

## PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E TEMPERATURA CLOACAL DE FRANGOS DE CORTE SOB ESTRESSE CÍCLICO DE CALOR SUPLEMENTADOS COM ZINCO E SELÊNIO

NASCIMENTO M.R.B.M.<sup>1\*</sup>, BORGES G.C.S.<sup>2</sup>, SOUTO M.M.<sup>3</sup>, PENHA-SILVA N.<sup>4</sup>, FERNANDES E.A.<sup>1</sup>

**RESUMO.** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse térmico cíclico e da suplementação de zinco e selênio na dieta de frangos de corte machos sobre a temperatura cloacal (TC) e os níveis sanguíneos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Pintos de corte com 1 dia de idade (N = 2.400) foram alojados em 80 boxes (30 aves por box) e criados à temperatura ambiente natural até o 14<sup>o</sup> dia de vida, quando metade deles passou a ser submetida a estresse cíclico por calor (das 7 às 19 h). As TBARS foi analisada aos 21 e 42 dias de idade e TC foi aferida semanalmente, em 2 aves por box, segundo um delineamento inteiramente casualizado em fatorial 2x5 [2 ambientes e 5 níveis de suplementação: S1) ração controle (premix mineral comercial); S2) 40 ppm de Zn inorgânico; S3) 40 ppm de Zn orgânico; S4) 40 ppm de Zn inorgânico e 0,2 ppm de Se orgânico; e S5) 40 ppm de Zn orgânico e 0,2 ppm de Se orgânico]. Os dados foram submetidos a análise de variância e comparados pelo teste Tukey (5%). Não houve efeito do ambiente, da suplementação nutricional e da idade da ave nem da interação desses fatores sobre os níveis de TBARS. No 35<sup>o</sup> e 42<sup>o</sup> dia de idade as aves sob estresse cíclico pelo calor apresentaram elevação de seus valores de TC. Assim, os frangos de corte sob estresse cíclico por calor e suplementados com zinco e selênio não sofreram redução dos níveis de peroxidação lipídica, mas apresentaram aumento na TC.

**Palavras-chave:** ave, minerais, estabilidade oxidativa, ambiente, temperatura corporal.

**ABSTRACT.** **Lipid peroxidation and cloacal temperature in broiler chickens submitted to heat stress under zinc and selenium supplementation.** The objective of this study was to evaluate the effects of the cyclic thermal stress and supplementation of zinc and selenium on the diet of male broiler chickens on the cloacal temperature (CT) and the blood levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). 1 day old chicks (N = 2.400) were allocated in 80 boxes (30 chicks per box) and raised at the natural environmental temperature until the 14<sup>th</sup> day, when half of them was submitted to cyclic heat stress (from 7 am to 7 pm). CT was weekly checked in 2 broilers per box, according to a randomized design with a 2x5 factorial [2 environments: control (C) and heat stress (EC), and 5 levels of supplementation: S1) control ration (premix commercial mineral); S2) 40 ppm of inorganic Zn; S3) 40 ppm of organic Zn; S4) 40 ppm of inorganic Zn e 0.2 ppm of organic Se; and S5) 40 ppm of organic Zn and 0.2 ppm of organic Se]. For the variable TBARS determination (1 broiler per box) in 2 periods of blood collect (21 e 42 days). Data were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey test (5%). The blood concentrations of TBARS were not affected by changes in the ambient temperature, diet supplementation and broiler age or by the interaction among these factors. At the 35<sup>th</sup> and 42<sup>nd</sup> day, broilers submitted to the cyclic heat stress presented elevation in the cloacal temperature. Thus, the broiler chickens submitted to cyclic heat stress and supplemented with zinc and selenium had no reduction in the lipid peroxidation, but they presented increase in the cloacal temperature.

<sup>1</sup> Professores Doutores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia;

<sup>2</sup> Mestre em Ciências Veterinárias pela FAMEV-UFU;

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Graduação em Medicina Veterinária FAMEV-UFU;

<sup>4</sup> Professor Doutor do Instituto de Genética e Bioquímica UFU.

**KEY WORDS:** Poultry, minerals, oxidative stability, environmental, body temperature.

## INTRODUÇÃO

A susceptibilidade das aves a elevadas condições térmicas aumenta à medida que o binômio umidade e temperatura ambiente ultrapassam a zona de conforto, o que incrementa conseqüentemente a temperatura corporal da ave, com efeito negativo sobre o desempenho (Borges *et al.* 2003). Frangos de corte sob calor excessivo apresentam alteração da respiração e da temperatura cloacal. (Dionello *et al.* 2002).

Outra resposta de frangos de corte sob estresse pelo calor é o aumento na concentração sanguínea de malondialdeído (MDA), conforme verificado por Sahin *et al.* (2005) em codornas criadas sob temperatura ambiente cíclica elevada. O MDA é um subproduto da peroxidação lipídica, a qual se inicia quando há uma produção no organismo de metabólitos reativos do oxigênio (ROM), também conhecidos como radicais livres, embora nem todos os ROM sejam efetivamente radicais livres. Essas reações são deletérias ao organismo animal e são desencadeadas em condições de estresse oxidativo, entretanto podem ser controladas por sistemas antioxidantes.

Aves submetidas à temperatura ambiente cíclica elevada (25 a 35 °C) apresentam menores taxas de retenção de fósforo (Pi), potássio (K<sup>+</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>), manganês (Mg<sup>+2</sup>), cobre (Cu<sup>+2</sup>) e zinco (Zn<sup>+</sup>), comparadas com aquelas criadas a 24°C (BELAY, TEETER, 1996). Assim, a suplementação deste último mineral tem sido usada com o objetivo de amenizar os efeitos do estresse pelo calor. Sabe-se que a deficiência de zinco provoca lesões oxidativas relacionadas à ação dos ROM em animais e humanos, pois o zinco é um componente estrutural e catalítico da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). Esta enzima catalisa a conversão de dois radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.

Além do zinco, o selênio (Se<sup>+2</sup>) é outro micronutriente essencial para o organismo. A Se-glutation peroxidase (GPx<sup>ase</sup>), cuja biossíntese é induzida por selênio, é a enzima mais conhecida no que se refere à estrutura e função (DANIELS, 1996). Ela funciona como um antioxidante primário e é um importante componente na proteção contra os ROMs, pois catalisa a redução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e hidroperóxidos lipídicos (GANTHER, 1979), impedindo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forme o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), que é um ROM altamente lesivo para as estruturas biológicas. A defesa antioxidante contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> somente será completa sob a ação da catalase e/ou da Se-GPx<sup>ase</sup> (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A utilização de zinco e selênio minimiza os efeitos do estresse metabólico causado pelo excesso de calor, o que melhora o bem estar e o crescimento dos frangos de corte. Este trabalho teve por objetivo avaliar a peroxidação lipídica e a temperatura cloacal em frangos de corte submetidos a estresse pelo calor e suplementados com zinco e selênio nas formas orgânica e inorgânica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido na Granja de Experimentação de Aves, da Fazenda do Glória, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, MG. Foram utilizados 2.400 pintos de corte machos, da linhagem "Avian 48" com um dia de idade, alojados em galpão composto de 80 boxes (30 aves por Box) numa densidade de 12,5 aves por m<sup>2</sup>, de junho a julho de 2007. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (sendo dois ambientes e cinco níveis de suplementação com zinco orgânico e inorgânico e selênio orgânico) com oito repetições, sendo cada box equivalente a uma unidade experimental.

O galpão é construído em alvenaria e estrutura metálica, com cobertura em telha de fibrocimento, piso concretado, paredes teladas, cumeeira com orientação leste-oeste, pé direito de 2,60m, sem lanternim. Suas partes laterais constituem de uma tela de arame, que se estende até o início do telhado, protegida por uma cortina de plástico trançado azul e um sistema com catracas para sua movimentação. O ambiente do interior do galpão é controlado por forração do teto com tecido plástico, nebulizadores de teto, ventiladores e, para cada quatro boxes, uma campânula a gás (Big Clímax<sup>®</sup>). A temperatura ambiente e a umidade do ar foram continuamente monitoradas com um termômetro de máxima e mínima (0 a 50 °C) (Incoterm<sup>®</sup>) e um psicrômetro (Incoterm<sup>®</sup>), respectivamente, colocados em 5 pontos do galpão. Os animais foram divididos em dois grupos: um criado sob condições naturais (C) e o outro sob temperatura ambiente cíclica elevada por doze horas (EC).

O galpão foi dividido ao meio com cortinas plásticas para equalização de dois ambientes: 1) ambiente controle – com temperatura natural, controlada por ventiladores e nebulizadores, para garantir o conforto térmico das aves, 2) ambiente estressado por calor – de um a 14 dias em temperatura natural e depois em ambiente aquecido por meio de campânulas a gás durante 12 horas (de 7 as 19 h) de forma cíclica, sendo 1h30m de calor e 1h30min sem aquecimento. A temperatura neste ambiente aquecido foi de 38°C do 14º ao 28º dia, e de 40°C do 29º ao dia 42º dia. As rações à base de sorgo e farelo de soja foram formuladas utilizando níveis nutricionais previstos nos tratamentos, elaborados e formulados com base em Rostagno (2005) e NRC (1994).

A matéria-prima foi submetida a análise bromatológica para verificar a composição dos ingredientes, de acordo com o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES, 2005).

O programa alimentar consistiu de três fases: ração pré-inicial (300 g/ave), ração inicial (900 g/ave), ração crescimento (2.500 g/ave). As aves receberam ração e água potável *ad libitum* em um programa de 24 horas de luz por dia. Os animais de ambos os grupos foram divididos em 5 subgrupos, de acordo com o tipo de dieta: S1) ração controle (premix mineral comercial); S2) ração controle com adição de 40 ppm de Zn inorgânico; S3) ração controle com adição de 40 ppm de Zn orgânico; S4) ração controle com adição de 40ppm de Zn inorgânico e 0,2 ppm de Se orgânico; S5) ração controle com adição de 40 ppm de Zn orgânico e 0,2 ppm de selênio orgânico.

A manifestação do estresse oxidativo sobre os lipídios celulares recebe o nome particular de peroxidação lipídica. Esta foi avaliada em duas épocas de coleta de sangue (21 e 42 dias), pela dosagem dos produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malondialdeído (MDA), subproduto da lipoperoxidação que reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico e produz um complexo de coloração avermelhada (RUMLEY; PATERSON, 1998). As amostras de sangue foram coletadas em uma ave por box por punção da veia braquial utilizando tubos a vácuo (Vacuntainer<sup>®</sup>) contendo EDTA como anticoagulante. As amostras de sangue foram submetidas a dois ciclos de congelamento (15 min) e descongelamento (5 min), com a finalidade de romper as membranas celulares e promover liberação das enzimas antioxidantes. O descongelamento foi feito em banho-maria a 37 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1300xg durante 2 min, para separação do plasma. Foram pipetados 500µL do plasma e adicionados a 1000µL de ácido tricloroacético a 10%. Após homogeneização e outra centrifugação a 1300xg por 15 min a 15°C, foram pipetados 500µL do sobrenadante. Após adição de 500µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1% (dissolvido em hidróxido de sódio a 0,05M) a aquele volume de sobrenadante, os tubos foram incubados em água fervente (100 °C) durante 10 min e, em seguida, foram

resfriados sob água corrente por 5 min. A concentração molar de TBARS foi determinada a partir dos valores de absorvância (A) dessas soluções em 532nm.

A concentração molar de TBARS (c) foi obtida a partir de uma equação derivada da expressão matemática da lei de Lambert-Beer (A=e.c.l):

$$c = \frac{A}{e.l} \quad \text{Equação 01}$$

onde  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) dos TBARS em 532nm e l é o caminho óptico (1 cm) percorrido na solução. Essa análise foi executada no Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

A temperatura cloacal foi medida com termômetro clínico veterinário (Incoterm<sup>®</sup>) com precisão de 0,1 °C, em duas aves por Box, às 17 h, com inserção do termômetro por 3 cm na cloaca da ave aos 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup> e 42<sup>o</sup> dias de idade.

Os dados foram avaliados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de TBARS nos diferentes grupos de animais encontram-se na tabela 1. Não houve efeito do ambiente, dos suplementos nutricionais, da idade e nem da interação entre esses fatores sobre a concentração plasmática de TBARS (Tabela 2) nas aves consideradas. Esses resultados contrariam aqueles reportados por Lin *et al.* (2006), que verificaram a indução de estresse oxidativo em frangos de corte criados sob estresse pelo calor durante 3 horas por dia a partir de cinco semanas de idade, à temperatura de 32 °C.

É possível que a quantidade de zinco e selênio utilizados no premix da dieta, tenha sido suficiente para proteger os animais de danos oxidativos não sendo necessária sua suplementação. Outra possibilidade seria que a utilização dos minerais na dieta dos frangos tenha afetado a reatividade do TBA. Segundo Silva (1999), proteínas, amins e outros compostos podem complexar o TBA e impedi-lo de reagir com o MDA e outros produtos de oxidação também reativos com o TBA.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão das concentrações sanguíneas (nM) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em frangos de corte sob estresse cíclico de calor e suplementação nutricional com zinco e selênio, de junho a julho de 2007, em Uberlândia, MG, Brasil

Suplementos*	Ambientes	Tempo (dias)**	
		21	42
S1	C	56,6 ± 48,6	35,1 ± 432,2
	EC	119,4 ± 217,2	79,3 ± 42,7
S2	C	58,5 ± 121,6	161,9 ± 264,7
	EC	106,6 ± 42,8	85,7 ± 49,1
S3	C	81,9 ± 104,4	165,8 ± 329,0
	EC	80,9 ± 57,8	63,4 ± 59,9
S4	C	48,8 ± 58,0	66,3 ± 110,2
	EC	88,9 ± 60,9	128,2 ± 204,3
S5	C	48,8 ± 82,7	91,7 ± 92,6
	EC	74,5 ± 46,3	163,5 ± 196,7

\* Suplementos nutricionais: S1) Ração controle (premix mineral comercial); S2) Ração controle + 40 ppm de Zn inorgânico; S3) Ração controle com adição de 40ppm de Zn orgânico; S4) ração controle com adição de 40 ppm de Zn inorgânico e 0,2 ppm de selênio orgânico e S5) ração controle com adição de 40 ppm de Zn orgânico e 0,2 ppm de selênio orgânico

\*\* Comparação pelo teste de Tukey entre o diferente tempo (21 e 42 dias), ambiente: controle (C) e estresse pelo calor (EC), e (S), sem letras indicando ausência de diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ )

Os valores médios aferidos para temperaturas cloacais (TC) nos frangos de corte encontram-se na tabela 2. Não houve efeito da interação ambiente x suplementação sobre TC. Mas no 35° e 42° dia de idade, as aves criadas sob estresse cíclico de calor apresentaram maiores médias de temperatura corporal em relação àquelas sob condições de ambiente natural.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da temperatura cloacal, em °C, de frangos de corte sob estresse cíclico de calor [controle (C) e estresse pelo calor (EC)] de 14 a 42 dias de idade, suplementados com zinco e selênio, de Junho a Julho de 2007, em Uberlândia, MG, Brasil.

Ambiente	Idade (dias) **				
	14	21	28	35	42
C	41,2±0,5	41,5±0,2	41,5±0,3	41,0±0,2A	41,8±0,3A
EC	41,8±0,6	41,4±0,3	42,0±0,5	42,4±0,6B	43,0±0,8B
Suplementos*					
S1	41,6±0,5	41,6±0,3	41,7±0,4	41,9±0,6	42,5±0,9
S2	41,4±0,6	41,6±0,3	41,6±0,4	41,9±0,6	42,4±0,8
S3	41,4±0,7	41,6±0,3	41,7±0,5	42,0±0,7	42,5±0,9
S4	41,6±0,5	41,6±0,3	41,6±0,4	41,9±0,5	42,2±0,8
S5	41,5±0,7	41,6±0,4	41,9±0,7	42,1±0,9	42,5±1,0

\*Suplementos nutricionais (S): S1) Ração controle (Premix mineral comercial); S2) Ração controle + 40 ppm de Zn inorgânico; S3) Ração controle com adição de 40ppm de Zn orgânico; S4) ração controle com adição de 40 ppm de Zn inorgânico e 0,2 ppm de selênio orgânico e S5) ração controle com adição de 40 ppm de Zn orgânico e 0,2 ppm de selênio orgânico

\*\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma idade entre os valores do grupo controle em relação ao grupo submetido a estresse térmico (teste de Tukey)

Este resultado pode ser explicado pela dificuldade da ave em dissipar calor durante exposição à temperatura ambiente elevada. Segundo Furlan (2006), o resfriamento evaporativo respiratório constitui-se em um dos mais importantes meios de perda de calor das aves em temperaturas elevadas. Este autor afirma que isto ocorre porque as aves têm a capacidade de aumentar a frequência respiratória em até 10 vezes e, desta forma, aumentar a perda de calor no trato respiratório. No entanto, o aumento na frequência respiratória gera mais energia pela contração da musculatura, produzindo mais calor, podendo determinar os quadros de hipertermia severo para frangos de corte.

Faria *et al.* (2001) também obtiveram resultados semelhantes em que poedeiras expostas a estresse cíclico pelo calor ou constante apresentam maiores médias de temperatura corporal do que àquelas mantidas em termoneutralidade. Altan *et al.* (2000) também verificaram elevação da temperatura cloacal em aves mantidas em estresse pelo calor. Segundo Menten *et al.* (2006) em condições de temperatura e umidade elevadas podem desencadear um aumento de 4,7 °C na temperatura cloacal das aves.

## CONCLUSÃO

A criação de frangos de corte sob estresse cíclico pelo calor em condições naturais após o 14° dia de idade eleva a temperatura cloacal das aves no 35° e 42° dia de idade, mas não afeta os níveis sanguíneos de TBARS. A suplementação da dieta das aves com zinco e selênio também não afeta seus níveis sanguíneos de TBARS.

Novos estudos nesta área são necessários especialmente investigações nos períodos mais quentes do ano, tais como outubro, novembro e dezembro.

## REFERÊNCIAS

- ALTAN Ö. et al. Effects of heat stress on growth, some blood variables and lipid oxidation in broilers exposed to high temperature at an early age. *Brit. Poultry Sci.* London, v.41, p. 489-493, 2000.
- BELAY, T.; TEETER, R. G. Effects of environmental temperature on broiler mineral balance partitioned into urinary and fecal loss. *Brit. Poultry Sci.* London, v.37 n.2, p. 423-433, 1996.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev. de Nutr.*, Campinas, v.12, n. 2, p.123-130, 1999.
- BORGES, S. A. et al. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Cien. Rur*, Santa Maria, v.33, n.5, p. 975-981, 2003.
- DANIELS, L. A. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol. Tr. Elem. Res.*, Tokyo, v.54, p.185-199, 1996.
- DIONELLO, N. J. L et al. Respostas fisiológicas associadas à termotolerância em pintos de corte de duas linhagens por exposição a altas temperaturas. *Rev. Bras. de Zoot.*, Viçosa, v. 31, n. 1, p.79-85, 2002.
- FARIA, D. E. et al. Performance, body temperature and egg quality of laying hens fed vitamins D and C under three environmental temperatures. *Rev. Bras. Cienc, Avic.*, v.3, n.1, 2001.
- FURLAN, R. L. Influência da temperatura na produção de frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006. *Anais...* Chapecó: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/CNPISA), 2006.
- GANTHER, H. E. Metabolism of hydrogen selenide and methylated selenides. In: DRAPER, H.H. (eds.) *Adv. nutr. Res.* New York: Plenum Press, 1979. v.2, cap.03, p107-128.
- LIN, H. et al. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp. Bioch. and Phys., Part A.* Calgary v.144, p.1-17, 2006.
- MENTEN, J. F. M. et al. Physiological responses of Broiler chicken to pre slaughter heat stress. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE EPC 2006, Book abstrats, suppl., v.62, p.254, 2006. *World's Poultry Science Journal*.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL *Nutrient requirements of Poultry*. 5th. Ed., National Academy Press: Washington D.C.,1994. 381p.
- ROSTAGNO, S.H. *Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais de Aves e Suínos*. 3. ed. Viçosa: UFV – Imp. Universitária, 2005. 61p.
- SAHIN, K. et al. Supplementation of Zinc from Organic or Inorganic Source Improves Performance and Antioxidant Status of Heat-Distressed Quail. *Poult. Sci.*, Champaign, v. 84, n.6, p. 882-887, 2005.
- SILVA, F. A. M. et al. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quím. Nov.*, Lisboa, v. 22, n.1, 1999.
- SINDIRAÇÕES, Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Guia de Métodos Analíticos. In: \_\_\_\_\_. *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal*. São José do Rio Preto: São José, 2005. p.01-204.