomoléculas críticas como lipídeos, proteínas e DNA (BOTTJE *et al.* 2006). As reações que dão origem a formação dos radicais livres ocorrem fisiologicamente e, em condições normais, há um equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes. No entanto, um desequilíbrio nestas reações em situações patológicas, por exemplo, resultam em estresse oxidativo, levando muitas vezes a apoptose e morte celular (TURRENS, 2003; SIES *et al.* 2005; PIEKARSKI *et al.* 2014).

Antioxidantes são substâncias que atrasam ou inibem os processos de oxidação e assim protegem as células contra os efeitos dos radicais livres, eles podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos. O sistema de defesa enzimático compreende as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, já o não enzimático é composto por substâncias de ação antioxidante como vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA *et al.* 2010). O principal modo de ação dos antioxidantes consiste na remoção de iniciadores e propagadores dos radicais livres, esses compostos transferem átomos de H, o que estabiliza os radicais livres deixando-os com baixa reatividade (FELLENBERG e SPEISKY, 2006).

O ácido ascórbico possui a capacidade de emitir elétrons em meio polar e isto faz deste elemento um poderoso antioxidante não enzimático (GETOFF, 2013b). Por ser solúvel em água, o ácido ascórbico capta radicais livres em fluidos extracelulares, além disso, ele é fonte de elétrons e, portanto, pode doá-los para os radicais hidroxila e superóxido (ADIKWU e DEO, 2013). O ácido ascórbico pode eliminar de forma direta os radicais livres ou inibir a sua formação rapidamente. Além disso, pode agir no auxílio das defesas antioxidantes endógenas, assim ele protege o DNA das células e combate os efeitos de toxinas (EL-GENDY *et al.* 2010).

A concentração de ácido ascórbico nos tecidos é diminuída pelo estresse oxidativo, assim a suplementação da dieta com essa vitamina é importante para frangos de corte a fim de proteger os tecidos contra os danos

de espécies reativas de oxigênio (BERZINA *et al.* 2013). Egbuniwe *et al.* (2016) observaram efeito antioxidante do ácido ascórbico em frangos de corte. Os autores perceberam que as aves do grupo controle apresentaram menor atividade das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase quando comparadas aquelas que receberam a suplementação com 50mg/kg de ácido ascórbico na dieta.

Em resposta ao estresse oxidativo as células recorrem à reserva bioenergética para aumentar a síntese de ATP via fosforilação oxidativa (HILL *et al.* 2010). Segundo Cabezas *et al.* (2012) as mitocôndrias são os principais alvos deste processo, o qual provoca falha bioenergética através da ativação de mecanismos diferentes e produção de moléculas oxidativas. Aves domésticas como frangos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo por serem selecionados para o grande desenvolvimento de músculos do peito e taxas de crescimento mais rápidas (SIHVO *et al.* 2013).

Nos animais vivos, o estresse oxidativo constitui um mecanismo importante que leva a danos biológicos, condições patológicas, e prejudica o crescimento de frangos de corte (FELLENBERG e SPEISKY, 2006). Estudos realizados com frangos de corte submetidos a altas temperaturas (34-35°C) mostram que houve estresse oxidativo mitocondrial nestas condições. Isto foi verificado em células do músculo esquelético por Azad *et al.* (2010), e também no tecido hepático, onde ocorreu um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase e da peroxidação lipídica levando a diminuição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial como visto por Yang *et al.* (2010). Liang *et al.* (2015) avaliaram frangos de corte alimentados com óleo de soja moderadamente oxidado e puderam perceber que o crescimento, o consumo de ração, e o sistema imune de frangos jovens foram comprometidos devido ao estresse oxidativo diante da dieta fornecida.

A função mitocondrial pode ser estimada através da medida do consumo de O₂ por polarografia (CAWTHON *et al.* 1999). Mitocôndrias isoladas apresentam o estágio I da respiração celular, que representa o consumo endógeno, após a adição de um substrato energético como o succinato essas organelas exibem um consumo de O₂ maior, este é o chamado estágio II da respiração. Após todo o substrato ser consumido, adiciona-se (ADP) e inicia-se

o estágio III, o qual é seguido de uma diminuição no consumo de O₂ que representa o estágio IV da respiração (BOTTJE *et al.* 2002; HONG *et al.* 2015; MURPHY *et al.* 2015).

Uma disfunção mitocondrial pode causar impacto sobre o desempenho de animais de produção. Vários estudos mostram que há uma relação entre função mitocondrial e eficiência alimentar em frangos de corte (BOTTJE *et al.* 2002; TINSLEY *et al.* 2010). Iqbal *et al.* (2001) verificaram, que a disfunção mitocondrial em células do pulmão estava associada ao estresse oxidativo em frangos com síndrome de hipertensão pulmonar. Ainda segundo esses autores, as aves com resistência a esta síndrome apresentaram fosforilação oxidativa mais eficiente em mitocôndrias do pulmão e um grau inferior de estresse oxidativo.

Um estudo realizado por Bottje *et al.* (2002) mostrou haver uma ligação entre função mitocondrial e a expressão fenotípica de eficiência alimentar em animais de uma mesma linhagem. Segundo esses autores, o acoplamento da cadeia respiratória foi inferior em aves com baixa eficiência alimentar devido à baixa atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória. Iqbal *et al.* (2005) avaliaram células hepáticas e verificaram que houve evidência para a associação da função mitocondrial com eficiência alimentar, indicando assim um efeito negativo do estresse oxidativo sobre esta característica de desempenho.

A disfunção mitocondrial em frangos de corte foi relatada ainda no estresse por calor no ambiente de criação (HUANG *et al.* 2015) e com a utilização de doses excessivas de cobre (Cu⁺) na dieta (SU *et al.* 2011). No entanto, Acetoze *et al.* (2016) utilizaram níveis de cobre e zinco acima dos recomendados, e não observaram efeito sobre o consumo de oxigênio mitocondrial de células hepáticas.

CAPÍTULO 1 – ÁCIDO ASCÓRBICO AUMENTA O METABOLISMO MITOCONDRIAL HEPÁTICO DE FRANGOS DE CORTE

Artigo a ser Submetido ao Periódico Research Veterinary in Science, Qualis A2 na Área de Zootecnia.

RESUMO: O ácido ascórbico ou vitamina C reduzida está envolvido em muitas funções essenciais no organismo. Essa vitamina tem sido utilizada na suplementação de dietas de frangos de corte com objetivo de melhorar as características de desempenho desses animais principalmente em situações de estresse. É capaz de eliminar radicais livres que são gerados em vários processos fisiológicos como a respiração celular. O acúmulo dessas moléculas pode debilitar o sistema de defesa dos animais e causar estresse oxidativo o que compromete as funções celulares. As mitocôndrias são os principais alvos do estresse oxidativo e uma disfunção mitocondrial pode causar impacto sobre o desempenho de animais de produção. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico protegido, sobre características de desempenho, biometria e metabolismo mitocondrial de células hepáticas de frangos de corte. Foram utilizados 832 pintos de 1 dia de idade, machos da linhagem Cobb-500 os quais foram alojados em um galpão experimental dividido em 32 boxes. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (0; 2,5; 5 e 10 mg/kg de suplementação de ácido ascórbico protegido nas dietas, na fase pré-inicial de criação) e 08 repetições. A repetição foi constituída por 26 aves. Avaliou-se o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), e conversão alimentar (CA). Além da viabilidade, peso e biometria de órgãos e anexos digestivos, além do metabolismo mitocondrial. Os resultados mostraram que a suplementação de dietas com ácido ascórbico, realizada na fase pré-inicial de criação (1-10 dias de idade) exerceu efeito benéfico em características como ganho de peso e conversão alimentar, na fase inicial de criação (até 21 dias de idade). A suplementação com ácido ascórbico não influenciou a biometria de vísceras (baço, bolsa cloacal e coração) e do trato digestório (intestino delgado, pâncreas e fígado). Foi observado que as aves alimentadas com rações suplementadas com 10mg/kg de ácido ascórbico apresentaram maior consumo de oxigênio mitocondrial no tecido hepático após estímulo com substrato energético (succinato). Assim pode-se concluir que a utilização de ácido ascórbico protegido em dietas, na fase pré-inicial pode melhorar o metabolismo mitocondrial hepático e também o desempenho frangos de corte.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, frango de corte, mitocôndria, suplementação, vitamina C

1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico também conhecido como vitamina C está envolvido em muitas funções essenciais no organismo como a síntese de colágeno e carnitina, além do metabolismo da vitamina D₃ (Chambial et al. 2013). Essa vitamina é um forte agente redutor e por isso é facilmente oxidado a ácido dehidroascórbico, em uma reação reversível (Hacisevki, 2009). Isso faz com que essa molécula seja suscetível à oxidação tornando-a instável principalmente na presença de alta temperatura, oxigênio, luz e meio alcalino (Chambial et al. 2013).

A vitamina C tem sido utilizada na suplementação de dietas de frangos de corte, com objetivo de diminuir os efeitos negativos causados em decorrência de altas temperaturas no ambiente de criação (Sahin et al. 2002; Naseem et al. 2005). O ácido ascórbico modula a liberação de corticosteroides e atua diminuindo os níveis desses hormônios no organismo. Dessa forma essa vitamina é capaz de melhorar as características de desempenho de frangos de corte, pois auxilia na redução do catabolismo das reservas corporais das aves (Pardue et al. 1985; Sahin et al. 2002; Sahin et al. 2003).

Apesar de serem capazes de sintetizar o ácido ascórbico, frangos de corte apresentam uma limitação na produção dessa vitamina em condições de estresse como fome, doenças infecciosas e alta temperatura ambiental. Nessas situações, os níveis de ácido ascórbico dessas aves podem se esgotar comprometendo assim o desenvolvimento (Anim-Amakye et al. 2000).

Em aves jovens esse problema torna-se mais grave uma vez que possuem a capacidade limitada de síntese de ácido ascórbico (Chand et al. 2014). Além disso, na primeira semana de vida, frangos de corte passam por situações de estresse (transporte, vacinação, adaptação hídrica e alimentar) que fazem com que a síntese dessa vitamina fique mais prejudicada (Vieira, 2000).

No campo, é comum um jejum de até 72h após a eclosão, devido ao alojamento dos animais, o que está associado com atraso no desenvolvimento do trato gastrointestinal (Brand et al. 2010) e com o comprometimento do desenvolvimento do sistema imunológico (Bar Shira et al. 2005). Por fim, sabe-

se que a restrição alimentar por um período de 48h diminui a atividade da enzima L-gulonolactona oxidase, que é responsável pela etapa final na conversão da glicose em ácido L-ascórbico (Hooper et al. 2000).

Os efeitos do ácido ascórbico no metabolismo se devem em grande parte à sua capacidade de ceder elétrons o que a torna um eficiente antioxidante (Getoff, 2013). Assim essa vitamina é capaz de eliminar radicais livres (Chambial et al. 2013) que são gerados em vários processos fisiológicos como a respiração celular (Bottje et. al 2013) e endocitose (Maggini et al. 2007). Sabe-se que o acúmulo de radicais livres pode debilitar o sistema imunológico dos animais (Zhang et al. 2011) e que o excesso de radicais livres causa estresse oxidativo o qual pode comprometer as funções celulares, a homeostase do organismo e conseqüentemente o desempenho animal (Piekarski et al. 2014).

As mitocôndrias são os principais alvos do estresse oxidativo (Cabezas et al. 2012). Visto que uma disfunção mitocondrial pode causar impacto sobre o desempenho de animais de produção e que vários estudos apontam uma relação entre função mitocondrial e eficiência alimentar em frangos de corte (Bottje et al. 2002; Tinsley et al. 2010). Diante disso, objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da suplementação de ácido ascórbico sobre características de desempenho, biometria e no metabolismo de mitocôndrias isoladas de células do fígado de frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento e tratamentos experimentais

Todos os procedimentos realizados com os animais atenderam ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e ao Conselho Nacional e Internacional de Medicina Veterinária (protocolo 23007.015982/2016-45). Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições. Os tratamentos avaliados, foram 4 níveis (0; 2,5; 5 e 10mg/kg) de ácido ascórbico na forma de uma molécula

protegida de 5% de ácido ascórbico polietoxilado (produto comercial Medivita C Premix) nas rações, na fase de 1 a 10 dias.

2.2 Animais e instalações

Foram utilizados 832 pintinhos com um dia de idade da linhagem Cobb-500. As aves foram obtidas de incubatório comercial localizado a cerca de 2.000 Km de distância do local do aviário simulando condições de atraso para alojamento. Tais condições ainda são corriqueiras em cidades com granjas comerciais distantes dos incubatórios. As aves foram alojadas, até o período de 21 dias de idade, em um galpão experimental dividido em 32 boxes com dimensões de 1,55 X 1,66 m. Cada box (parcela experimental) foi composto por 26 aves (10,11 ave/m²). Em cada box foram distribuídos um bebedouro pendular e um comedouro tubular e cama de maravalha (primeiro ciclo de uso). O aquecimento na fase inicial foi realizado através de campânulas com lâmpadas infra-vermelho (150 watts) individuais. Foi feito uso de cortinas laterais para auxiliar na manutenção da temperatura dentro da faixa de conforto das aves jovens, além de favorecer a ventilação do galpão após a fase de aquecimento. Foi utilizado um programa com 23 horas de luz na primeira semana e 12 horas de luz na segunda e terceira semana de criação, das aves. As condições de temperatura e umidade relativa do ar no ambiente de criação foram monitoradas diariamente e foi registrada uma temperatura média de 29,4°C e umidade relativa do ar média de 48%.

2.3 Dietas e manejo experimental

As aves foram alimentadas com rações à base de milho, farelo de soja e com suplementação de fitase (500 U/kg de ração e redução em 0,1 ponto porcentual para fósforo disponível e cálcio), seguindo um programa alimentar com rações pré-inicial (1-10 dias) e inicial (11-21 dias) de acordo com as recomendações nutricionais preconizadas para a linhagem. A suplementação

de ácido ascórbico (níveis) nas rações foi efetuada na fase pré-inicial visando avaliar principalmente o potencial da vitamina em amenizar o estresse de alojamento em dias iniciais de criação. As aves tiveram livre acesso à água e às rações, as quais tiveram composição nutricional e de ingredientes semelhantes (com exceção dos níveis de ácido ascórbico avaliados) em todas as fases sendo assim isonutritivas (Tabela 1).

Tabela 1. Formulação e composição nutricional das rações experimentais.

INGREDIENTES	Fases de criação	
	Pré-inicial (1-10 dias)	Inicial (11-22 dias)
Milho	56,789	62,541
Farelo de Soja	37,571	32,860
Óleo de Soja	2,183	2,392
Fosfato bicálcico	1,089	0,979
Calcário	0,933	0,887
Sal	0,503	0,482
Metionina MHA 84%	0,353	0,299
L-Lisina HCL 78%	0,181	0,169
L-Treonina 98%	0,010	-
Premix Minerais ¹	0,050	0,050
Premix Vitaminas ²	0,120	0,100
Cloreto Colina 60%	0,096	0,096
Enramicina 8%	0,010	0,010
Narasina 10%	0,050	0,070
Cobre orgânico ³	0,020	0,020
Fitase (10.000U/g)	0,005	0,005
Inerte+Tratamento	0,040	0,040
Total	100,00	100,00
Proteína Bruta (%)	21,80	20,00
EMAn (Kcal/kg)	2980	3050
Cálcio (%)	0,90	0,84
Fósforo Disp. (%)	0,45	0,42
Sódio (%)	0,23	0,22
Lisina dig (%)	1,32	1,19
Met+Cis (%)	0,98	0,89
Treonina (%)	0,86	0,78
Triptofano (%)	0,27	0,24

¹ Enriquecimento de vitaminas por kg de ração: vitamina A – 10.800 UI; vitamina D3 – 3.000 UI; vitamina E – 24 UI; vitamina K3 – 3,0 mg; vitamina B1 – 1,8 mg; vitamina B2 – 7,2 mg; vitamina B6 – 3,6 mg; vitamina B12 – 14,4 µg; ácido pantotênico – 14,4 mg; niacina – 30 mg; ácido fólico – 0,96 mg; biotina - 0,072 mg.

² Enriquecimento de microminerais por kg de ração: cobre – 10,0 mg; ferro – 50 mg; iodo – 1,0 mg; manganês – 80 mg; selênio – 0,3 mg e zinco – 50mg.

³ Mintrex cobre 200g/t ração usado como AMD (foi considerada na nutrição a contribuição de metionina).

2.4 Características avaliadas

2.4.1 *Biometria e desempenho*

Aos 10 dias de idade, 32 aves (uma por parcela), foram selecionadas de maneira a representar o peso médio do grupo (peso médio \pm 2%) e eutanasiadas por deslocamento cervical, para mensuração de peso e biometria de órgãos e anexos digestivos (tamanho e peso de bursa, peso de baço, tamanho e peso de intestino delgado, peso do coração, de pâncreas e de fígado). As características de desempenho avaliadas foram ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA), nos períodos de 1 a 10 e de 1 a 21 dias. O ganho de peso foi determinado através da pesagem das aves no início e fim de cada um dos períodos experimentais. A partir dos dados de consumo de ração e ganho de peso foi calculada a conversão alimentar. A taxa de sobrevivência ou viabilidade de criação foi determinada aos 21 dias de criação subtraindo-se a mortalidade verificada em cada parcela

2.4.2 *Consumo de oxigênio mitocondrial hepático*

O metabolismo mitocondrial foi medido com a utilização de 24 aves (seis de cada tratamento), que foram eutanasiadas aos 21 dias por deslocamento cervical. Imediatamente após a eutanásia, foi coletado o fígado identificado e colocado em solução tampão de sacarose (25×10^{-2} M, pH 7,4 a 4°C). Os tecidos foram então homogeneizados na solução tampão e passaram por centrifugação fracionada a 4°C para separação dos componentes (Figura 1).

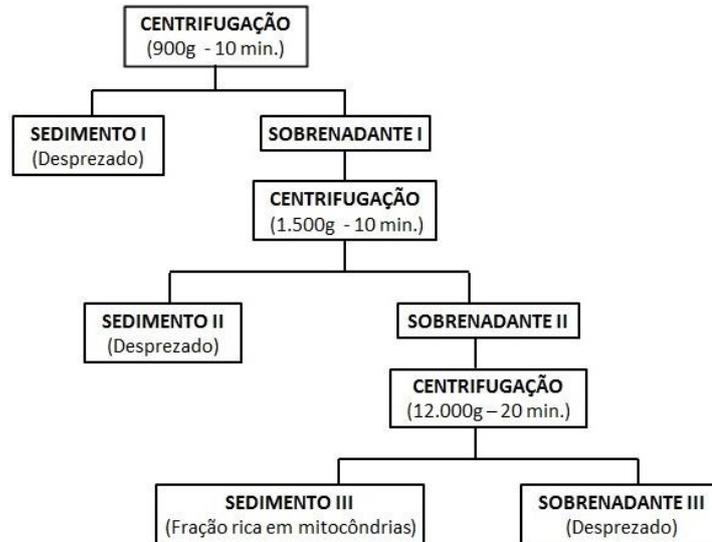


Figura 4 Esquema de centrifugação dos componentes para obtenção da fração rica em mitocôndrias (Adaptado RODRIGUES et al. 2007).

Após este procedimento o consumo de oxigênio foi medido utilizando um eletrodo tipo Clark, a 37°C em 3,0 mL de meio reacional (2,8 mL de suspensão mitocondrial e 0,2 mL de succinato de sódio, $3,3 \times 10^{-3}M$). Para isto, cada sedimento obtido da centrifugação em 12.000xg (rico em mitocôndrias) foi ressuspenso no mesmo volume do homogeneizado inicial, usando a solução tamponada de sacarose ($25 \times 10^{-2}M$, pH 7,4 a 4°C). As proteínas totais de cada amostra foram dosadas pela técnica de Lowry modificada por Komsa-Penkova et al. (1996), e a atividade respiratória mitocondrial expressa em nanolitros de oxigênio consumidos, por miligrama de proteínas totais, por minuto.

3. Análises estatísticas

As características de desempenho foram analisadas por meio de regressão polinomial. O metabolismo mitocondrial foi submetido à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre as médias dos tratamentos. As análises atenderam às suposições dos modelos em que os resíduos foram normalmente distribuídos e independentes. Todas as análises foram realizadas por meio do procedimento GLM do SAS. Adotou-se o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Características de desempenho e biometria

Os valores para as variáveis de desempenho ao final dos períodos de 1 a 10 e 1 a 21 dias em função do nível de ácido ascórbico das rações (0; 2,5; 5 e 10mg/kg) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Características de desempenho nos diferentes níveis de ácido ascórbico avaliados. Consumo de ração (CR); Ganho de peso (GP); Conversão alimentar (CA) e Viabilidade (VB %)

Características	Nível de ácido ascórbico (mg/kg)				EPM ¹	Regressão (p-valor)	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
	Fase pré-inicial (1-10 dias)						
CR (g/ave)	317	308	313	318	0,0017	0,486	0,089
GP (g/ave)	271	272	279	275	0,0013	0,188	0,152
CA	1,170	1,134	1,121	1,155	0,0049	0,422	<0,001
	Fase inicial (1-22 dias)						
CR (g/ave)	1385	1383	1389	1378	0,0040	0,576	0,595
GP (g/ave)	1037	1038	1060	1039	0,0035	0,619	<0,005
CA	1,336	1,333	1,310	1,326	0,0033	0,146	<0,005
VB%	98,55	97,61	97,59	98,55	0,3855	0,843	0,253

⁽¹⁾ Erro Padrão da Média

O consumo de ração e ganho de peso dos pintos de corte durante a fase pré-inicial (1 a 10 dias) não foram influenciados pelo nível de ácido ascórbico protegido (vitamina C) nas rações. Por outro lado, houve efeito quadrático dos níveis crescentes de ácido ascórbico que influenciaram significativamente a conversão alimentar das aves (CA: $Y = 1,1762 - 0,0189 + 0,0015 X^2$ $R^2 = 81,44$). O ajuste quadrático dos resultados demonstra que o nível estimado de 6,3 mg/kg é o que representa uma melhor conversão alimentar correspondente ao valor de 1,118.

Não houve efeito do nível de ácido ascórbico da ração sobre o diâmetro e peso relativo da bolsa cloacal, peso relativo do baço ou do coração aos 10 dias de idade (Tabela 3). Assim como não foi observada variação significativa

para o comprimento relativo do intestino delgado, nem para o peso relativo dos órgãos do trato digestório (intestino, fígado e pâncreas) em resposta a suplementação na fase pré-inicial (Tabela 4).

Tabela 3 Diâmetro (DBC) e peso relativo da bolsa cloacal (PRBC), peso relativo do baço (PRB) e do coração (PRC) de frangos de corte submetidos à rações com níveis crescentes de vitamina C protegida (10 dias de idade)

Características	Nível de ácido ascórbico (mg/kg)				EPM ¹	Regressão (p-valor)	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
DBC (mm)	10,71	11,11	10,71	11,91	0,2855	0,170	0,543
PRBC (%)	0,192	0,196	0,182	0,224	0,0083	0,185	0,304
PRB (%)	0,078	0,081	0,078	0,075	0,0036	0,689	0,732
PRC (%)	0,719	0,769	0,759	0,769	0,0156	0,380	0,513

⁽¹⁾ Erro Padrão da Média

Tabela 4 Tamanho relativo (TRID) e peso relativo do intestino delgado (PRID), peso relativo do fígado (PRF) e pâncreas (PRP) de frangos de corte submetidos à rações com níveis crescentes de vitamina C protegida (10 dias de idade)

Características	Nível de ácido ascórbico (mg/kg)				EPM ¹	Regressão (p-valor)	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
TRID (cm/kg)	300,2	285,8	287,0	290,6	3,9611	0,557	0,261
PRID (%)	5,11	4,81	4,90	5,00	0,0925	0,894	0,328
PRF (%)	4,12	4,10	3,99	3,98	0,0594	0,343	0,776
PRP (%)	0,404	0,348	0,378	0,391	0,0115	0,920	0,209

⁽¹⁾ Erro Padrão da Média

No período de 1 a 21 dias não foi verificada variação significativa do consumo de ração (CR) em função dos diferentes níveis de ácido ascórbico suplementados na fase pré-inicial (1 a 10 dias) quando considerado o período acumulado (fase pré-inicial + fase inicial de criação). Já o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA) apresentaram influência significativa com o aumento dos níveis de ácido ascórbico com efeito quadrático (GP: $Y = 1,0346 + 0,0047 - 0,0004 X^2$ $R^2 = 59,74$ e CA: $Y = 1,3377 - 0,0080 + 0,0006 X^2$ $R^2 = 68,24$). Diante disso, após ajuste quadrático, estima-se que os melhores níveis de ácido ascórbico protegido sejam os de 5,3 e 6,6mg/kg, respectivamente para maior GP e melhor CA dos frangos, ao final do ciclo de criação (21 dias de idade).

4.2 Consumo de Oxigênio

O consumo de oxigênio foi avaliado com e sem substrato energético (succinato de sódio). Os resultados mostraram que o consumo endógeno foi menor quando comparado com o consumo estimulado com succinato em todos os tratamentos. Os animais que receberam as dietas suplementadas com 2,5mg/kg de ácido ascórbico apresentaram maior consumo de oxigênio após a adição de substrato quando comparados com os demais tratamentos (Figura 5).

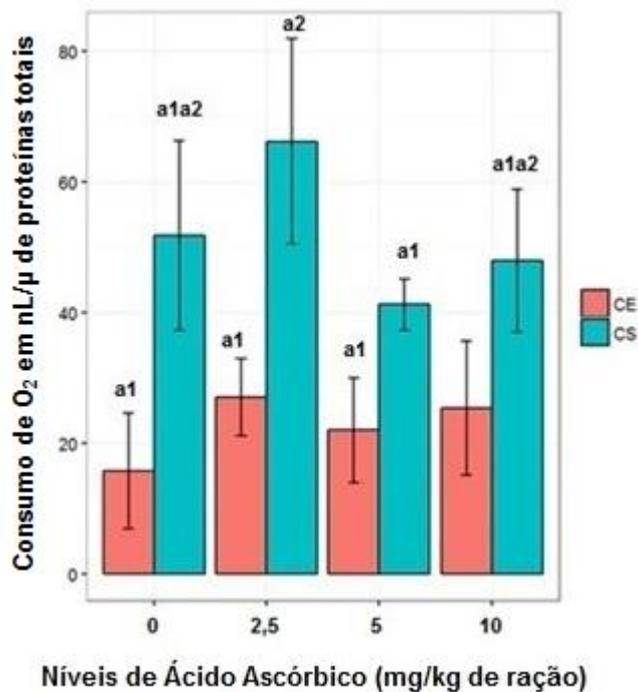


Figura 5 Consumo de oxigênio de mitocôndrias de fígado de frangos de corte que receberam dietas suplementadas com ácido ascórbico, Consumo Endógeno (CE) e Consumo com Substrato (CS).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo a suplementação da dieta de frangos de corte com ácido ascórbico na fase pré-inicial (1 a 10 dias) exerceu efeito positivo sobre a conversão alimentar nesse período de criação e sobre o ganho de peso e

conversão alimentar no período inicial de criação (1-21 dias). Além disso, influenciou de forma positiva o consumo de oxigênio após a adição de succinato de sódio como substrato energético.

No período pré-inicial de criação (1-10 dias) não houve efeito nas características como consumo de ração e ganho de peso. Diferente dos resultados obtidos por Lohakare et al. (2005) os quais perceberam que a suplementação da dieta com níveis de ácido ascórbico entre de até 200mg/kg exerceu efeito benéfico sobre o ganho de peso de frangos nas primeiras semanas de criação.

Segundo Lohakare et al. (2005) é comum o aumento do consumo de ração em aves que recebem dieta suplementada com ácido ascórbico sob condições estressantes em ambientes de produção comercial. Além disso, os autores afirmam que a suplementação com ácido ascórbico na primeira semana de vida é benéfica devido a limitação na síntese dessa vitamina durante essa fase da ave.

O efeito observado na conversão alimentar na fase pré-inicial nesse trabalho difere daqueles observados por Souza et al. (2011) e por Lohakare et al. (2004). Souza et al. (2011) utilizaram uma dose maior de ácido ascórbico na suplementação da dieta, enquanto que Lokahare et al. (2004), utilizaram níveis semelhantes, de ácido ascórbico, aos utilizados no presente estudo e ambos não encontraram resposta significativa para essa característica.

O efeito positivo na conversão alimentar pode ter ocorrido devido às condições de criação. Ao comparar a temperatura no ambiente de criação do presente estudo com aquelas utilizadas por Souza et al. (2011) e por Lokahare et al. (2004), observa-se uma média menor de temperatura. Além disso, o ácido ascórbico utilizado no presente estudo é uma fonte protegida (ascórbico polietoxilado) o que confere uma maior estabilidade à molécula dessa vitamina preservando seu efeito antioxidante por um período maior.

Lohakare et al. (2005) observaram que o ácido ascórbico proporcionou aumento do ganho de peso nas primeiras semanas de criação. Os autores observaram também que os animais que receberam dieta suplementada com ácido ascórbico apresentaram maior digestibilidade dos nutrientes e sugerem que isso culminou no aumento do ganho de peso, no entanto os autores

afirmam não haver justificativa para o aumento na digestibilidade dos nutrientes quando a vitamina C foi adicionada a dieta.

Esses autores relataram ainda que isso ocorreu devido ao fato das aves jovens apresentarem uma limitação na síntese de ácido ascórbico. Além disso, situações estressantes, como as que são frequentes nas primeiras semanas de alojamento, podem limitar a síntese e o metabolismo do ácido ascórbico em frangos de corte. Por isso a suplementação com essa vitamina durante essa fase proporcionou benefícios ao metabolismo das aves o que refletiu como melhor ganho de peso.

O consumo de ração não foi influenciado pelos diferentes níveis de ácido ascórbico suplementados na primeira semana de vida quando considerado o período de criação de 1 a 21 dias. No entanto, o ganho de peso e a conversão alimentar das aves foram influenciados significativamente. Esses resultados diferem dos encontrados por Souza et al. (2011), os quais não verificaram o efeito do ácido ascórbico no período de 1 a 21 dias no consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar, quando utilizaram 230mg/kg de ácido ascórbico na suplementação.

Os resultados obtidos para o período de 1 a 21 dias, se assemelham aos descritos por Sahin et al. (2003), que ao suplementarem com 250mg/kg de ácido ascórbico, observaram efeitos positivos sobre o ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte mantidos em alta temperatura neste período de criação. Provavelmente os efeitos da suplementação com ácido ascórbico na fase pré-inicial se refletiram no período de 1-21 dias. Ao realizar o ajuste quadrático os valores de 5,3 mg/kg e 6,6mg/kg de ácido ascórbico foram estimados para ganho de peso e conversão alimentar respectivamente, sendo assim os níveis recomendados para otimizar essas características de desempenho considerando a proteção da molécula que foi utilizada.

A biometria das vísceras do tecido linfóide reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante uma resposta imune (Ribeiro et al. 2008). O aumento do peso relativo das vísceras é atribuído à possível ação na redução da síntese de corticosterona, um efeito da ação do ácido ascórbico (Sahin et al. 2003). A análise das vísceras não confirmaram efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre o peso dos órgãos linfóide aos 10

dias de idade. Chand et al. (2014) verificaram um aumento do peso da bursa e do baço. Entretanto esses autores suplementaram a dieta com 300mg/kg de ácido ascórbico o que pode ter promovido essa diferença de resposta. Souza et al. (2011) também não verificaram diferença no peso do baço ao suplementar a dieta com 230mg/kg. O que levanta a questão de qual seria a quantidade necessária de ácido ascórbico para obtenção de um efeito benéfico dessa suplementação na biometria de vísceras.

Em frangos de corte o metabolismo mitocondrial tem de ser eficiente para suprir a demanda energética necessária ao rápido crescimento desses animais (Cawthon et al. 1999). Uma deficiência na função mitocondrial pode limitar a absorção de nutrientes e diminuir a capacidade de conversão alimentar (Ojano-Dirain et al. 2004). Estudos demonstram que o consumo de O_2 é maior em mitocôndrias de frangos de corte que apresentam melhores índices de eficiência alimentar (Bottje et al. 2002; Cawthon et al. 1999; Iqbal et al. 2004; Iqbal et al. 2005).

A função mitocondrial é avaliada através do monitoramento do consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas (Cawthon et al. 1999). O efeito da suplementação com ácido ascórbico sobre o metabolismo mitocondrial de frangos de corte é pouco conhecido. No presente estudo como esperado, foi observado um aumento no consumo de oxigênio após a adição de succinato. Isso demonstra a integridade das mitocôndrias do fígado desses animais sob estímulo após a suplementação de ácido ascórbico na dieta. (Cawthon et al. 1999; Bottje et al. 2013).

Aos 21 dias de idade, os frangos que receberam a suplementação com 2,5mg/kg de ácido ascórbico, apresentaram maior consumo de oxigênio, após a adição de substrato energético, em mitocôndrias hepáticas. Diante disso, sugere-se que a suplementação de ácido ascórbico protegido em dietas de frangos de corte nessa dose na fase pré-inicial de criação seja benéfica ao metabolismo mitocondrial das células hepáticas. Entretanto esse comportamento não foi observado com as demais doses nessa fase de crescimento. Isso indica que existe a necessidade de mais estudos para verificar o comportamento mitocondrial em diferentes fases de crescimento a

fim de definir a dose dessa vitamina para uma resposta mitocondrial mais eficiente.

6. CONCLUSÃO

O ácido ascórbico administrado na dieta de frangos de corte na fase pré-inicial (1-10 dias) é benéfico ao metabolismo mitocondrial na dose de 2,5mg/kg aos 21 dias de idade e para as características de desempenho como conversão alimentar (1-10 dias e 1-21 dias) e ganho de peso (1-21 dias) quando administrado na dose de 5mg/kg.

REFERÊNCIAS

- Anim - Amakye, J., Lin T. L., Hester, P. Y., Thiagarajan, D. , Watkins, B. A., Wu, C. C., 2000. Ascorbic Acid Supplementation Improved Antibody Response to Infectious Bursal Disease Vaccination in Chickens. **Poult. Sci** 79, 680–688.
- Bar Shira, E., Sklan, D., Friedman, A., 2005. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. **Vet. Immun. Immunopath.** 105, 33–45.
- Bottje, W., Tang, Z. X., Iqbal, M., Cawthon, D., Okimoto, R., Wing, T., Cooper, M., 2002. Association of Mitochondrial Function with Feed Efficiency within a Single Genetic Line of Male Broilers. **Poult. Sci.** 81, 546–555.
- Bottje, W.; Kong, B.W., 2013. Feed efficiency: Mitochondrial function to global gene expression. **J. Anim. Sci.** 91, 1582–1593.
- Brand, H. V. D., Molenaar, R., Star, I. V. D., Meijerhof, R., 2010. Early feeding affects resistance against cold exposure in young broiler chickens. **Poult. Sci.** 89, 716-720.
- Cabezas, R., El-Bacha, R. S., Gonzalez, J., Barreto, G. E., 2012. Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. **Neurosci. Res.** 74, 80-90.
- Cawthon, D., Mc New, R., Beers, K. W. , Bottje, W. G., 1999. Evidence of Mitochondrial Dysfunction in Broilers With Pulmonary Hypertension Syndrome (Ascites): Effect of T-Butyl Hydroperoxide on Hepatic Mitochondrial Function, Glutathione, And Related Thiols. **Poult. Sci.** 78, 114–124.
- Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., Sharma, P. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview., 2013. **Ind. J. Clin. Biochem.** 28, 314-328.
- Chand N., Naz S., Khan A., Khan S., Khan R. U., 2014. Performance traits and immune response of broiler chicks treated with zinc and ascorbic acid supplementation during cyclic heat stress. **Int. J. Biometeorol.** 58, 2153–2157.
- Getoff, N., 2013. Vitamin C: Electron Emission, Free Radicals and Biological Versatility. **In vivo** 27: 565-570.
- Hacisevki, A., 2009. An Overview of Ascorbic Acid Biochemistry **Ankara Ecz. Fak. Derg.** 38, 233 – 255.

- Hooper, C. L., Maurice, D. V., Lightsey, S. F., Toler, J. E., 2000. Factors affecting ascorbic acid biosynthesis in chickens. I. Adaptation of an assay and the effect of age, sex and food deprivation. **J. Anim. Phys. Anim. Nutr.** 84: 48–56.
- Iqbal, M., Pumford, N. R., Tang, Z. X., Lassiter, K., Wing, T., Cooper, M., Bottje, W., 2004. Low Feed Efficient Broilers Within a Single Genetic Line Exhibit Higher Oxidative Stress and Protein Expression in Breast Muscle with Lower Mitochondrial Complex Activity. **Poult. Sci.** 83, 474–484.
- Iqbal, M., Pumford, N. R., Tang, Z. X., Lassiter, K., OJano-Dirain, C., Wing, T., Cooper, M., Bottje, W., 2005. Compromised Liver Mitochondrial Function and Complex Activity in Low Feed Efficient Broilers Are Associated with Higher Oxidative Stress and Differential Protein Expression. **Poult. Sci.** 84, 933–941.
- Komsa-Penkova, R., Spirova, R., Bechev, B., 1996. Modifications of Lowry's method for collagen concentration measurement. **J. Biochem. Bioph. Meth.** 32, 33–43.
- Lohakare, J. D., Chae, B. J., Hahn, T. W., 2004. Effects of Feeding Methods (Water vs. Feed) of Vitamin C on Growth Performance and Carcass Characteristics in Broiler Chickens **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 17,1112-1117.
- Lohakare, J. D., Ryu, M. H., Hahn, T.W., Lee, J. K., Chae, B. J., 2005. Effects of Supplemental Ascorbic Acid on the Performance and Immunity of Commercial Broilers. **J. Appl.Poult. Res.** 14,10–19.
- Maggini, S., Wintergerst, E. S., Beveridge, S., Hornig, D. H., 2007. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **Brit. J. Nutr.** 98, 29-35.
- Naseem, S., Younus, M. Anwar, B., Ghafoor, A., Aslam, A., Akhter, S., 2005. Effect of ascorbic acid and acetylsalicylic acid supplementation on performance of broiler chicks exposed to heat stress. **Int. J. Poult. Sci.** 4,900–904.
- Ojano-Dirain, C. P., Iqbal M., Cawthon, D., Swonger, S., Wing, T., Cooper, M., Bottje W., 2004. Determination of Mitochondrial Function and Site-Specific Defects in Electron Transport in Duodenal Mitochondria in Broilers with Low and High Feed Efficiency. **Poult. Sci.** 83,1394–1403.
- Pardue, S. L., Thaxton, J. P., Brake, J., 1985. Influence of supplemental ascorbic acid on broiler performance following exposure to high environmental temperature. **Poult. Sci.** 64, 1334–1338.
- Piekarski, A. L., Kong, B.W., Lassiter, K., Hargis, B. M., Bottje, W. G., 2014. Cell bioenergetics in Leghorn male hepatoma cells and immortalized chicken liver cells in response to 4-hydroxy 2-nonenal-induced oxidative stress. **Poult. Sci.** 93 ,2870–2877.
- Ribeiro, A. M. L., Vogt, L. K. , Canal, C. W., Laganá, C., Streck, A. F., 2008. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **R. Bras. Zootec.** 37, 636-644.
- Rodrigues, L. E. A.; Santos, C. V. C.; Albuquerque, M. L.; Silva, A. M.; Martinelli, G.; Martinelli, R. 2007. Efeito in vivo do enalapril sobre a respiração mitocondrial do fígado e do rim do rato. **Laes & Haes** 28: 98-106.
- Sahin, K., Sahin, N., Yaralioglu, S., 2002. Effects of Vitamin C and Vitamin E on Lipid Peroxidation, Blood Serum Metabolites, and Mineral Concentrations of Laying Hens Reared at High Ambient Temperature. **Biol. Trace Elem. Res.** 85,35-45.
- Sahin, K. , Sahin, N., Küçük, O., 2003. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high environmental temperature (32°C). **Nutr. Res.** 23, 225-238.
- Souza, M. G., Oliveira, R. F. M., Donzele, J. L., Maia, A. P. A., Balbino, E. M., Oliveira, W. P., 2011. Utilização das Vitaminas C e E em Rações para Frangos de Corte Mantidos em Ambiente de Alta Temperatura. **R. Bras. Zootec.** 40, 2192-2198.
- Tinsley, N., Iqbal, M., Pumford, N. R., Lassiter, K., Ojano-Dirain, C., Wing, T. Bottje, W., 2010. Investigation of mitochondrial protein expression and oxidation in heart muscle in low and high feed efficient male broilers in a single genetic line. **Poult. Sci.** 89,349–352.

Viera, S. L., 2000. Nutrição Pós-Eclosão de Frangos de Corte. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.** 2, 189-199.

Zhang , W. H.,Gao, F., Zhu ,Q. F., Li , C., Jiang,Y., Dai, S. F. , Zhou, G. H., 2011. Dietary sodium butyrate alleviates the oxidative stress induced by corticosterone exposure and improves meat quality in broiler chickens. **Poul. Sci.** 90, 2592–2599.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ácido ascórbico administrado em doses inferiores àquelas observadas na literatura, e apenas no período pré-inicial de criação (1-10 dias), foi capaz de melhorar características de desempenho como conversão alimentar.

A fonte da vitamina utilizada no presente estudo consiste em uma forma protegida da molécula, conferiu maior estabilidade ao produto resultando em respostas biológicas promissoras a criação na fase estudada.

Quando observado o período total de criação não houve nenhuma diferença nas características de desempenho dos animais nem no rendimento de carcaça e cortes. Possivelmente isso ocorreu devido a utilização dessa vitamina somente na fase pré-inicial o que não foi suficiente para causar efeito residual.

Com relação ao metabolismo mitocondrial hepático foi observado maior consumo de oxigênio quando a respiração foi estimulada com succinato de sódio o que indica que a suplementação de ácido ascórbico seja benéfica ao metabolismo de mitocôndrias isoladas de fígado de frangos de corte.

Os resultados referentes ao metabolismo mitocondrial indicam que é necessária a realização de mais estudos a fim de observar o metabolismo mitocondrial nas diferentes fases de crescimento dos animais para assim definir a dose de ácido ascórbico necessária para uma resposta mitocondrial mais eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACETOZE, G.; KURZBARD, R.; KLASING, K. C.; RAMSEY, J. J.; ROSSOW, H. A. 2016. Liver mitochondrial oxygen consumption and proton leak kinetics in broilers supplemented with dietary copper or zinc following coccidiosis challenge. **Journal Animal of Physiology and Animal Nutrition** Version of Record online : 21 Aug 2016, DOI: 10.1111/jpn.12591
- ADIKWU, E.; DEO, O. 2013. Hepatoprotective Effect of Vitamin C (Ascorbic Acid) **Pharmacology & Pharmacy** 4: 84-92.
- ANIM - AMAKYE, J.; LIN, T. L.; HESTER, P. Y.; THIAGARAJAN, D.; WATKINS, B. A.; WU, C. C. 2000. Ascorbic Acid Supplementation Improved Antibody Response to Infectious Bursal Disease Vaccination in Chickens. **Poultry Science** 79:680-688.
- APBA, 2016. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2015. Disponível em < www.abpa.org.br > acesso em 17/06/2016.
- ARAÚJO, L.F.; JUNQUEIRA, O.M.; ARAÚJO, C.S.S.; ARTONI, S.M.B.; FARIA FILHO, D.E. 2002. Diferentes Critérios de Formulação de Rações para Frangos de Corte no Período de 1 a 21 Dias de Idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. 4:195-202.
- ARCOA, A.; SATRÚSTEGUIA, J. 2005. New mitochondrial carriers: an overview. **Cellular and Molecular Life Sciences** 62: 2204-2227.
- ATTIA, Y. A.; EL-HAMID, E. A.; ABEDALLA, A. A.; BERIKA, M. A.; AL-HARTHI, M. A.; KUCUK, O.; SAHIN, K.; ABOU-SHEHEMA, B. M. 2016. Laying performance, digestibility and plasma hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin C, and/or vitamin E supplementation. **Springer Plus** 5:1619.
- AZAD, M.A.K.; KIKUSATO, M.; SUDO, S.; AMO, T.; TOYOMIZU, M. 2010. Time course of ROS production in skeletal muscle mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 157: 266-271.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BESSAN, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição de Campinas** 23:629-643.
- BAR SHIRA, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. 2005. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 105: 33-45.
- BENARD, G.; BELLANCE, N.; JAMES, D.; PARRONE, P.; FERNANDEZ, H.; LETELLIER, T.; ROSSIGNOL, R. 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. **Journal of Cell Science** 120: 838-848.
- BERTECHINI, A. G. 2012. **Nutrição de monogástricos**. Editora UFLA, Lavras, Minas Gerais Brasil.
- BERZINA, N.; MARKOV, J.; DIZHBI, T.; APSITE, M.; VASILYEVA, S.; BASOVA, N.; SMIRNOVA, G.; ISAJEV, S. 2013. Oxidative stress and innate immunity status in chickens exposed to high dose of ascorbic acid. **Cell biochemistry and function**. 31: 551-559.
- BOTTJE, W.; TANG, Z. X.; IQBAL, M.; CAWTHON, D.; OKIMOTO, R.; WING, T.; COOPER, M. 2002. Association of Mitochondrial Function with Feed Efficiency within a Single Genetic Line of Male Broilers. **Poultry Science** 81:546-555.
- BOTTJE, W.; PUMFORD, N. R.; OJANO-DIRAIN, C.; IQBAL, M.; LASSITER, K. 2006. Feed Efficiency and Mitochondrial Function. **Poultry Science** 85:8-14.
- BOTTJE, W.; KONG, B.W. 2013. Feed efficiency: Mitochondrial function to global gene expression. **Journal Animal Science** 91:1582-1593.
- BRAND, H.V. D.; MOLENAAR, R.; STAR, I. V. D.; MEIJERHOF, R., 2010. Early feeding affects resistance against cold exposure in young broiler chickens. **Poultry Science** 89:716-720.

- CABEZAS, R.; EL-BACHA, R. S.; GONZALEZ, J.; BARRETO, G. E. 2012. Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. **Neuroscience Research** 74: 80-90.
- CAWTHON, D.; McNEW, R.; BEERS, K. W. ; BOTTJE, W. G. 1999. EVIDENCE OF MITOCHONDRIAL Dysfunction in Broilers With Pulmonary Hypertension Syndrome (Ascites): Effect of T-Butyl Hydroperoxide on Hepatic Mitochondrial Function, Glutathione, And Related Thiols. **Poultry Science** 78:114-124.
- CHAMBIAL, S.; DWIVEDI, S.; SHUKLA, K. K.; JOHN, P. J.; SHARMA, P. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. 2013. **Indian Journal Of Clinical Biochemistry** 28: 314-328.
- CHAND N.; NAZ S.; KHAN A.; KHAN S.; KHAN R. U. 2014. Performance traits and imune response of broiler chicks treated with zinc and ascorbic acid supplementation during cyclic heat stress. **International Journal of Biometeorology** 58:2153-2157.
- CHINNERY, P. F.; SCHON, E. A. 2003. Mitochondria. **Journal of Neurology Neurosurgery, and Psychiatry** 74:1188-1199.
- CREEL, L.H.; MAURICE, D.V.; LIGHTSEY, S.F.; GRIMES, L.W. 2001. Stability of dietary ascorbic acid and the effect of supplementation on reproductive performance of broiler breeder chickens. **British Poultry Science** 42: 96–101.
- DAVIS, M. B.; AUSTIN, J.; PARTRIDGE, D. 1991. **Vitamin C: its chemistry and biochemistry**. Royal Society of Chemistry Paperbacks, Cambridge.
- DAVIS, R. E.; WILLIAMS, M. 2012. Mitochondrial Function and Dysfunction: An Update. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 342: 598-607.
- EGBUNIWE, I.C.; AYO, J. O.; KAWU, M. U.; MOHAMMED A. 2016. Effects of betaine and ascorbic acid on tonic immobility, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in broiler chickens during the hot-dry season. **Journal Of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research** 12:60-65.
- EL-GENDY, K. S.; ALY, N. M.; MAHMOUD, F. H.; KENAWY, A.; EL-SEBAE, A. K. H. 2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. **Food And Chemical Toxicology** 48: 215-221.
- FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G. N.; E. RADL. 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the Neurological Sciences** 322: 254-262.
- FÉLIX, A. P.; AIORKA, A. M.; SORBARA, J. O. B. 2009. Níveis vitamínicos para frangos de corte. **Ciência Rural Santa Maria** 39: 619-626.
- FELLENBERG, M. A.; SPEISKY, H. 2006. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. **World's Poultry Science Journal** 62:53-70.
- FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. 2003. A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. **Química Nova na Escola** 17: 3-7.
- FUJIMOTO, R. Y. ; CARNEIRO, D. J. 2001. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). **Acta Scientiarum** 23:855-861.
- FURUKAWA, K. ; KIKUSATO, M.; KAMIZONO, T.; TOYOMIZU, M. 2016. Time-course changes in muscle protein degradation in heat-stressed chickens: Possible involvement of corticosterone and mitochondrial reactive oxygen species generation in induction of the ubiquitin–proteasome system. **General and Comparative Endocrinology** 228: 105-110.
- GETOFF, N. 2013a. Vitamin-induced intracellular electrons are the mechanism for their well-known beneficial effects: A review. **Nutrition** 29: 597-604.
- GETOFF, N., 2013b. Vitamin C: Electron Emission, Free Radicals and Biological Versatility. **In vivo** 27: 565-570.

- GUILHERME, R. F.; CAVALHEIRO, J. M. O. ; BRASILEIRO, O. L.; PRADO, J. P. S.; CAVALHEIRO, T. B. 2009. Composição e Cinética de Degradação do Ácido Ascórbico em Rações para Aquicultura **Ciência e Agrotecnologia** 33: 1153-1158.
- HACISEVKI, A. 2009. AN OVERVIEW OF ASCORBIC ACID BIOCHEMISTRY **Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi** 38:233-255.
- HILL B. G.; HIGDON A. N.; DRANKA B. P.; DARLEY-USMAR V. M. 2010. Regulation of vascular smooth muscle cell bioenergetic function by protein glutathiolation. **Biochimica et Biophysica Acta** 2: 285-295.
- HONG, Y.; ARDIYANTI, A.; KIKUSATO, M.; SHIMAZU, T.; TOYOMIZU, M.; SUZUKI, K. 2015. Selection for high and low oxygen consumption altered hepatic mitochondrial energy efficiency in mice. **Animal Science Journal** 86: 818-825.
- HOOPER, C. L.; MAURICE, D. V.; LIGHTSEY, S. F.; TOLER, J. E. 2000. Factors affecting ascorbic acid biosynthesis in chickens. I. Adaptation of an assay and the effect of age, sex and food deprivation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 84: 48-56.
- HUSSEINY, O.M.; WAFI, S. A.; KOMY, H.M.A. 2008. Influence of Fasting or Early Feeding on Broiler Performance **International Journal of Poultry Science** 7: 263-271.
- HUTTEMANN, M.; PECINA, P.; RAINBOLT, M.; SANDERSON, T.H.; KAGAN, V.E., SAMAVATI, L.; DOAN, J.W.; LEE, I. 2011. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. **Mitochondrion** 11:369-381.
- IQBAL, M., CAWTHON, D., WIDEMAN, R. F., BOTTJE, W. G. 2001. Lung Mitochondrial Dysfunction in Pulmonary Hypertension Syndrome. II. Oxidative Stress and Inability to Improve Function with Repeated Additions of Adenosine Diphosphate. **Poultry Science** 80:656-665.
- IQBAL, M.; PUMFORD, N. R.; TANG, Z. X.; LASSITER, K.; WING, T.; COOPER, M.; BOTTJE, W. 2004. Low Feed Efficient Broilers Within a Single Genetic Line Exhibit Higher Oxidative Stress and Protein Expression in Breast Muscle with Lower Mitochondrial Complex Activity. **Poultry Science** 83: 474-484.
- IQBAL, M.; PUMFORD, N. R.; TANG, Z. X.; LASSITER, K.; OJANO-DIRAIN, C., WING, T.; COOPER, M.; BOTTJE, W. 2005. Compromised Liver Mitochondrial Function and Complex Activity in Low Feed Efficient Broilers Are Associated with Higher Oxidative Stress and Differential Protein Expression. **Poultry Science** 84: 933-941.
- JEONG, Y.-J. HONG, S. -W.; KIM, J. -H.; JIN, D. -H.; KANG, J. S.; LEE, W. J.; HWANG, Y.-L. 2011. Vitamin C-treated murine bone marrow-derived dendritic cells preferentially drive naïve T cells into Th1 cells by increased IL-12 secretions. **Cellular Immunology** 266: 192-199.
- KHAN, R.U.; NAZ, S.; NIKOUSEFAT, Z.; TUFARELLI, V.; JAVADANI, M.; RANA, N.; LAUDADIO, V. 2012a. Effect of vitamin E in heat-stressed poultry. **World's Poultry Science Journal** -67: 469-478.
- KHAN, R.U.; NAZ, S.; NIKOUSEFAT, Z.; SELVAGGI, M., LAUDADIO, V.; TUFARELLI, V. 2012b. Effect of ascorbic acid in heat-stressed poultry. **World' Poult. Sci. J.** 68: 477-490.
- LIANG, F.; JIANG, S.; MO, Y.; ZHOU, G.; YANG, L. 2015. Consumption of Oxidized Soybean Oil Increased Intestinal Oxidative Stress and Affected Intestinal Immune Variables in Yellow-feathered Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 28: 1194-1201.
- LOHAKARE, J. D.; KIM, J. K.; RYU, M. H.; HAHN, T.-W.; CHAE, B. J. 2005a. Effects of Vitamin C and Vitamin D Interaction on the Performance, Immunity, and Bone Characteristics of Commercial Broilers. **The Journal of Applied Poultry Research** 14:670-678.
- LOHAKARE, J. D.; RYU, M. H.; HAHN, T.W.; LEE, J. K.; CHAE, B. J. 2005b. Effects of Supplemental Ascorbic Acid on the Performance and Immunity of Commercial Broilers. **The Journal of Applied Poultry Research** 14:10-19.
- LYKKESFELDT, J.; MICHELS A. J. 2014. Vitamin C. **American Society for Nutrition. Advances in Nutrition** 5: 16-18.

- MALEBANE, I. M.; NG'AMBI, J. W.; NORRIS, D.; MBAJIORGU, C. 2010. Effect of dietary ascorbic acid supplementation level on productivity, mortality, and carcass characteristics of Venda chickens. **Tropical Animal Health and Production** 42: 1711-1718.
- MCDOWELL L. R. 2000. Vitamin C. p 597– 640. In: **Vitamins in animal and human nutrition** Second edition. Iowa State University.
- MURPHY, T. W.; MCDONALD, J. M.; NIELSEN, M. K. 2015. Hepatic mitochondrial efficiency in lines of mice differing in feed intake. **Journal Animal Science** 91:2077-2082.
- NASEEM, S.; YOUNUS, M. ANWAR, B.; GHAFOR, A.; ASLAM, A.; AKHTER, S. 2005. Effect of ascorbic acid and acetylsalicylic acid supplementation on performance of broiler chicks exposed to heat stress. **International Journal of Poultry Science**. 4:900-904.
- PIEKARSKI, A. L.; KONG, B.-W.; LASSITER, K.; HARGIS, B. M.; BOTTJE, W. G. 2014. Cell bioenergetics in Leghorn male hepatoma cells and immortalized chicken liver cells in response to 4-hydroxy 2-nonenal-induced oxidative stress. **Poultry Science** 93:2870-2877.
- QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI M.; SÁ, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science** 89: 1905-1914.
- RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L. K. ; CANAL, C. W.; LAGANÁ, C.; STRECK, A. F. 2008. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37: 636-644.
- SAHIN, K.; SAHIN, N.; YARALIOGLU, S. 2002. Effects of Vitamin C and Vitamin E on Lipid Peroxidation, Blood Serum Metabolites, and Mineral Concentrations of Laying Hens Reared at High Ambient Temperature. **Biological Trace Element Research** 85:35-45.
- SAHIN, K. ; SAHIN, N.; KÜÇÜK, O. 2003. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high environmental temperature (32°C). **Nutrition Research** 23: 225-238.
- SAKOMURA, N.K.; HAUSCHILD, L.; BONATO, M.A.2014. **Nutrição de não ruminantes**, Editora FUNEP Jaboticabal, São Paulo.
- SALVADOR, D.; FARIA, D. E. ; MAZALLI, M. R.; ITO, D. T.; FARIA FILHO, D. E.; ARAÚJO, L. F. 2009. Vitaminas D e C para poedeiras na fase inicial de produção de ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 38: 887-892.
- SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R. 2004. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista de Nutrição de Campinas**. 23:629-643.
- SIES, H.; STAHL, I. W.; SEVANI, A., 2005. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. **The Journal of Nutrition** 135:969-972.
- SIHVO, H.-K., IMMONEN, K., PUOLANNE, E. 2013. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. **Veterinary Pathology** 51, 619-23.
- SU, R.; WANG, R.; GUO, S.; CAO, H.; PAN, J.; LI, C.; SHI, D.; TANG, Z. 2011. In Vitro Effect of Copper Chloride Exposure on Reactive Oxygen Species Generation and Respiratory Chain Complex Activities of Mitochondria Isolated from Broiler Liver. **Biology Trace Element Research** 144,668–677.
- TAO, M.; YOU, C.P.; ZHAO, R.R.; LIU, S.J.; ZHANG, Z.H.; ZHANG, C.; LIU, Y. 2014. Animal Mitochondria: Evolution, Function, and Disease. **Current Molecular Medicine** 14: 115-124.
- TINSLEY, N.; IQBAL, M.; PUMFORD, N. R.; LASSITER, K.; OJANO-DIRAIN, C.; WING, T. BOTTJE, W. 2010. Investigation of mitochondrial protein expression and oxidation in heart muscle in low and high feed efficient male broilers in a single genetic line. **Poultry Science** 89:349-352.

- TOPLU, H. D. O.; NAZLIGÜL, A.; KARAARSLAN, S.; KAYA, M.; YAGIN, O. 2014. Effects of heat conditioning and dietary ascorbic acid supplementation on growth performance, carcass and meat quality characteristics in heat-stressed broilers. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 61: 295-302.
- TULEUN, C.D.; NJOKU, P.C.; OKWORI, A.I. 2010. Effect of Dietary Ascorbic Acid on Performance of Broiler Chickens Exposed to Different Lighting Regime. **International Journal of Poultry Science** 9: 118-125.
- TURRENS, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology** 552:335-344.
- VIERA, S. L. 2000. Nutrição Pós-Eclosão de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** 2:189-199.
- YANG, L.; TAN, G.; FU, Y.FENG, J.; ZHANG. 2010. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 151: 204-208.

APÊNDICE

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

RESULTADOS DO PERÍODO TOTAL DE CRIAÇÃO (1- 40 dias)

Tabela Características de desempenho nos diferentes níveis de ácido ascórbico avaliados. Consumo de ração (CR); Ganho de peso (GP) e Conversão alimentar (CA) e viabilidade (VB%) no período final de criação

Características	Nível de ácido ascórbico (mg/kg)				EPM ¹	Regressão (p-valor)	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
	Fase pré-inicial (1-39 dias)						
CR (g/ave)	3965	4014	3964	3958	0,0182	0,644	0,639
GP (g/ave)	2483	2522	2498	2506	0,0146	0,774	0,674
CA	1,597	1,592	1,587	1,580	0,0046	0,185	0,902
VB%	97,60	96,65	96,15	96,63	0,4916	0,055	0,412

(1) Erro padrão da média

Tabela Rendimento de carcaça (RC), rendimento de peito (RP), rendimento de coxa+sobrecoxa (RCS) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte submetidos à rações com níveis crescentes de vitamina C protegida (39 dias de idade)

Características	Nível de ácido ascórbico (mg/kg)				EPM ¹	Regressão (p-valor)	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
	Fase pré-inicial (1-10 dias)						
RC (%)	78,79	77,91	78,88	79,31	0,2611	0,236	0,407
RP (%)	36,87	34,79	36,16	34,34	0,3872	0,052	0,879
RCSC (%)	28,24	28,43	28,27	27,11	0,3173	0,168	0,411
GA (%)	1,57	1,56	1,65	1,73	0,0612	0,311	0,929

(1) Erro padrão da média