



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MARCELLE CRAVEIRO ABREU DE MELO

VITAMINA D ASSOCIADA A ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

FORTALEZA

2023

MARCELLE CRAVEIRO ABREU DE MELO

VITAMINA D ASSOCIADA A ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Zootecnia – Linha de pesquisa: Produção de não ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Ednardo Rodrigues Freitas

Co-orientador: Dr. Rafael Carlos Nepomuceno

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M486v Melo, Marcelle Craveiro Abreu de.
Vitamina D associada a antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte / Marcelle Craveiro Abreu de Melo. – 2023.
99 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Ednardo Rodrigues Freitas.
Coorientação: Prof. Dr. Rafael Carlos Nepomuceno.

1. 25-hidroxicoilecalciferol. 2. aditivos alimentares. 3. miopatias peitorais. 4. oxidação. 5. qualidade óssea.
I. Título.

CDD 630

MARCELLE CRAVEIRO ABREU DE MELO

VITAMINA D ASSOCIADA A ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.
Área de concentração: Zootecnia – Linha de pesquisa: Produção de não ruminantes.

Apresentada em: 31/08/23.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ednardo Rodrigues Freitas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Germano Augusto Jerônimo do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Irani Ribeiro Vieira Lopes
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Profª. Dra. Leilane Rocha Barros Dourado
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Profª. Dra. Simara Márcia Marcato
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nunca me abandonar, mesmo eu me esquecendo muitas vezes Dele. Eu sei que a cada passo que dou a Sua mão me conduz e Maria me protege.

Aos meus pais, Florisvaldo Batista de Melo Filho e Ana Alba Craveiro de Melo, pelo amor, pela presença constante e por nunca medirem esforços para realizar os meus sonhos e os da minha irmã. Eu tenho consciência do quanto sou extremamente abençoada por tê-los sempre por perto.

À minha “Mana”, Emanuelle Craveiro, por ser além de minha irmã, minha grande amiga. Não conheço a vida sem você, *hermana*. Somos uma dupla e tanto para enfrentar o que for.

Ao meu esposo, Danilo Rodrigues Fernandes, que é meu parceiro de vida. Obrigada por, absolutamente, sempre estar disponível, por me incentivar a sonhar mais alto, por dividir os fardos, por acreditar em mim (muito mais do que eu mesma), por não desistir e principalmente por me amar.

À Família Rodrigues Fernandes, por completar a minha família, por serem sempre tão carinhosos e atenciosos comigo, torcendo imensamente pelo nosso sucesso e vibrando com cada conquista.

Família Brizolara Bittar, por somar tanto aos Craveiro de Melo. Vamos sempre estar unidos, independente de onde estivermos.

Ao professor e orientador Dr. Ednardo Rodrigues Freitas, que me ensinou tanto ao longo desses anos. Obrigada por toda oportunidade e disponibilidade, pelos “puxões de orelha” quando necessário, por acreditar no meu potencial e por ser um VERDADEIRO orientador.

Aos professores Dr. Germano Augusto Jerônimo do Nascimento, Dra. Irani Ribeiro Vieira Lopes, Dra. Leilane Rocha Barros Dourado e Dra. Simara Márcia Marcato, pela colaboração e disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho.

Aos colegas que contribuíram imensamente durante o tempo em que este trabalho foi realizado, pela convivência e pelos momentos de esforço e diversão que não serão esquecidos. Em especial Edibergue, Nicolas, Davi, Carla, Miguel, Ester, Cirliane, Valquíria, Luana e Rubens que participaram ativamente das atividades experimentais.

Aos amigos que eu conheci no Setor de Avicultura, Germana, Herbenson, Davyd Edibergue, Carla, Nicolas, Davi, Monik, Rafael, Carlos e Sarah. Seguimos caminhos diferentes, mas com o coração cheio de gratidão pelos ótimos momentos que vivemos.

Aos funcionários do Setor de Avicultura da UFC, representado principalmente por Rafael, Isaías, Maninho e Diego, por toda ajuda e contribuição para a execução do experimento.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos e por tornar possível a realização do presente trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Departamento de Zootecnia e todos os seus professores e funcionários que marcaram minha vida acadêmica. Agradeço pelo incentivo e valorização a minha formação profissional.

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D associada a antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre aspectos produtivos, qualidade da carne, incidência de miopatias peitorais, qualidade óssea, síndrome do osso negro e *status* oxidativos do soro, do fígado e da carne do peito de frangos. Foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em oito rações formuladas para serem isoenergéticas e isonutritivas: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C. O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 (1836 UI/kg) e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida (0,63 mg/kg). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o desempenho, rendimento de carcaça, fenólicos totais, capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa do soro e do fígado das aves. Também não foi observado efeito significativo da suplementação de Vit. D, Vit. K3 e antioxidantes sobre qualidade da carne e qualidade óssea, assim como, também não foi observada influência dos aditivos sobre fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante total e estabilidade lipídica da carne. A inter-relação da Vit. D com os antioxidantes e a Vit. K3 não afetou negativamente a incidência de miopatias peitorais e de síndrome do osso negro. Conclui-se que o uso associado desses aditivos na dieta de frangos de corte não afeta os aspectos produtivos, a qualidade da carne, a incidência de miopatias peitorais, a qualidade óssea, a incidência de síndrome do osso negro e o *status* oxidativo na carne e no organismo dos frangos de corte.

Palavras-chave: 25-hidroxicolecalciferol; aditivos alimentares; miopatias peitorais; oxidação; qualidade óssea; vitamina K.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of vitamin D supplementation associated with antioxidants and vitamin K3 in the diet of broiler chickens on productive aspects, meat quality, incidence of pectoral myopathies, bone quality, black bone syndrome and oxidative *status* of the serum, liver and chicken breast meat. A total of 768 one-day-old male chicks of the Ag Ross 308 strain were used, distributed in a completely randomized design, with eight treatments and six replications of sixteen birds each. The treatments consisted of eight feeds formulated to be isoenergetic and isonutritive: T1 – Control diet (CD); T2 – CD + Vitamin D; T3 – CD + Vitamin D + Antioxidant A; T4 – CD + Vitamin D + Antioxidant B; T5 – CD + Vitamin D + Antioxidant C; T6 – CD + Vitamin D + Vitamin K3; T7 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant B and T8 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant C. The vitamin D metabolite used was 25OHD3 (1836 IU/kg) and for vitamin K3, menadione nicotinamide bisulfite (0.63 mg/kg) was used. There was no significant difference between treatments for performance, carcass yield, total phenolics, antioxidant capacity and oxidative stability of serum and liver of birds. There was also no significant effect of additive supplementation of Vit. D, Vit. K3 and antioxidants on meat quality and bone quality as well as no influence of additives was also observed on total phenolics, antioxidant capacity, total antioxidant activity and lipid stability of meat. The interrelation of Vit. D with antioxidants and Vit. K3 did not negatively affect the incidence of pectoral myopathies and black bone syndrome. It is concluded that the associated use of these additives in the diet of broiler chickens does not affect the productive aspects, the quality of the meat, the incidence of pectoral myopathies, the bone quality, the incidence of black bone syndrome and the oxidative *status* in the meat and in the body of broiler chickens.

Keywords: 25-hydroxycholecalciferol; food additives; pectoral myopathies; oxidation; bone quality; vitamin K.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição e valor nutricional da ração controle para frangos de corte em diferentes idades	34
Tabela 2 –	Desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3	37
Tabela 3 –	Rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3	39
Tabela 4 –	Estabilidade oxidativa, fenólicos totais e capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do fígado de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.....	41
Tabela 5 –	Composição e valor nutricional da ração controle para frangos de corte em diferentes idades	49
Tabela 6 –	Escore de avaliação para <i>white striping</i> (WS) em frangos de corte alimentados com rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.....	53
Tabela 7 –	Escore de avaliação para <i>wooden breast</i> (WB) em frangos de corte alimentados com rações contendo vit. D, isolada ou associada, a antioxidantes e vit. K3.....	54
Tabela 8 –	Qualidade da carne de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada, a antioxidantes e vit. K3 ...	57
Tabela 9 –	Fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante total e estabilidade oxidativa da carne de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada, a antioxidantes e vit. K3	60
Tabela 10 –	Composição e valor nutricional da ração controle para frangos de corte em diferentes idades	68
Tabela 11 –	Número e frequência de amostras para os escores de escurecimento da carne de frangos de corte alimentados com rações contendo vitamina D, vitamina K e antioxidantes	71
Tabela 12 –	Parâmetros ósseos da tíbia de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vitamina D, vitamina K e antioxidantes	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Vitamina D.....	14
2.1.1	<i>Homeostase de cálcio e fósforo.....</i>	15
2.1.2	<i>Vitamina D e seu papel no músculo esquelético.....</i>	16
2.1.3	<i>Efeitos de metabólitos da vitamina D sobre a qualidade óssea e muscular em frangos.....</i>	18
2.2	Vitamina K.....	20
2.2.1	<i>Vitamina K na saúde óssea e muscular.....</i>	23
2.3	Antioxidantes	23
2.3.1	<i>Papel dos antioxidantes: desenvolvimento ósseo e muscular.....</i>	25
2.4	Inter-relações	27
2.5	Considerações Finais.....	28
3	SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D COM ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: ASPECTOS PRODUTIVOS E <i>STATUS</i> OXIDATIVO DO SORO E DO FÍGADO.....	29
3.1	Introdução.....	31
3.2	material e métodos	32
3.2.1	<i>Experimento com aves</i>	32
3.2.2	<i>Delineamento experimental.....</i>	32
3.2.3	<i>Avaliação do desempenho das aves</i>	34
3.2.4	<i>Avaliação do rendimento de carcaça.....</i>	34
3.2.5	<i>Avaliação dos fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH) do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado (TBARS)</i>	35
3.2.6	<i>Análise estatística dos dados.....</i>	36
3.3	Resultados e Discussão.....	36
3.3.1	<i>Desempenho das aves.....</i>	36
3.3.2	<i>Rendimento de carcaça.....</i>	38
3.3.3	<i>Estabilidade oxidativa, fenólicos totais e capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado.....</i>	40

3.4	Conclusões.....	43
4	SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D COM ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: INCIDÊNCIA DE MIOPATIAS PEITORAIS, QUALIDADE DA CARNE E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
4.1	Introdução.....	46
4.2	Material e Métodos	47
4.2.1	<i>Experimento com aves</i>	47
4.2.2	<i>Delineamento experimental</i>	47
4.2.3	<i>Avaliação da incidência de miopatias peitorais</i>	49
4.2.4	<i>Avaliação da qualidade da carne</i>	50
4.2.5	<i>Avaliação dos fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH), atividade antioxidante (ABTS) e estabilidade lipídica da carne (TBARS)</i>	51
4.2.6	<i>Análise estatística dos dados</i>	52
4.3	Resultados e Discussão.....	53
4.3.1	<i>Incidência de miopatias peitorais</i>	53
4.3.2	<i>Qualidade da carne</i>	56
4.3.3	<i>Fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante e estabilidade lipídica da carne.....</i>	59
4.4	Conclusões.....	61
5	QUALIDADE ÓSSEA E SÍNDROME DO OSSO NEGRO EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D, ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3	63
5.1	Introdução.....	65
5.2	Material e Métodos	66
5.2.1	<i>Experimento com aves</i>	66
5.2.2	<i>Delineamento experimental</i>	67
5.2.3	<i>Avaliação da incidência da síndrome do osso negro</i>	68
5.2.4	<i>Avaliação dos Parâmetros Ósseos</i>	69
5.2.5	<i>Análise estatística dos dados</i>	70
5.3	Resultados e Discussão.....	70
5.3.1	<i>Incidência da síndrome do osso negro</i>	70
5.3.2	<i>Qualidade óssea.....</i>	72

5.4	Conclusões.....	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a produção de frangos de corte e o consumo dessa carne cresceram de maneira global (PETRACCI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2022). Esse notável crescimento é atribuído a conquistas científicas que envolvem genética, nutrição, sanidade, estratégias de gerenciamento e eficiência no manejo e no uso de equipamentos (WEIMER *et al.*, 2022). Associado a isso, a indústria avícola tem visto grandes mudanças nos padrões de consumo, com um mercado consumidor cada vez mais exigente e consciente (ALVES, 2013).

Com o intuito de atender à crescente demanda, essas aves são criadas seletivamente para o rápido crescimento e alto rendimento (CHE *et al.*, 2022). Todavia, a forma intensiva de criação e o acelerado crescimento dos frangos de corte vem sendo associado ao aparecimento de uma série de problemas para a produção e a saúde animal (SHIM *et al.*, 2012; KUTTAPPAN *et al.*, 2016; VIZZIER-THAXTON *et al.*, 2016; BROOM, 2017; GUO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; MUNIYAPPAN *et al.*, 2022).

Assim, embora a criação seletiva das aves tenha possibilitado incremento na taxa de crescimento e na eficiência alimentar, os frangos de corte frequentemente sofrem de anormalidades e distúrbios ósseos que representam grandes perdas econômicas ao setor (BELLO *et al.*, 2014; ABBASI *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2020; LACKNER *et al.*, 2022; LONG *et al.*, 2020). Além disso, condições necróticas/fibróticas vêm sendo identificadas no tecido muscular das aves, principalmente no músculo peitoral, (VELLEMAN, 2020) e essas condições podem ser agravadas em situação de estresse oxidativo, prejudicando a função geral do tecido muscular (SIHVO *et al.*, 2014), a qualidade da carne desses animais e o tempo de prateleira dos produtos cárneos (FARIAS *et al.*, 2019). Nesse contexto, a suplementação dietética de vitamina D para aves vem sendo amplamente avaliada sobre a perspectiva do desenvolvimento ósseo e muscular, devido à sua relação com a saúde, o crescimento e o desenvolvimento animal (GARCIA *et al.*, 2013; ZHANG, *et al.*, 2020a). A vitamina D exerce influência direta sobre a homeostase sérica de cálcio e fósforo, atuando na mineralização óssea (DAL JANG *et al.*, 2018). Além disso, diversos estudos destacam sua ação no desenvolvimento muscular e em aspectos de qualidade da carne (HUTTON *et al.*, 2014; VIGNALE *et al.*, 2015; FATEMI *et al.*, 2021; BONAMIGO *et al.*, 2022).

A vitamina K também é uma vitamina relacionada aos processos de mineralização do tecido ósseo (POON *et al.*, 2015; AKBARI e RASOULI-GHAHROUDI, 2018), embora essa vitamina seja principalmente associada à coagulação sanguínea (ABBASI *et al.*, 2017). Azuma *et al.* (2010) afirmaram que as quinonas apresentam uma função osteoprotetora que

regula positivamente os genes de marcadores ósseos, como a osteocalcina, além de atuar sobre a remodelação óssea e os processos de calcificação.

Os antioxidantes são suplementos nutricionais que vêm sendo amplamente estudados para frangos de corte sobre aspectos de estresse oxidativo, qualidade dos produtos cárneos e incidência de miopatias, síndromes e anormalidades ósseas (LEE *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021; KUTTAPPAN *et al.*, 2021; BONAMIGO *et al.*, 2022). Essas pesquisas evidenciam que o uso de antioxidantes, sintéticos ou naturais, podem significar o controle dos efeitos do estresse metabólico dos frangos de corte, podendo auxiliar de forma efetiva no desenvolvimento ósseo e muscular.

Diante disso, objetivou-se, com esse trabalho, avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre o desempenho, rendimento de carcaça, incidência de miopatias peitorais e síndrome do osso negro, qualidade da carne, parâmetros ósseos, fenólicos totais e estabilidade oxidativa da carne, bem como capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vitamina D

A vitamina D constitui um grupo de compostos ativos que desempenham papel crucial em importantes funções biológicas no organismo animal, estando principalmente associada à regulação da fisiologia osteomineral (ŚWIĄTKIEWICZ *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019).

As duas principais formas de vitamina D encontradas na natureza são o ergocalciferol (vitamina D₂), proveniente de plantas, e o colecalciferol (vitamina D₃), proveniente de animais (BERTECHINI, 2006; ALVES, 2013). Ambas as formas são sintetizadas a partir de reações de fotólise, por meio da conversão de seus precursores: ergosterol (vitamina D₂) e 7-deidrocolesterol (7-DHC) (JORGE *et al.*, 2018).

A ativação do 7-DHC em animais ocorre necessariamente na presença de luz solar. Essa síntese da vitamina D endógena acontece na epiderme (camada de Malpighi) mediante a radiação ultravioleta B (UVB), que promove uma isomerização induzida pelo calor, resultando na formação da molécula de vitamina D₃ (JORGE *et al.*, 2018). No entanto, no atual sistema intensivo de criação das aves, os frangos de corte são submetidos à pouca ou à nenhuma exposição solar, necessitando que o colecalciferol seja fornecido a partir de fontes dietéticas, a fim de promover o crescimento adequado desses animais (ABURTO *et al.*, 1998).

Durante o processo metabólico da vitamina D₃, é essencial que ela seja convertida em sua forma biologicamente ativa e assim possa atuar sobre os tecidos alvos. Dessa forma, após ser absorvida, a vitamina D dietética é transportada por uma proteína ligante de vitamina D (DBP) até o fígado (BARRAL *et al.*, 2007), onde é submetida a primeira hidroxilação, na qual a molécula de colecalciferol sofre hidroxilação no carbono 25 pela enzima 25-hidroxilase (citocromo P450), resultando na formação de 25- hidroxicolecalciferol (25OHD₃) (MOREIRA *et al.*, 2004; FRASER e MILAN, 2013).

O 25-hidroxicolecalciferol é a forma circulante da vitamina D que é predominantemente encontrada no organismo, porém, trata-se de uma forma metabolicamente inativa, necessitando passar por mais um processo de hidroxilação para que se torne biologicamente ativa. Esse processo ocorre nos rins, onde a enzima 1 α - hidroxilase específica (CYP27B1) catalisa a hidroxilação do 25-hidroxicalciferol, gerando 1,25 dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D₃), também conhecida como calcitriol, que é o metabólito mais potente da vitamina D, sendo a forma biologicamente ativa (ABURTO *et al.*, 1998; DELUCA, 2004).

A formação de 1,25(OH)2D3 é fortemente regulada pelo hormônio da paratireoide (PTH) e pela própria vitamina D. A elevação do PTH induz a síntese de 1,25(OH)2D3 nos rins. Esse aumento de 1,25(OH)2D3, por sua vez, atua suprimindo a produção de PTH na glândula da paratireoide, além de regular sua própria produção, controlando o processo de hidroxilação. Em paralelo, o calcitriol também induz a expressão do gene que codifica a sua degradação catabólica (enzima CYP24A1), atenuando sua ação biológica nas células alvo, mantendo o feedback auto-regulador.

Os efeitos do 1,25(OH)2D3 no organismo animal são mediados por uma série de receptores nucleares de vitamina D (VDR) encontrados em diferentes tecidos e órgãos (OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2006). Esses receptores se ligam à forma ativa da vitamina D para regular a expressão de genes envolvidos em importantes funções biológicas relacionadas tanto a mineralização óssea, destacando-se a homeostase do cálcio e fósforo (MCDOWELL, 1989; PEDROSA e CASTRO, 2005), quanto ao desenvolvimento muscular (HUTTON *et al.*, 2014; VIGNALE *et al.*, 2015). Além disso, a forma ativa da vitamina D tem forte atividade imunomoduladora que promove a imunidade de aves durante infecções patogênicas (CHOU *et al.*, 2009; MORRIS *et al.*, 2014).

2.1.1 Homeostase de cálcio e fósforo

A homeostase adequada de cálcio (Ca) e fósforo (P) é fundamental para a manutenção da saúde óssea e o desenvolvimento do músculo esquelético (KIEFER-HECKER *et al.*, 2018). Segundo Regassa *et al.* (2015) o desenvolvimento ósseo e a mineralização estão intimamente relacionados ao armazenamento de Ca e P e são diretamente influenciados por seus respectivos níveis.

Nesse cenário, a vitamina D na sua forma biologicamente ativa tem um papel importante no equilíbrio desses minerais (ST-ARNAUD *et al.*, 2000), uma vez que regula a absorção de Ca e P no intestino delgado (HAUSSLER *et al.*, 2013; PROSZKOWIEC-WEGLARZ e ANGEL, 2013) e mantém a homeostase sérica ideal para mineralização e remodelação óssea (DAL JANG *et al.*, 2018).

Segundo Świątkiewicz *et al.*, (2017), o 1,25(OH)2D3 atua na manutenção dos níveis fisiológicos de cálcio, pois regula as funções de genes essenciais para a absorção de cálcio, favorecendo a absorção de Ca intestinal, a movimentação de Ca para a circulação e a sua reabsorção renal (HOSSEIN-NEZHAD e HOLICK, 2013). De acordo com Veldurthy *et al.* (2016) a vitamina D induz a expressão dos canais de cálcio na membrana apical (TRPV6), da ATPase de membrana plasmática (PMCA) e da proteína de ligação ao cálcio calbindina-D9k,

facilitando a translocação do cálcio através dos enterócitos. Dessa forma, pode-se afirmar que a vitamina D exerce um controle direto sobre a entrada, a ligação e a extrusão basolateral de cálcio para o organismo, atuando de maneira significativa na absorção desse mineral.

A vitamina D3 e seus derivados também são considerados os principais reguladores da absorção intestinal de P, a partir da regulação da expressão do sistema de transporte de P dependente de sódio (NaPi-IIb) (KIDO *et al.*, 2013; SHAO *et al.*, 2018), exercendo, ainda, papel relevante por estimularem a expressão de fator de crescimento de fibroblastos (FGF23), que regula o metabolismo renal da própria vitamina D (COLLINS *et al.*, 2005).

Nesse contexto, níveis adequados de Ca e P são essenciais para a matriz mineral do tecido ósseo, uma vez que ela é formada, predominantemente, por esses minerais, na forma de cristais de hidroxiapatita, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, sendo os mesmos os principais responsáveis pela rigidez do tecido ósseo durante o processo de mineralização (BRUNO *et al.*, 2007). Além disso, o tecido ósseo serve como um importante reservatório de Ca e P, visando à manutenção das concentrações normais desse íon no plasma e no fluido extracelular, tendo a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como um importante mediador.

Os níveis plasmáticos de Ca e P são regulados principalmente pela via metabólica que inclui vitamina D3, PTH, calcitonina e os receptores associados no intestino delgado, nos ossos e nos rins (VEUM, 2010). Em condições em que o Ca sérico normal não pode ser mantido pela absorção intestinal de cálcio, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ atua junto com o PTH para aumentar a reabsorção de cálcio renal, mediante processos semelhantes a células intestinais (AJIBADE *et al.*, 2010), além de estimular a osteoclastogênese no tecido ósseo, disponibilizando cálcio dos ossos (VELDURTHY *et al.*, 2016).

2.1.2 Vitamina D e seu papel no músculo esquelético

Os efeitos da vitamina D no tecido muscular são associados principalmente à expressão de receptores de vitamina D no músculo esquelético e em mioblastos (SRIKUEA e HIRUNSAI, 2016). De acordo com Shanmugasundaram e Selvaraj (2012), em frangos de corte, além dos VDR, também é possível observar a presença do gene CYP27B1 no peito, no músculo da coxa e em mioblastos, indicando que tanto o músculo esquelético quanto as células satélites desses animais são capazes de converter diretamente a 25OHD_3 para sua forma ativa (SRIKUEA *et al.*, 2012).

A ação do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no tecido muscular envolve efeitos genômicos e não genômicos (GLERUP *et al.*, 2000). Os efeitos genômicos são iniciados pela ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao seu VDR, o que resulta em alterações na transcrição gênica do RNA

mensageiro e na síntese proteica (FLEET, 2004). Já os efeitos não genômicos da vitamina D são rápidos e mediados por um VDR ligado à membrana celular, envolvendo a ativação de mensageiros e a fosforilação de proteínas intracelulares (OWENS *et al.*, 2015).

Segundo Dirks-Naylor e Lennon-Edwards (2011), os efeitos não genômicos da vitamina D no músculo esquelético se concentram na regulação de proteína quinase A (PKA)/cAMP, proteína quinase B (PKB), proteína quinase C (PKC), CAMK e múltiplas vias MAPK. Esse efeito foi evidenciado por Pedrosa e Castro (2005) que relataram a importância da vitamina D no transporte ativo de cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático (RS) das células musculares, a partir da fosforilação de proteínas na membrana do RS estimulada pela 1,25(OH)2D3.

A vitamina D na sua forma ativa afeta a função muscular principalmente por meio da transcrição de proteínas relacionadas ao cálcio, uma vez que esse mineral é um modulador crítico da função do músculo esquelético e qualquer alteração nas concentrações de cálcio pode afetar as propriedades contráteis e de relaxamento do músculo (BERCHTOLD *et al.*, 2000).

Dessa forma, a ação da vitamina D no músculo está diretamente associada à homeostase do cálcio, que é um fator importante na interação entre o citosol e as mitocôndrias, estando relacionado ao metabolismo energético muscular (GLANCY e BALABAN, 2012), uma vez que as mitocôndrias das fibras musculares esqueléticas captam o cálcio citoplasmático liberado do RS durante as respostas de contração muscular (RUDOLF *et al.* 2004).

De acordo com Girgis *et al* (2013), o 1,25(OH)2D3 também regula de maneira indireta a ativação nos sarcômeros do transportador de glicose 4 (GLUT4), estimulando um aumento do conteúdo intracelular de ATP. Além disso, a vitamina D vem sendo relacionada à ativação da síntese proteica de troponina (proteína reguladora de contração), desempenhando um papel importante na regulação do tônus e da contração muscular (POINTON *et al.*, 1979; LI *et al.*, 2018).

A vitamina D também regula a expressão de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular no músculo esquelético, a partir da transcrição de RNA mensageiro, síntese proteica e ativação de fatores de crescimento que favorecem a miogênese (GARCIA *et al.*, 2011), como a IGFBP-3 que atua como uma proteína carreadora de IGF-1 (BARTON-DAVIS *et al.*, 1998).

Outro ponto importante é que o calcitriol vem sendo relacionado a melhorias nos sintomas de miopatia e fadiga muscular em humanos (SINHA *et al.*, 2013), além de contribuir para o processo de regeneração muscular (LATHAM *et al.*, 2021). Segundo Dzik *et al.* (2018), em condição de deficiência de vitamina D, ocorre um aumento da citotoxicidade mediada por

excesso de espécies reativas ao oxigênio (ROS) no tecido muscular, havendo efeitos deletérios nas concentrações de VDR no músculo esquelético e na função mitocondrial das fibras, que por sua vez leva a uma elevada atrofia muscular. Todavia, essa ação da vitamina D ainda necessita ser mais esclarecida.

2.1.3 Efeitos de metabólitos da vitamina D sobre a qualidade óssea e muscular em frangos

Com base em estudos recentes, pode-se inferir que as recomendações do National Research Council (NRC) para a ingestão de vitamina D3 por frangos de corte podem não ser suficientes para garantir a saúde óssea das aves modernas (WHITEHEAD *et al.*, 2004; FLEMING, 2008). De fato, diversos experimentos demonstram que as exigências de vitamina D3 para frangos de corte são significativamente maiores do que as recomendações do NRC (NRC, 1994), ultrapassando os 200 UI/kg ou 5 µg/kg (WHITEHEAD *et al.*, 2004; WALDENSTEDT, 2006; ŚWIĄTKIEWICZ *et al.*, 2017; RAMA RAO *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2021).

Além disso, o rápido crescimento e desenvolvimento desses animais para obter altos rendimentos de carne tem causado mudanças fisiológicas e bioquímicas nos tecidos, o que pode resultar em distúrbios metabólicos e esqueléticos, bem como síndromes, deformidades e miopatias (PETRACCI e CAVANI, 2012; CAPLEN *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-CERÓN *et al.*, 2015; PART *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2020). Essa situação representa um dos principais desafios enfrentados pela indústria avícola atualmente.

Nesse contexto, o uso de vitamina D na dieta das aves tem sido objeto de diversos estudos relacionados à prevenção de anormalidades ósseas, desenvolvimento adequado de ossos, rendimento e aspectos de qualidade da carne (GÓMEZ-VERDUZCO *et al.*, 2013; VAZQUEZ *et al.*, 2018; PROKOSKI *et al.*, 2021; ZHANG, *et al.*, 2021a; BONAMIGO *et al.*, 2022).

Segundo Ledwaba e Roberson (2003), a faixa de requisitos de vitamina D3 para prevenir o raquitismo em aves deve ser mantida entre 1600 a 3100 UI/kg. Adicionalmente, a suplementação de metabólitos de vitamina D para frangos de corte a partir de 2000 UI/kg pode prevenir a gravidade de anormalidades ósseas, como a discondroplasia tibial, condrodistrofia, degeneração femoral, espondilolistese e deformidades angulares (WHITEHEAD *et al.*, 2004; FRITTS e WALDROUP, 2005; KHAN *et al.*, 2010).

Sun *et al.* (2013) também demonstraram que níveis de colecalciferol (2000 e 4000 UI/kg) melhoraram a capacidade de locomoção e as características de qualidade óssea, diminuindo também a incidência/intensidade de pododermatites. Somando a isso, o uso de

25OHD3 pode atenuar a ocorrência de claudicação em frangos de corte, como demonstrado por Nääs *et al.* (2008) e Wideman *et al.* (2015).

A suplementação dos metabólitos da vitamina D, como o colecalciferol, 25OHD3 ou 1,25(OH)2D3 tem sido relacionada a estratégias nutricionais para melhora da estrutura óssea (MORRIS, 2014). Isso ocorre devido à sua relação com a mineralização e manutenção do tecido ósseo, estando envolvida no crescimento esquelético que dá suporte às aves para obtenção do máximo desempenho produtivo (BRITO *et al.*, 2010). Além do mais, a vitamina D participa do controle da produção de colágeno tipo II (HINEK E POOLE, 1988), da indução a síntese de osteocalcina (DANTAS *et al.*, 2009), da estimulação da reabsorção óssea pelos osteoclastos (BARRAL *et al.*, 2007) e da atuação sobre os condrócitos da placa de crescimento ósseo (CASTRO, 2011).

Ramo Rao *et al.* (2019) ao avaliarem o aumento de vitamina D3 em níveis de 300 UI/kg para 1200 UI/kg observaram um incremento no ganho de peso corporal, porcentagem de cinzas e resistência da tíbia em frangos de corte de 17 e 35 dias, demonstrando a influência dessa vitamina sobre a mineralização e estrutura óssea das aves.

Conforme evidenciado em diversos estudos, o 25OHD3 apresenta evidente potencial biológico, sendo esse metabólito, de maneira geral, mais eficiente quando comparada ao colecalciferol na dieta das aves (ŚWIĄTKIEWICZ *et al.*, 2017). No entanto, resultados positivos também foram obtidos para outros derivados da vitamina D, como o 1 α hidroxicolecalciferol (1 α OHD3), análogo sintético da vitamina D3, que quando adicionado à ração de frangos de corte em crescimento (5 μ g/kg), com a redução de Ca dietético nas rações, melhorando a absorção desse mineral e sua deposição no osso (WARREN *et al.*, 2020). Resultados semelhantes também foram observados por Ebrahimi *et al.* (2016) em que a suplementação de 1 α OHD3 em dieta pobre em Ca e P promoveu um maior ganho de peso e uma maior resistência a quebra da tíbia.

Embora bem conhecida por seu papel no desenvolvimento ósseo e na homeostase mineral, há evidências também que a vitamina D é capaz de atuar como um regulador do desenvolvimento muscular e da hipertrofia (STARKEY, 2014).

Conforme avaliado por Hutton *et al.* (2014) e Vignale *et al.* (2015), a vitamina D está relacionada ao desenvolvimento do músculo, especialmente no que diz respeito ao rendimento de carne de peito. Melhorar o status de vitamina D pode estimular a atividade das células satélites do músculo esquelético, promovendo uma resposta de hipertrofia no músculo peitoral maior (músculo de contração rápida). Além disso, esses autores também observaram que o número VDRs aumentou em frangos de corte suplementados com 25OHD3, sugerindo

que esse metabólito pode ampliar a atividade metabólica da vitamina D e modular a expressão de genes específicos ligados ao desenvolvimento muscular.

Han *et al.* (2012) demonstraram a ação da vitamina D sobre aspectos de qualidade da carne, em que a suplementação de $1\alpha\text{OHD}_3$ influenciou a capacidade de retenção de água, a força de cisalhamento e coloração da carne de frangos de corte. Mabelebele *et al.* (2013) também verificaram que a utilização de colecalciferol em alto nível dietético (acima de 6830 UI/kg) promoveu um aumento da maciez, da suculência e do sabor da carne de frangos, uma vez que houve uma melhora na mobilização de cálcio muscular e na ação das calpaínas e proteases no músculo. Para esses autores, a vitamina D estimula a produção de proteínas ligantes de cálcio que ativam o complexo de amaciamento ativado por cálcio (CAT), favorecendo a atividade enzimática da calpaína e outras proteases envolvidas no processo de amaciamento da carne.

Segundo Dantas *et al.* (2009), há uma possível associação entre a vitamina D e a redução de processos inflamatórios. Fatemi *et al.* (2021) mostraram que a administração de 25OHD_3 *in ovo* resultou em menores escores de *wooden breast* (WB) em frangos de corte aos 41 dias de idade, indicando uma atividade do 25OHD_3 sobre a incidência de miopatias peitorais. Entretanto, estudos que relacionam os metabólitos dietéticos da vitamina D e a incidência de miopatias e síndromes em frangos de corte ainda são escassos e muitas vezes divergentes (BALDO *et al.*, 2013; EBRAHIMI *et al.*, 2016; MOTA *et al.*, 2019; EL-SAFTY *et al.*, 2022), havendo a necessidade de uma maior investigação.

2.2 Vitamina K

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que está envolvida em uma ampla variedade de atividades biológicas no organismo animal. Existem inúmeras proteínas essenciais que são dependentes de vitamina K (VKDPs) para diversos processos como: coagulação, crescimento, proliferação celular, respostas a reações inflamatórias e metabolismo ósseo (AKBARI e RASOULI-GHAHROUDI, 2018; WEN *et al.*, 2018; ALAGAWANY *et al.*, 2021).

A vitamina K pode ser encontrada na natureza nas formas de filoquinonas (K1), presentes em vegetais (BOOTH e SUTTIE, 1998) e na forma de menaquinonas (K2), que são sintetizadas a partir de microrganismos, como as bactérias (VERMEER *et al.*, 1995) e que podem apresentar diferentes isoformas na natureza (MK-n, variando de MK-2 a MK-14). Também existe a forma sintética da vitamina K, a vitamina K3, também chamada de menadiona que quando presente no organismo animal precisa ser convertida para a forma K2 para ser metabolizada (STAFFORD, 2005).

Embora a microflora intestinal dos animais esteja envolvida na síntese de vitamina K e que o corpo recicle e reutilize essa vitamina, sua absorção pode ser limitada (FERLAND, 2012). Além disso, em condições específicas, como na criação de frangos de corte que apresentam altas taxas de crescimento e presença frequente de agentes estressores, torna-se, muitas vezes, necessária a suplementação dessa vitamina.

De maneira geral, a vitamina K atua como um cofator enzimático para a carboxilação de proteínas dependentes de vitamina K que estão relacionadas a processos essenciais no organismo animal (WEN *et al.*, 2018). Dessa forma, a vitamina K na sua forma reduzida (hidroquinona) atua como uma coenzima para a atividade da enzima glutamato γ -carboxilase (GGCX) que converte resíduos de aminoácido glutamato (GLU) em resíduos de ácido γ -glutâmico (GLA) (LANHAM *et al.*, 2015), ativando inúmeras proteínas fundamentais ao organismo, como a protombina, as proteínas anticoagulantes, a osteocalcina, a periostina, etc.

Durante essa γ -carboxilação ocorre também a manutenção da vitamina K no organismo, uma vez que a hidroquinona é oxidada dando origem a forma 2,3-epoxi vitamina K que logo é reconvertida a sua forma ativa pela ação da enzima epóxi-redutase, mantendo o ciclo de vitamina K (AZUMA e INOUE, 2019).

O papel mais amplamente conhecido da vitamina K está relacionado a aspectos de coagulação sanguínea. Portanto, as exigências nutricionais de aves para essa vitamina baseiam-se nas respostas de coagulação do sangue, não levando em consideração o metabolismo da vitamina K para outros processos, como o crescimento ósseo (PEARSON DEBRA, 2007). Todavia, estudos recentes demonstram a importância da vitamina K para a remodelação óssea e processos de calcificação (WEN *et al.*, 2018; STOCK e SCHETT, 2021).

Segundo Lombardi *et al.* (2015), a presença de vitamina K no osso e a sua indispensável atuação na carboxilação de diversas proteínas sintetizadas no tecido ósseo, como osteocalcina (OC) e proteína GLA da matriz, demonstram sua ação efetiva nos processos de calcificação e renovação de ossos e cartilagem. Stock e Schett (2021) afirmam que as propriedades biológicas da osteocalcina e da proteína GLA da matriz são diretamente dependentes de uma modificação pós-translacional ativada pela vitamina K.

Nesse contexto, a OC γ -carboxilada tem um papel fundamental para a mineralização óssea, uma vez que após ser ativada pela vitamina K, a molécula de OC é capaz de atrair íons de cálcio, incorporando-os aos cristais de hidroxiapatita que formam a matriz óssea, favorecendo a mineralização óssea e a prevenção de processos de calcificação de tecidos moles (ZOCH *et al.*, 2016). Embora a transcrição e tradução do gene da osteocalcina ser

regulada pela 1,25(OH)2D3, a sua capacidade de se ligar aos íons cálcio é dependente da vitamina K (LOMBARDI *et al.*, 2015).

Para Akbari e Rasouli-ghahroudi (2018), a vitamina K também exerce um impacto significativo na proliferação e diferenciação dos osteoblastos de modo independente das VKDPs, além de ser capaz de atuar de maneira osteoprotetora na ativação de biomarcadores osteoblásticos e de matriz extracelular (AZUMA *et al.*, 2010; POON *et al.*, 2015). De acordo com Kim *et al.* (2013) e Wen *et al.* (2018), a vitamina K promove a diferenciação de osteoblastos enquanto evita a diferenciação dos osteoclastos, a partir da estimulação da expressão da osteoprotegerina (OPG) e da inibição da expressão do ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL), diminuindo a ação osteoclástica e, conseqüentemente, a reabsorção óssea.

Outro aspecto relacionado a vitamina K que vem sendo avaliado pelos pesquisadores é uma possível atuação da carboxilação da OC sobre a saúde muscular esquelética (LEE *et al.*, 2007; LEVINGER *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2021). Todavia esses resultados são divergentes, sendo necessária uma investigação mais detalhada (ALONSO *et al.*, 2023). Ademais, ainda não existem estudos que expliquem de maneira mais completa os mecanismos da ação da vitamina K no tecido muscular esquelético (AZUMA e INOUE, *et al.*, 2019).

Ronning *et al.* (2018) afirmam que a vitamina K2 *in vitro* foi capaz de promover o aumento na proliferação e na migração de células musculares, além de influenciar a expressão gênica dos fatores de transcrição da miogênese, como miogenina e MyoD, afetando as fases iniciais de proliferação muscular.

Alguns autores também sugerem que a vitamina K pode regular o metabolismo energético no músculo esquelético de humanos através da eficiência na transferência de elétrons na mitocôndria e na produção de ATP, mantendo o equilíbrio e prevenindo a sarcopenia (VOS *et al.*, 2012; BOENGLER *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2020). Todavia, estudos que destaquem e expliquem os efeitos da vitamina K no tecido muscular de aves são escassos, necessitando serem realizadas mais pesquisas a fim de esclarecer a ação efetiva da vitamina K sobre esses aspectos.

2.2.1 Vitamina K na saúde óssea e muscular

Diversas pesquisas evidenciam que a absorção de vitamina K está inversamente relacionada ao risco de fragilidades, fraturas ósseas e osteoporose, além de promover a

formação óssea e suprimir a reabsorção (CZOGALLA *et al.*, 2017; CHIN, 2020), o que pode representar benefícios para a produção de frangos de corte.

Fleming *et al.* (2003), ao avaliar a suplementação de vitamina K3 (10 mg/kg) para poedeiras, observam uma maior densidade óssea da tíbia e do úmero e uma maior resistência a quebra desses ossos, no entanto, as concentrações plasmáticas de osteocalcina não foram afetadas pela suplementação.

Guo *et al.* (2020) estudaram o efeito da suplementação de vitamina K3 (0; 0,5; e 4,0 mg/kg) para frangos de corte (machos e fêmeas) sobre a qualidade óssea e observaram que machos suplementados com vitamina K apresentaram maior resistência à quebra da tíbia, aos 21 dias de idade. O teor de cinzas da tíbia também foi melhorado linearmente com a suplementação, em ambos os sexos, demonstrando a eficiência da vitamina K sobre o processo de mineralização óssea, a partir da modulação do metabolismo do cálcio, bem como a expressão osteogênica.

Segundo Stock e Schett (2021), a vitamina K desempenha papel na regulação da síntese e remodelação dos ossos, sendo um marcador importante para a formação óssea em condições de osteoporose. Assim, para Liu *et al.* (2021), a suplementação de vitamina K2 (2 mg/kg) em dietas de galinhas pode aumentar a resistência óssea em uma situação de desafio com *Salmonella Enteritidis*, uma vez que infecções bacterianas e seus produtos têm sido descritos como potentes estimuladores da osteoclastogênese e reabsorção óssea (NAIR *et al.*, 1996).

Zhang *et al.* (2017) relataram que a suplementação de vitamina K regula positivamente a expressão da fosfatase alcalina, da osteocalcina e do Runx2, atuando sobre a transcrição na diferenciação de osteoblastos e no processo de mineralização.

Para frangos de corte, a suplementação de vitamina K3 dietética (8 mg/kg) promoveu aumento nos níveis de osteocalcina sérica e maior capacidade de ligação da hidroxiapatita a matriz óssea, durante as fases inicial e de crescimento das aves (ZHANG *et al.*, 2003). Todavia, Duarte *et al.* (2014) observaram que a qualidade óssea de frangos de corte de crescimento rápido pode ser afetada negativamente com a suplementação de altos níveis de vitamina K3 dietética (11,6 mg/kg; 21,6 mg/kg; 41,6 mg/kg, 61,6 mg/kg e 81,6 mg/kg) e que aspectos relacionados ao crescimento animal podem não ser influenciados.

2.3 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações retardam a oxidação de biomoléculas facilmente oxidáveis, como lipídios e proteínas (KARRE *et al.*, 2013).

Segundo Munteanu e Apetrei (2021), mesmo que em baixas concentrações do substrato oxidável, esses compostos antioxidantes diminuem ou inibem significativamente os processos oxidativos, sendo capazes de neutralizar e proteger as células dos danos causados pelos radicais livres (RL).

No organismo animal, existem naturalmente sistemas de defesa antioxidante que controlam a produção de radicais livres e mantêm o equilíbrio redox (antioxidante/pró-oxidante), permitindo o funcionamento fisiológico e bioquímico normal do corpo (CORSELLO *et al.*, 2018). Esses antioxidantes também são chamados de antioxidantes enzimáticos, podendo destacar a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (HALLIWELL *et al.*, 1995) que são enzimas antioxidantes que agem como importantes sequestradores de espécies reativas ao oxigênio (EROS), mantendo os EROS em níveis adequados (ZHOU *et al.*, 2018).

Os sistemas de defesa antioxidantes encontrados no organismo são responsáveis por reduzir a produção de radicais livres, controlando a disponibilidade de oxigênio e a atividade de enzimas que produzem EROS, como a NADPH oxidase e xantina oxidase (CIRCU e AW, 2010). Segundo Hekimi *et al.* (2011), esses sistemas de defesa são capazes de preservar a integridade das mitocôndrias, atuar na eliminação de radicais livres e de produtos tóxicos, reparar biomoléculas danificadas, regenerar antioxidantes e evitar que danos oxidativos sejam transferidos para outras células e tecidos (FONTANI *et al.*, 2015; SURAI *et al.*, 2019). Além disso, os sistemas de defesa antioxidantes também auxiliam na estabilidade de ferro e cobre, impedindo que ocorra a formação de novos radicais a partir desses minerais (SURAI *et al.*, 2019).

Existe também uma gama de compostos naturais e sintéticos com propriedades antioxidantes que podem ser utilizados como aditivos na alimentação animal e em produtos alimentícios. Os principais antioxidantes sintéticos utilizados são BHA (butilhidroxianisol), o BHT (butilhidroxitolueno), PG (galato de propila) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) (TAKEMOTO *et al.*, 2009), que são fenóis com alta capacidade doadora de elétrons ou de hidrogênio (CONEGLIAN *et al.*, 2011). Todavia, o uso desses antioxidantes sintéticos vem sendo questionado devido a uma possível toxicidade e atividade carcinogênica (JUNTACHOTE *et al.*, 2006).

Os antioxidantes naturais são provenientes de material vegetal, com atividade antioxidante derivada de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, vitaminas, enzimas e cofatores (MUNTEANU e APETREI, 2021). Esses antioxidantes vêm sendo amplamente

estudados devido a sua maior segurança e por apresentarem resultados semelhantes aos antioxidantes sintéticos (REDDY *et al.*, 2018).

2.3.1 Papel dos antioxidantes: desenvolvimento ósseo e muscular

O rápido crescimento e a alta capacidade de deposição muscular dos frangos de corte têm sido relacionados à imaturidade de tecidos e órgãos, resultando em um aumento da demanda metabólica e em alterações histológicas e bioquímicas no funcionamento normal do organismo desses animais, tornando-os mais suscetíveis ao estresse oxidativo (JULIAN, 2005; SOLEIMANI *et al.*, 2011). Essa condição associada a uma variedade de fatores estressores nos quais esses animais são frequentemente submetidos, desencadeiam alterações para a homeostase do organismo, induzindo a formação excessiva de radicais livres e de espécies reativas ao oxigênio (JESUS, 2007; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) que prejudicam o desempenho produtivo e comprometem a saúde animal (SURAI e FISININ, 2016).

De maneira geral, o oxigênio é extremamente importante para o metabolismo, todavia, sua presença no organismo também pode ser perigosa, devido à possibilidade da ocorrência de reações de oxidação descontroladas e de formação de EROS (LIU *et al.*, 2019). De acordo com Zuo *et al.* (2015), quando os EROS são produzidos em níveis considerados baixos, atuam como importantes moléculas de sinalização envolvidas em uma variedade de atividades fisiológicas, como manutenção da homeostase tecidual e regulação da atividade transcricional, de proliferação e de diferenciação celular. No entanto, quando os níveis de EROS aumentam, excedendo a capacidade do organismo em neutralizá-los através dos seus sistemas antioxidantes naturais, pode resultar em danos às macromoléculas biológicas, levando a disfunções celulares e comprometimento da produtividade (SALLES *et al.*, 2019).

Segundo Surai *et al.* (2019), o excesso de EROS promove uma condição de estresse oxidativo e moléculas biológicas importantes, como ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e DNA, podem ser danificadas, levando a consequências prejudiciais em termos de saúde, crescimento e desenvolvimento das aves.

Na produção de frango de corte, essa problemática desperta ainda mais interesse, uma vez que é cada vez mais frequente o aparecimento de problemas ósseos (DOMAZETOVIC *et al.*, 2017), de miopatias peitorais (MUTRYN *et al.*, 2015) e de síndromes (MELO *et al.*, 2020) que podem ser agravadas por reações oxidativas descontroladas, levando o organismo a uma condição de estresse que é capaz de comprometer a atividade celular, prejudicar a saúde animal, a qualidade de carne e reduzir a estabilidade e o tempo de prateleira dos produtos avícolas (VASQUEZ e SOTO-SOLANOVA, 2009; KORVER, 2010). Além disso, os frangos

de corte modernos apresentam como característica uma maior deposição de gordura em comparação aos frangos de crescimento mais lento (LENGKIDWORRAPHIPHAT *et al.*, 2020), o que aumenta a susceptibilidade a reações de deterioração oxidativa.

Segundo Lin *et al.* (2006), o estresse oxidativo tem sido considerado um dos principais fatores negativos que afetam o desempenho das aves e a qualidade da carne, sendo associado, como uma característica fundamental, a miopatias peitorais do tipo peito amadeirado (*wooden breast*) e estrias brancas (*white striping*) (MUTRYN *et al.*, 2015; SALLES *et al.*, 2019). No entanto, não está bem estabelecido se o estresse oxidativo é uma causa e/ou efeito da ocorrência de miopatias (ZAMBONELLI *et al.*, 2016; BOERBOOM *et al.*, 2018), havendo necessidade de maiores investigações.

Conforme descrito por Chan *et al.* (1994), a combinação no músculo esquelético de catalisadores de oxidação lipídica, sistemas de membrana altamente insaturados e períodos de alto fornecimento de oxigênio, levam o músculo, frequentemente, a condições oxidativas extremas, que podem ser agravadas pela ação da enzima NOX (NADPH oxidase), presente na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático das células musculares, que podem desempenhar um papel importante na produção de espécies reativas ao oxigênio durante a contração muscular (JACKSON *et al.*, 2016).

Dessa forma, o acúmulo excessivo de EROS no tecido muscular de maneira descontrolada pode resultar em uma condição de estresse oxidativo celular, promovendo uma disfunção mitocondrial e posteriormente a morte celular pela alteração da permeabilidade (ZHOU *et al.*, 2018). Níveis elevados de EROS também podem diminuir a sensibilidade miofibrilar ao cálcio, comprometendo a função contrátil do músculo (MOOPANAR e ALLAN, 2005).

Alterações do equilíbrio redox também são associadas ao processo de remodelação óssea (FILAIRE e TOUMI, 2012). Segundo BAEK *et al.* (2010), o excesso de radicais livres pode significar distúrbios ao sistema esquelético, havendo um desequilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Para Jilka *et al.* (2013), essa condição oxidativa resulta na redução da atividade e da diferenciação osteoblástica, com prejuízo ao processo de mineralização óssea, além da indução à apoptose de osteoblastos e osteócitos que favorecem a osteoclastogênese, a remodelação e a perda óssea.

Altindag *et al.* (2008) afirmam que uma condição de baixa densidade mineral no osso, que é uma característica comum da osteoporose, está intimamente relacionada a um alto índice de estresse oxidativo. Nesse sentido, os antioxidantes podem atuar como uma importante estratégia nutricional a fim de contornar problemas ósseos e musculares. Para Domazetovic *et*

al. (2017), os antioxidantes contribuem para ativar a diferenciação dos osteoblastos e a redução da atividade dos osteoclastos, atuando de maneira positiva sobre a mineralização óssea.

Segundo dados encontrados na literatura, a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais à dieta de frangos de corte pode reduzir os efeitos do estresse oxidativo, influenciar de maneira benéfica na saúde das aves e melhorar aspectos ósseos e de qualidade da carne (LEE *et al.*, 2015, AKBARI *et al.*, 2016; ABBASI *et al.*, 2020; DUKARE *et al.*, 2021; FARIAS *et al.*, 2021; BONAMIGO *et al.*, 2022). Todavia, para Farias *et al.* (2019), a utilização de antioxidantes pode não representar alterações nas características físicas e de qualidade da carne, mesmo atuando de maneira favorável contra os processos oxidativos. Wang *et al.* (2017) relatam resultados diferentes, uma vez que o uso de antioxidante dietéticos foi capaz de promover melhoras na capacidade de retenção de água e maciez da carne, favorecendo a aceitabilidade da mesma pelos consumidores.

O uso de antioxidantes para frangos de corte também foi relacionado ao controle da incidência de miopatias (KUTTAPPAN *et al.*, 2021) e de síndromes do osso negro (MELO *et al.*, 2020), contudo, estudos com essa temática ainda são escassos.

2.4 Inter-relações

A nutrição é fundamental para promover o crescimento, o desenvolvimento e o funcionamento adequado de órgãos e tecidos no organismo animal (OHLHORST *et al.*, 2013). Em frangos de corte, que normalmente apresentam ossos porosos e deficientes em mineralização, a nutrição desempenha um papel ainda mais significativo (KORVER, 2010). Isso ocorre porque a interação entre os nutrientes, como as vitaminas D e K, é crucial para a formação e manutenção adequada da saúde óssea, uma vez que essas vitaminas atuam em etapas complementares do processo de mineralização óssea.

Nesse contexto, a vitamina D apresenta um importante papel na absorção de cálcio e fósforo pelo intestino, além de regular a concentração desses minerais no plasma e no fluido extracelular, afetando diretamente a disponibilidade dos mesmos para os tecidos ósseo e muscular (GIRGIS *et al.*, 2013). Além disso, a vitamina K também desempenha um papel importante no processo de mineralização óssea, pois ativa a osteocalcina, uma proteína não colagenosa essencial, que se liga ao cálcio, permitindo sua fixação à hidroxiapatita e a sua incorporação na matriz óssea (VERVLOET *et al.*, 2014; LOMBARDI *et al.*, 2015). Essa interação entre as duas vitaminas é fundamental para promover uma formação adequada da estrutura óssea, além de potencialmente prevenir fragilidades e deformações ósseas que frequentemente são observadas em frangos de corte modernos.

Os antioxidantes também podem apresentar uma relação efetiva sobre a ação das vitaminas D e K, uma vez que, em condições de estresse ambiental, as aves podem aumentar a excreção de minerais importantes como Ca e P (EL HUSSEINY e CREGER, 1981), afetando a qualidade óssea e o desenvolvimento muscular. Assim, de acordo Choi e Jung (2017), a deficiência desses minerais leva a uma diminuição acentuada de importantes enzimas antioxidantes, como SOD e GSH que apresentam ação efetiva sobre o controle dos processos oxidativos.

Diante do exposto, torna-se essencial o desenvolvimento de novas pesquisas que possam estudar mais profundamente os efeitos e mecanismos de ação da inter-relação das vitaminas D e K, associadas a diferentes antioxidantes sobre uma perspectiva óssea e muscular em frangos de corte.

2.5 Considerações Finais

O crescimento e o desenvolvimento ósseo e muscular de frangos de corte é dependente de nutrientes essenciais, como a vitamina D e a vitamina K. A suplementação dessas vitaminas associada a antioxidantes pode representar uma importante estratégia para contornar alterações fisiológicas que frequentemente acometem os frangos de corte modernos. Dessa forma, é importante considerar as inter-relações entre os nutrientes da dieta e garantir uma nutrição adequada e balanceada, a fim de promover saúde e desenvolvimento ósseo e muscular eficientes.

3 SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D COM ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: ASPECTOS PRODUTIVOS E *STATUS* OXIDATIVO DO SORO E DO FÍGADO

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D com antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre o desempenho, características de carcaça, fenólicos totais, capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado. Foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em oito rações formuladas para serem isoenergéticas e isonutritivas: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C. O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 (1836 UI/kg) e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida (0,63 mg/kg). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o desempenho, rendimento de carcaça, fenólicos totais, capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa do soro e do fígado de frangos de corte. Conclui-se que a suplementação de vitamina D associada a antioxidantes e vitamina K3 não afeta os aspectos produtivos e o *status* oxidativo de frangos de corte.

Palavras-chave: 25-hidroxicolecalciferol; desempenho; estabilidade oxidativa; oxidação; rendimento; vitamina K.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of vitamin D supplementation with antioxidants and vitamin K3 in broiler feed on performance, carcass characteristics, total phenolics, serum antioxidant capacity and serum and liver oxidative stability. A total of 768 one-day-old male chicks of the Ag Ross 308 strain were used, distributed in a completely randomized design, with eight treatments and six replications of sixteen birds each. The treatments consisted of eight feeds formulated to be isoenergetic and isonutritive: T1 – Control diet (CD); T2 – CD + Vitamin D; T3 – CD + Vitamin D + Antioxidant A; T4 – CD + Vitamin D + Antioxidant B; T5 – CD + Vitamin D + Antioxidant C; T6 – CD + Vitamin D + Vitamin K3; T7 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant B and T8 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant C. The vitamin D metabolite used was 25OHD3 (1836 IU/kg) and for vitamin K3, menadione nicotinamide bisulfite (0.63 mg/kg) was used. There was no significant difference between treatments for performance, carcass yield, total phenolics, antioxidant capacity and oxidative stability of serum and liver. It is concluded that vitamin D supplementation associated with antioxidants and vitamin K3 does not affect the productive aspects and oxidative *status* of broiler chickens.

Keywords: 25-hydroxycholecalciferol; performance; oxidative stability; oxidation; performance; vitamin K.

3.1 Introdução

Nos últimos anos, a demanda crescente por carne de frango tem impulsionado um notável aumento no desempenho produtivo das aves (RIBEIRO *et al.*, 2008). No entanto, esse avanço considerável do setor avícola vem sendo acompanhado de uma série de problemas relacionados à saúde e ao bem-estar animal, que incluem desde desordens ao metabolismo e a homeostase a danos em aspectos produtivos, que podem representar prejuízos econômicos para indústria de frangos de corte (LIU *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2022; MUNIYAPPAN *et al.*, 2022).

Diante disso, é conhecido que vários fatores ambientais, nutricionais e fisiológicos podem desencadear um quadro de estresse oxidativo no organismo, comprometendo o funcionamento dos sistemas de defesa antioxidantes que levam a disfunções celulares e a graves lesões oxidativas (SONG *et al.*, 2018), promovendo de maneira direta ou indireta, danos a macromoléculas importantes, como DNA, proteínas e lipídios (CHENG *et al.*, 2017).

Dessa forma, a capacidade do organismo animal de lutar contra fatores estressores é extremamente importante para garantir a manutenção da saúde e da produtividade (RAHAL *et al.*, 2014), uma vez que um desequilíbrio oxidativo associado a uma máxima capacidade de crescimento afeta o estado sanitário e a produtividade dos animais (MISHRA e JHA, 2019). Assim, a inclusão de aditivos alimentares, como as vitaminas e os antioxidantes, e a inter-relação entre eles, pode auxiliar no combate aos radicais livres e promover uma melhora a saúde animal e aos parâmetros produtivos.

A utilização de antioxidantes na dieta das aves tem um papel importante no aumento da eficiência e dos níveis de defesa antioxidante no organismo. Inúmeros antioxidantes, associados ou não a outros aditivos, vêm sendo amplamente testados sobre a alimentação animal com a finalidade de manter o equilíbrio redox (antioxidante/pró oxidante) e inibir os processos de peroxidação que influenciam a produção e a qualidade dos produtos cárneos (DELLES *et al.*, 2014; SURAI *et al.*, 2019; HOSEINIFAR *et al.*, 2020).

Somado a isso, a vitamina D também pode apresentar um papel importante sobre a saúde dos animais e os parâmetros produtivos. Bonamigo *et al.* (2022) avaliaram a atividade da 25OHD3 (2760000 UI/kg de ração) associada a um antioxidante (cantaxantina), no qual observaram uma melhora no ganho de peso, no consumo de ração e no rendimento de peito. Além disso, para Vignale *et al.* (2015), frangos de corte alimentados com 25OHD3 (5520 UI/kg de ração) podem proporcionar um aumento significativo na produção de carne de peito, melhorando assim o rendimento desse corte.

A vitamina K também é um aditivo que pode apresentar um papel fundamental na saúde dos frangos de corte, a partir do fortalecimento do sistema imunológico, da formação e mineralização óssea e da atuação nos processos de coagulação sanguínea, podendo auxiliar no crescimento e no desenvolvimento adequado dessas aves (ABBASI *et al.*, 2017).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre o desempenho, rendimento de carcaça, fenólicos totais, capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado.

3.2 Material E Métodos

3.2.1 Experimento com aves

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 2313300919.

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura/DZ/CCA/UFC em um galpão convencional para criação de frangos de corte, dividido internamente em 48 boxes de 1,5m x 1,0m (1,5m²), contendo bebedouros do tipo pendular e comedouros do tipo tubular.

Para a condução do experimento foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308 com peso médio inicial de $46,5 \pm 1,16$ g, provenientes de uma granja comercial. As aves foram imunizadas para as doenças de Marek e Gumboro no incubatório.

3.2.2 Delineamento experimental

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C.

O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida.

A ração controle continha vitamina D (3750 UI/kg de ração) e vitamina K (3,75 mg/kg de ração) a partir do suplemento vitamínico (premix). Além disso, para os tratamentos que receberam concentrações superiores às recomendações convencionais para vitamina D e vitamina K, foram adicionadas quantidades extras de vitamina D (1836 UI de 25OHD3/kg de

ração) e vitamina K (0,63 mg de K3/kg de ração), totalizando 5586 UI de vitamina D e 4,38 mg de vitamina K.

Os antioxidantes utilizados consistiram em três diferentes produtos comerciais: 500 mg/kg de antioxidante A (Alltech), composto por DI-alfa-tocoferol (90g/kg) e ácido cítrico (20g/kg); 150 mg/kg de antioxidante B (Kemin), composto por uma mistura de tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã e 30 mg/kg de antioxidante C (Laza Biotecnologia), composto por hidroxitolueno butilado (BHT) (100g/kg), hidroxianisol butilado (BHA) (30g/kg), etoxiquin (100g/kg), ácido cítrico (100g/kg) e ácido fosfórico (20/kg).

O programa de alimentação foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 21 dias), crescimento (21 a 35 dias) e final (35 a 42 dias). As rações experimentais (Tabela 1) foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais para frangos de corte recomendadas por Rostagno *et al.* (2011) e foram calculadas para serem isoenergéticas e isonutritivas, considerando os valores de composição dos alimentos propostos por Rostagno *et al.* (2011). O inerte da ração foi substituído conforme os tratamentos por vitamina D, vitamina K3 e antioxidantes.

As condições ambientais no interior do galpão foram monitoradas através de Data Logger (Data Logger U12-012; HOBO, Bourne, MA) instalado na altura das aves. Durante o período experimental, a temperatura média do galpão e a umidade relativa do ar foi de 29,2°C e 54,5% na fase pré-inicial, 28,3°C e 57,6% na fase inicial, 29,4°C e 59% na fase de crescimento e 29,3°C e 60,7% na fase final.

A cama de frango foi revolvida manualmente duas vezes por semana, a partir das 8h, e os ventiladores ligados durante os horários de temperaturas mais elevadas (9 às 15h), a partir dos 28 dias de idade.

Tabela 1 – Composição e valor nutricional da ração controle para frangos de corte em diferentes idades

Ingredientes (Kg)	Fases			
	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	52,55	56,31	61,13	64,37
Farelo de soja	40,49	36,90	31,76	28,53
Óleo de soja	2,30	2,77	3,37	3,49
Fosfato monobásico	1,92	1,74	1,54	1,46
Calcário calcítico	1,23	0,96	1,00	0,96
Sal comum	0,50	0,48	0,46	0,44
Suplemento mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Suplemento vitamínico ²	0,15	0,15	0,15	0,15
DL – Metionina	0,34	0,29	0,27	0,25
L – Lisina HCL	0,20	0,13	0,12	0,14
L – Treonina	0,13	0,04	0,02	0,01
Anticoccidiano	0,05	0,05	0,05	0,05
Promotor de crescimento	0,003	0,003	0,003	0,003
Inerte ³	0,07	0,07	0,07	0,07
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
Nível Nutricional Calculado				
Energia Metab. (kcal/kg)	2.975	3.050	3.150	3.200
Proteína bruta (%)	23,00	21,50	19,50	18,30
Cálcio (%)	0,96	0,81	0,78	0,74
Fósforo disponível (%)	0,48	0,43	0,39	0,37
Sódio (%)	0,22	0,21	0,18	0,19
Lisina digestível Aves (%)	1,28	1,15	1,02	0,96
Metionina + cistina digestível Aves (%)	0,95	0,87	0,80	0,75
Metionina digestível Aves (%)	0,64	0,58	0,45	0,49
Treonina digestível Aves (%)	0,86	0,77	0,68	0,64
Vitamina D (UI/Kg)	3.750	3.750	3.750	3.750
Vitamina K (mg/Kg)	3,75	3,75	3,75	3,75

¹Composição por kg do produto: Ferro 100.000,00 mg; cobre 20.000,00 mg; Manganês 130.000,00 mg; Zinco 130.000,10 mg; Iodo 2.000,00 mg; ²Composição por kg do produto: Vit. A 9.000.000,00 UI; Vit. D3 2.500.000,00 UI; Vit. E 20.000,00 UI; Vit. K3 2.500,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 6.000,00 mg; Vit. B6 3.000,38 mg; Vit. B12 15,00 mg; Ácido fólico 1.500,00 mg; ácido nicotínico 35000 mg; Ácido pantotênico 12.000,00 mg; Biotina 100mg; Selênio 250,00 mg; ³Inerte: Areia lavada.

3.2.3 Avaliação do desempenho das aves

As variáveis de desempenho analisadas foram o consumo de ração (g/ave), ganho de peso (g/ave) e conversão alimentar (g/g). O ganho de peso corporal e o consumo de ração foram usados para calcular a conversão alimentar. A mortalidade foi registrada diariamente e foi utilizada para a correção das variáveis de desempenho.

3.2.4 Avaliação do rendimento de carcaça

Aos 42 dias, após jejum alimentar de 6h, todas as aves foram pesadas e foram selecionadas 2 aves de cada unidade experimental, com peso vivo mais próximo do peso médio

da parcela, totalizando 96 frangos de corte. As aves selecionadas foram insensibilizadas através de eletronarcolese, seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração. Em seguida, foram realizados cortes para retirada do peito, coxa + sobrecoxa e gordura abdominal para o cálculo do rendimento dos cortes em relação ao peso da carcaça quente.

3.2.5 Avaliação dos fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH) do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado (TBARS)

Aos 42 dias de idade, foram coletadas amostras de soro a partir da coleta de sangue de uma ave por unidade experimental. As amostras de sangue foram deixadas em temperatura ambiente para coagulação e posterior centrifugação a 1.500g por 10 minutos. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante (soro) para a determinação da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH) do soro.

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada em tubos nos quais foram adicionados 250µL de soro seguido por 400µL de ácido perclórico a 35% e mantidos em banho-maria (37°C; 1 hora). Posteriormente, a mistura foi centrifugada (1.400g; 10 minutos) e 600µL do sobrenadante foi adicionado a 200µL de ácido tiobarbitúrico (1,2%). Essa mistura foi levada ao banho-maria (95°C; 30 minutos). Após resfriada, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Femto® 700 Plus, Brasil) a 535nm. Os resultados obtidos foram expressos em nmol de MDA/mL de soro (DRAPER e HADLEY, 1990).

Para evitar a influência de proteínas séricas na avaliação da atividade antioxidante, o soro foi desproteinado. Uma mistura de 0,5mL de soro e 0,5mL de acetona foram agitadas durante 1 min e depois centrifugadas a 4°C (5000g; 5 minutos) para desproteinização da amostra. O sobrenadante foi filtrado com uma pipeta de Pasteur com algodão para remover pequenas partículas, obtendo-se o extrato de soro (FERREIRA *et al.*, 2014). Os fenólicos totais foram mensurados segundo Parker *et al.* (2007). Em 100µL do extrato final foi adicionado 500µL de reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v). Passados 3 min, foi adicionado 400µL de carbonato de sódio (75%), incubado a 45°C por 25 min em banho seco (ThermoMixer C, Eppendorf®) e a absorbância medida em espectrofotômetro a 765nm. A quantificação foi feita com base na curva padrão gerada com ácido gálico e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por mililitro de soro (mg EqAG/mL soro).

A capacidade antioxidante do fígado foi avaliada pela porcentagem de captura de radicais livres do DPPH, absorbância medida em espectrofotômetro (BLOIS, 1958). Uma

alíquota de 400µL de solução metanólica do radical livre DPPH (0,1mM) foi adicionada a 360µL de tampão de fosfato (pH 7,4) mais 40µL do extrato e homogeneizado em vórtex. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Femto 700 plus) a 505nm em 20 minutos após a mistura. A inibição (descoloração) do radical livre DPPH foi calculada como a percentagem relativa de absorbância perdida da amostra no momento da leitura em relação ao controle (400µL de solução do radical livre DPPH mais 400µL de tampão de fosfato).

A estabilidade oxidativa do fígado foi avaliada conforme metodologia descrito por Cherian *et al.* (2002), com adaptações, a partir da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Aliquotas de 2g de fígado foram homogeneizadas com 6,75ml de ácido perclórico 3,86% e 18,75µl de BHT 4,5%. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10min a 4°C e filtradas em papel filtro. Do sobrenadante, 1ml foi retirado e 1ml de solução aquosa de TBA (20mM) foi adicionado e incubado em banho-maria a 95°C por 30min. A reação foi interrompida em banho de gelo e a absorbância em 531nm foi determinada usando um espectrofotômetro (Femto® 700 Plus, FEMTO Indústria e Comércio de Instrumentos, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de malondialdeído (MDA) por g de fígado.

3.2.6 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Statistical Analyses Sistem. Os dados obtidos para desempenho, rendimento de carcaça, fenólicos totais, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa do soro e do fígado foram analisados pelo procedimento ANOVA, segundo modelo inteiramente casualizado. Quando o efeito do tratamento foi significativo ($P < 0,05$), as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Student–Newman–Keuls a 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Desempenho das aves

De acordo com os resultados (Tabela 2), não houve diferenças significativas entre os tratamentos para todas as variáveis de desempenho avaliadas, nos períodos de 1 a 21 dias e 1 a 42 dias de idade, o que indica que a adição de vitamina D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3 não influenciou o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar.

Tabela 2 – Desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados		
	Consumo de Ração (g/ave)	Ganho de Peso (g/ave)	Conversão Alimentar (g/g)
1 à 21 dias de idade			
RC ¹	1409,59	1095,91	1,29
RC + Vit.D ²	1424,07	1107,19	1,29
RC + Vit. D + Ant. A ³	1380,29	1090,89	1,26
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	1409,35	1100,78	1,28
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	1417,38	1122,93	1,26
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	1449,59	1129,53	1,28
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	1423,65	1125,10	1,26
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	1395,85	1084,25	1,29
Média	1413,72	1107,07	1,28
CV ⁷ (%)	2,66	2,71	2,12
Efeitos – ANOVA ⁸	<i>p – valor</i>		
Tratamentos	0,1138	0,0916	0,4049
1 à 42 dias de idade			
RC ¹	4757,7	2945,8	1,62
RC + Vit.D ²	4856,7	2952,7	1,65
RC + Vit. D + Ant. A ³	4700,3	2861,6	1,64
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	4707,2	2871,3	1,64
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	4894,4	3010,9	1,66
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	4967,4	3060,0	1,62
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	4686,0	2832,4	1,66
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	4683,3	2851,4	1,64
Média	4781,64	2923,27	1,64
CV ⁷ (%)	4,98	6,61	2,90
Efeitos - ANOVA ⁸	<i>p – valor</i>		
Tratamentos	0,2871	0,3851	0,8487

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicolecalciferol; ³Ant. A – DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfato de nicotinamida; ⁷CV – Coeficiente de variação; ⁸ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo.

Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos obtidos por Colet *et al.* (2015), Hsiao *et al.* (2018) e Gao *et al.* (2022), que não observaram efeitos positivos da adição de metabólitos da vitamina D, combinados ou não a aditivos bioativos, sobre o desempenho de frangos de corte.

A ausência de um efeito significativo sobre o desempenho, possivelmente está relacionada aos níveis adequados de nutrientes presentes na dieta basal desses animais, principalmente em relação a Ca e P, uma vez que a eficácia da vitamina D e seus metabólitos está relacionada à disponibilidade desses nutrientes (WHITEHEAD *et al.*, 2004; ABBASI *et*

al., 2017). Além disso, é possível observar com maior frequência efeitos da vitamina D sobre o desempenho de aves que recebem níveis abaixo do considerado ideal de Ca e P na dieta, pois a vit. D desempenha um papel importante na síntese de proteínas ligantes de Ca, que são essenciais para a absorção de Ca dietético, melhorando a eficiência de absorção, além de também atuar sobre a absorção do P e melhorar sua utilização (EDWARDS, 2002; ZHU *et al.* 2015).

Bonamigo *et al.* (2022) observaram que frangos de corte de 21 dias suplementados com dieta contendo 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) e antioxidante (cantaxantina) apresentaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar, estando os resultados relacionados pelos autores ao uso do antioxidante, uma vez que esse aditivo reduz os processos oxidativos favorecendo a utilização dos nutrientes pelos animais. Todavia, muitos trabalhos não associam a adição de antioxidantes à dieta, a melhorias e ao desempenho das aves (AVILA-RAMOS *et al.*, 2012; FARAHAT, *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2021), assemelhando-se aos resultados encontrados neste estudo.

O uso de vitamina K3 para frangos de corte acima do valor recomendado pelo NRC (1994), que é de 0,5 mg/kg, também pode ser relacionado a melhorias, ao desempenho e crescimento geral das aves (ZHANG, *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2020), uma vez que a exigência desses animais para vitamina K vai além dos fatores de coagulação sanguínea (PEARSON DEBRA, 2007). No entanto, a suplementação de 4,38 mg de K3/kg de ração e 5586 UI de vit. D/kg de ração combinado ou não a antioxidantes, não foi capaz de influenciar as variáveis de desempenho, inferindo-se que as exigências nutricionais das aves para essas vitaminas foram prontamente atendidas, corroborando com resultados encontrados por Stanquevis *et al.*, 2017.

3.3.2 Rendimento de carcaça

Não foi observado efeito dos tratamentos para as variáveis de características de carcaça ($P>0,05$) (Tabela 3), indicando que a adição de vitamina D, antioxidantes e vitamina K3 não afetou significativamente o rendimento de carcaça, de peito, de coxa e sobrecoxa e de gordura abdominal.

Em estudos anteriores, também não foram observados efeitos da suplementação de vitamina D e/ou antioxidantes sobre os parâmetros de características de carcaça (ALVES *et al.*, 2018; MAZUR-KUŚNIREK *et al.*, 2019; BAJWA *et al.*, 2020; BONAMIGO *et al.*, 2022). Já Brito *et al.* (2010) e Vignale *et al.* (2015) verificaram que a adição de 25OHD3 (2760 UI/kg e 5520 UI /kg, respectivamente) às rações de frangos de corte foi capaz de influenciar de forma positiva o rendimento.

Tabela 3 – Rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados (%)			
	Carcaça	Peito	Coxa+sobrecoxa	Gordura abdominal
RC ¹	75,24	39,00	31,48	1,67
RC + Vit.D ²	75,63	38,78	31,11	1,34
RC + Vit. D + Ant. A ³	76,11	38,73	31,65	1,58
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	76,30	37,50	32,41	1,34
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	76,23	39,08	31,38	1,63
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	74,85	39,37	32,44	2,02
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	75,97	38,63	31,15	1,46
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	76,41	39,42	31,66	1,28
Média	75,84	38,81	31,66	1,56
CV ⁷ (%)	2,54	4,86	6,31	29,81
Efeitos - ANOVA ⁸		<i>p – valor</i>		
Tratamentos	0,8311	0,7420	0,8996	0,1997

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicoilecalciferol; ³Ant. A – DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã;

⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfato de nicotinamida;

¹RC – Ração controle; ⁷CV – Coeficiente de variação; ⁸ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo.

Os mecanismos de ação da vitamina D nos músculos de frangos de corte estão relacionados ao seu papel sobre o desenvolvimento e a integridade do músculo esquelético, uma vez que essa vitamina aumenta o rendimento muscular através da hiperplasia da fibra muscular pela ativação de células satélites (HUTTON *et al.*, 2014; VIGNALE *et al.*, 2015). Dessa forma, como as respostas de rendimento de carcaça/cortes estão relacionadas ao crescimento das aves (BAJWA *et al.*, 2020) e não foi observada influência dos tratamentos sobre o desempenho, verifica-se ausência de efeito significativo sobre o rendimento. Além disso, o nível de vitamina D foi semelhante entre os tratamentos que receberam a suplementação de 25OHD3 (1836 UI de 25OHD3/kg de ração + 3750 UI de D3/kg de ração), diferindo das aves que receberam apenas a RC + vitamina D3(3750 UI de D3/kg de ração), o que pode ter limitado a possível ação da vit. D entre os tratamentos sobre a deposição muscular.

De maneira geral, as pré-misturas de vitaminas/minerais que são adicionadas comumente à dieta das aves já contém níveis considerados bons de vitamina D3, no entanto, muitos estudos vêm avaliando a suplementação de diferentes metabólitos de vitamina D acima dos níveis comumente utilizados nesses suplementos vitamínicos/minerais (BRITO *et al.*, 2010; BALDO, 2015). Segundo Garcia (2012), a suplementação de metabólitos de vitamina D em conjunto com uma fonte de vitamina D3 é uma forma de maximizar o desempenho e garantir

um melhor rendimento, uma vez que proporciona redução de gastos energéticos e potencialização de resultados, no entanto, nesse estudo a suplementação de 25OHD3 à ração controle não apresentou efeito sobre os parâmetros produtivos.

Estudos sobre o efeito da vitamina K em relação ao desempenho e rendimento de aves são escassos, tendo em vista que a suplementação dessa vitamina normalmente é estudada visando aspectos de coagulação sanguínea (STANQUEVIS *et al.*, 2017) e formação óssea (ZHANG *et al.*, 2003).

Apesar do efeito modulador da menadiona e de seus derivados no sistema da ciclo-oxigenase já ser bem estabelecido (KAWAMURA *et al.*, 2010), o *status* da vitamina K também pode ter um efeito anti-inflamatória (OHSAKI *et al.*, 2010) e uma possível ação sobre a composição do tecido muscular esquelético (YAKOVIICHUK *et al.*, 2021), podendo influenciar na redução do estresse fisiológico, promovendo um potencial aumento da produtividade das aves. Contudo, no presente estudo, a combinação de vitamina D e vitamina K3, associada ou não a antioxidantes, não afetou as características de carcaça dos frangos de corte, havendo necessidade de mais estudos que visem elucidar tais benefícios.

3.3.3 Estabilidade oxidativa, fenólicos totais e capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do soro e do fígado.

A estabilidade oxidativa, os compostos fenólicos totais, a capacidade antioxidante do soro e a estabilidade oxidativa do soro e do fígado não foram influenciados significativamente pela suplementação de vitamina D, de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3 na dieta dos frangos de corte (Tabela 4).

Em decorrência das propriedades nutricionais e fisiológicas, os frangos de corte são susceptíveis ao processo de peroxidação lipídica, levando à produção de metabólitos peroxidativos (ZHANG *et al.*, 2020b) que consequentemente comprometem importantes componentes biológicos.

Tabela 4 – Estabilidade oxidativa, fenólicos totais e capacidade antioxidante do soro e estabilidade oxidativa do fígado de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados			
	Soro			Fígado
	TBARS (nmolMDA ⁹ /mL)	Fenólicos totais (µgEqAG ¹⁰ /mL)	DPPH (%)	TBARS (mgMDA ⁹ /g)
RC ¹	4,65	86,36	18,02	2,80
RC + Vit.D ²	4,52	89,23	17,57	2,88
RC + Vit. D + Ant. A ³	5,05	78,61	19,30	2,76
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	5,06	79,57	19,98	2,92
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	5,25	98,95	20,33	2,72
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	4,84	92,13	18,77	2,99
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	4,70	81,55	21,51	2,95
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	5,19	94,94	21,99	3,26
Média	4,90	87,67	19,68	2,91
CV ⁷ (%)	9,74	24,38	32,62	11,71
Efeitos - ANOVA ⁸	<i>p – valor</i>			
Tratamentos	0,1110	0,6472	0,9191	0,1935

RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicoлекаliferol; ³Ant. A – DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfito de nicotinamida; ¹RC – Ração controle; ⁷CV – Coeficiente de variação; ⁸ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo; ⁹MDA – Malondialdeído; ¹⁰EqAG – Equivalente de ácido gálico.

De acordo com Moselhy *et al.* (2013), a peroxidação lipídica resulta em uma variedade de intermediários e produtos finais que incluem hidroperóxidos lipídicos, aldeídos e malondialdeídos (MDA), que podem promover um desequilíbrio entre os processos oxidativos e os sistemas antioxidantes, prejudicando a capacidade do organismo em neutralizar os danos oxidativos, comprometendo as estruturas celulares e a homeostase do organismo.

A concentração de MDA normalmente é utilizada como um marcador direto dos processos oxidativos (CHAUHAN *et al.*, 2021), já que esse é o principal produto final da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, estando associado diretamente aos danos oxidativos (PERAI *et al.*, 2014). Nesse contexto, a suplementação dietética de vitamina D associada a diferentes antioxidantes ou a vitamina K3 e antioxidantes pode potencialmente prevenir o aumento dos níveis de MDA sérico e hepático de frangos de corte, necessitando de maiores investigações sobre a eficiência do uso combinado desses aditivos sobre a peroxidação lipídica.

Além disso, no presente estudo, as rações foram formuladas à base de milho e soja, sem ingredientes que promovessem um desafio para os animais, como o uso de óleo reutilizado,

farinhas de origem animal ou engorduradas, o que pode ter limitado o efeito dos aditivos sobre o *status* oxidativo.

Alguns autores relataram que a vitamina D está associada à redução do estresse oxidativo em animais, regulando positivamente os sistemas de defesa antioxidante, incluindo glutathiona (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) (SARDAR *et al.*, 1995; GARCION *et al.*, 1990; CHOI e JUNG, 2017; ZHANG *et al.*, 2020b), além de apresentar efeito protetor contra o estresse oxidativo em humanos (EL-BOSHY *et al.*, 2019). No entanto, não foi possível verificar efeito dos tratamentos com vit. D de forma isolada ou combinada com antioxidantes e vit. K3, não havendo alterações significativas na estabilidade oxidativa, fenólicos totais e capacidade antioxidante do soro das aves nos diferentes tratamentos avaliados.

Já Ren *et al.* (2018) relataram que a suplementação de 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) e antioxidante (cantaxantina) foi eficiente para melhorar o *status* antioxidante de patos de um dia de idade, a partir da suplementação materna, o que pode estar correlacionado com a redução de danos oxidativos e de resposta inflamatória. Porém, Zhang *et al.* (2020b), ao suplementar 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) de forma isolada, para frangos de corte, não observaram efeito sobre a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante no soro, assemelhando-se com os resultados encontrados nesta pesquisa.

De maneira geral, o fígado é o local primário que ocorre biossíntese, metabolismo, depuração e desintoxicação nos animais, sendo extremamente vulnerável a diferentes tipos de estresse, incluindo o estresse oxidativo (SANCHEZ-VALLE *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2018). Segundo Surai *et al.* (2019), no sistema intensivo de criação de frangos de corte, as aves são inevitavelmente expostas a numerosos estímulos oxidativos que podem promover danos oxidativos e lesões hepáticas.

Dessa forma, Hosseini-Vashan *et al.* (2016), ao avaliar a estabilidade oxidativa do fígado de frangos de corte, observaram que a adição de antioxidante (*Curcuma longa* L.) à dieta melhorou o *status* oxidativo e a função hepática dos animais, apesar de não ter influenciado o desempenho. Todavia, neste estudo, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos para a quantidade de MDA hepático, corroborando com os resultados encontrados por Cruz *et al.* (2019).

Embora nesta pesquisa não tenha sido observado resultados significativos sobre o desempenho produtivo e o *status* oxidativo em frangos de corte, o uso combinado de vit. D, antioxidantes e vit. K3 deve ser mais amplamente investigado, uma vez que a eficiência

individual de cada aditivo pode ser influenciada pela inter-relação entre eles e por fatores ambientais, nutricionais e fisiológicos.

3.4 Conclusões

A vitamina D e suas associações com antioxidantes e/ou vitamina K3 nas doses avaliadas para suplementação dos frangos de corte além do aportado pelo suplemento vitamínico da ração não influencia o desempenho, rendimento de carcaça, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante do sangue e na estabilidade oxidativa do sangue e do fígado dos frangos de corte aos 42 dias.

4 SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D COM ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3 NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE: INCIDÊNCIA DE MIOPATIAS PEITORAIS, QUALIDADE DA CARNE E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D com antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre a incidência de miopatias peitorais, qualidade da carne, capacidade antioxidante, fenólicos totais, atividade antioxidante total e estabilidade lipídica da carne. Foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em oito rações formuladas para serem isoenergéticas e isonutritivas: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C. O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 (1836 UI/kg) e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida (0,63 mg/kg). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para qualidade da carne, fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante total e estabilidade lipídica da carne. A suplementação de vitamina D com antioxidantes e vitamina K3 não influenciou a incidência de miopatias peitorais. Conclui-se que a suplementação dos aditivos não afetou os aspectos de qualidade da carne, potencial e atividade antioxidante da carne, bem como a incidência de miopatias peitorais em frangos de corte.

Palavras-chave: colecalciferol; estabilidade lipídica; tocoferóis; vitamina K; white striping; wooden breast.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of vitamin D supplementation with antioxidants and vitamin K3 in broiler feed on the incidence of pectoral myopathies, meat quality, antioxidant capacity, total phenolics, total antioxidant activity and lipid stability of meat. A total of 768 one-day-old male chicks of the Ag Ross 308 strain were used, distributed in a completely randomized design, with eight treatments and six replications of sixteen birds each. The treatments consisted of eight feeds formulated to be isoenergetic and isonutritive: T1 – Control diet (CD); T2 – CD + Vitamin D; T3 – CD + Vitamin D + Antioxidant A; T4 – CD + Vitamin D + Antioxidant B; T5 – CD + Vitamin D + Antioxidant C; T6 – CD + Vitamin D + Vitamin K3; T7 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant B and T8 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant C. The vitamin D metabolite used was 25OHD3 (1836 IU/kg) and for vitamin K3, menadione nicotinamide bisulfite (0.63 mg/kg) was used. There was no significant difference between treatments for meat quality, total phenolics, antioxidant capacity, total antioxidant activity and lipid stability of meat. The Vitamin D supplementation with antioxidants and vitamin K3 did not negatively affect the incidence of pectoral myopathies. It was concluded that vitamin D supplementation of additives did not affect aspects of meat quality, potential and antioxidant activity of meat as well as the incidence of pectoral myopathies in broiler chickens.

Keywords: cholecalciferol; lipid stability; tocopherol; vitamin K; white striping; wooden breast.

4.1 Introdução

Nos últimos anos, o incremento nas taxas de crescimento e de rendimento em frangos de corte foi associado, muitas vezes, a modificações, ao funcionamento normal de alguns órgãos e tecidos, favorecendo o desenvolvimento de distúrbios musculares relacionados principalmente ao músculo peitoral (GRIFFIN *et al.*, 2018; SOGLIA *et al.*, 2019).

Essas alterações fisiopatológicas do tecido muscular das linhagens de frangos de corte de alto rendimento resultaram no surgimento de várias miopatias, principalmente a *wooden breast* (WB) e *46hite striping* (WS) (MAHARJAN *et al.*, 2021; CHE *et al.*, 2022), que são caracterizadas, respectivamente, pelo aumento da dureza da carne e o desenvolvimento de estrias brancas paralelas a orientação das miofibras, gerando uma condição de fibrose intersticial com acúmulo de gordura (KUTTAPPAN *et al.*, 2017; PETRACCI *et al.*, 2019).

De acordo com Zhang *et al.* (2020^a) e Lackner *et al.* (2022), a incidência de miopatias peitorais não geram apenas alterações em aspectos sensoriais da carne, mas também proporcionam deteriorações bioquímicas que comprometem o funcionamento celular. Assim, o acúmulo de metabólitos produzidos pelo músculo, devido à baixa densidade de capilares, leva ao distúrbio iônico (SAVARIS *et al.*, 2021) que gera uma condição de estresse oxidativo, promovendo alterações nas propriedades tecnológicas e de qualidade dos produtos avícolas (ZHANG *et al.*, 2020^a; LACKNER *et al.*, 2022). Além disso, os danos biológicos induzidos pelo estresse oxidativo também resultam em diversas patologias que afetam o crescimento e a saúde dos animais (ESTEVEZ, 2015; AKBARIAN *et al.*, 2016).

Como a carne do peito é um dos cortes mais valiosos da carcaça, estratégias para melhorar a qualidade e a aparência desse corte são relevantes para a indústria avícola a fim de evitar perdas econômicas associadas às condenações e rejeições por parte dos consumidores (CRUZ *et al.*, 2017). Dessa forma, a nutrição animal deve ser utilizada como uma importante estratégia para contornar a incidência de miopatias peitorais nos frangos de corte modernos e controlar os processos de deterioração, garantindo aspectos de qualidade da carne.

Nesse contexto, a utilização dietética de vitamina D e seus metabólitos torna-se essencial para o crescimento adequado de frangos de corte. A utilização dessa vitamina vem sendo amplamente estudada, pois está relacionada ao crescimento, à mineralização óssea (BELLO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2020^b), à saúde animal e ao desenvolvimento muscular (VIGNALE *et al.*, 2015), estando envolvida na síntese proteica (HUTTON *et al.*, 2014) e na redução de processos inflamatórios (FATEMI, 2021), o que pode significar influência sobre a incidência de miopatias peitorais nas aves.

De acordo com Guo *et al.* (2020), a vitamina K também pode representar um importante aditivo alimentar com ação sobre o equilíbrio ósseo/muscular de frangos de corte de crescimento rápido, no entanto, havendo a necessidade de mais estudos que visem elucidar a ação dessa vitamina sobre os aspectos de qualidade da carne, uma vez que diversos fatores podem interferir. Nesse sentido, a inter-relação das vitaminas, como as vitaminas D e K, somada à ação de antioxidantes, podem representar uma potencial estratégia para preservar a qualidade de produtos cárneos, além de favorecer a manutenção do crescimento e o controle da ocorrência de miopatias peitorais em frangos de corte (ERINLE, 2022; XIE *et al.*, 2022).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre a incidência de miopatias peitorais, qualidade da carne, fenólicos totais, capacidade antioxidante e estabilidade lipídica da carne.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Experimento com aves

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 2313300919.

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura/DZ/CCA/UFC em um galpão convencional para criação de frangos de corte, dividido internamente em 48 boxes de 1,5m x 1,0m (1,5m²), contendo bebedouros do tipo pendular e comedouros do tipo tubular.

Para a condução do experimento, foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308 com peso médio inicial de $46,5 \pm 1,16$ g, provenientes de uma granja comercial. As aves foram imunizadas para as doenças de Marek e Gumboro no incubatório.

4.2.2 Delineamento experimental

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C.

O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida.

A ração controle continha vitamina D (3750 UI/kg de ração) e vitamina K (3,75 mg/kg de ração) a partir do suplemento vitamínico (premix). Além disso, para os tratamentos que receberam concentrações superiores às recomendações convencionais para vitamina D e vitamina K, foram adicionadas quantidades extras de vitamina D (1836 UI de 25OHD3/kg de ração) e vitamina K (0,63 mg de K3/kg de ração), totalizando 5586 UI de vitamina D e 4,38 mg de vitamina K.

Os antioxidantes utilizados consistiram em três diferentes produtos comerciais: 500 mg/kg de antioxidante A (Alltech), composto por DI-alfa-tocoferol (90g/kg) e ácido cítrico (20g/kg); 150 mg/kg de antioxidante B (Kemin), composto por uma mistura de tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã e 30 mg/kg de antioxidante C (Laza Biotecnologia), composto por hidroxitolueno butilado (BHT) (100g/kg), hidroxianisol butilado (BHA) (30g/kg), etoxiquin (100g/kg), ácido cítrico (100g/kg) e ácido fosfórico (20/kg).

O programa de alimentação foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 21 dias), crescimento (21 a 35 dias) e final (35 a 42 dias). As rações experimentais (Tabela 5) foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais para frangos de corte recomendadas por Rostagno *et al.* (2011) e foram calculadas para serem isoenergéticas e isonutritivas, considerando os valores de composição dos alimentos propostos por Rostagno *et al.* (2011). O inerte da ração foi substituído conforme os tratamentos por vitamina D, vitamina K3 e antioxidantes.

As condições ambientais no interior do galpão foram monitoradas através de Data Logger (Data Logger U12-012; HOBO, Bourne, MA) instalado na altura das aves. Durante o período experimental, a temperatura média do galpão e a umidade relativa do ar foi de 29,2°C e 54,5% na fase pré-inicial, 28,3°C e 57,6% na fase inicial, 29,4°C e 59% na fase de crescimento e 29,3°C e 60,7% na fase final.

A cama de frango foi revolvida manualmente duas vezes por semana, a partir das 8h, e os ventiladores ligados durante os horários de temperaturas mais elevadas (9 às 15h), a partir dos 28 dias de idade.

Tabela 5 – Composição e valor nutricional da ração controle para frangos de corte em diferentes idades

Ingredientes (Kg)	Fases			
	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	52,55	56,31	61,13	64,37
Farelo de soja	40,49	36,90	31,76	28,53
Óleo de soja	2,30	2,77	3,37	3,49
Fosfato monobásico	1,92	1,74	1,54	1,46
Calcário calcítico	1,23	0,96	1,00	0,96
Sal comum	0,50	0,48	0,46	0,44
Suplemento mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Suplemento vitamínico ²	0,15	0,15	0,15	0,15
DL – Metionina	0,34	0,29	0,27	0,25
L – Lisina HCL	0,20	0,13	0,12	0,14
L – Treonina	0,13	0,04	0,02	0,01
Anticoccidiano	0,05	0,05	0,05	0,05
Promotor de crescimento	0,003	0,003	0,003	0,003
Inerte ³	0,07	0,07	0,07	0,07
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
Nível Nutricional Calculado				
Energia Metab. (kcal/kg)	2.975	3.050	3.150	3.200
Proteína bruta (%)	23,00	21,50	19,50	18,30
Cálcio (%)	0,96	0,81	0,78	0,74
Fósforo disponível (%)	0,48	0,43	0,39	0,37
Sódio (%)	0,22	0,21	0,18	0,19
Lisina digestível Aves (%)	1,28	1,15	1,02	0,96
Metionina + cistina digestível Aves (%)	0,95	0,87	0,80	0,75
Metionina digestível Aves (%)	0,64	0,58	0,45	0,49
Treonina digestível Aves (%)	0,86	0,77	0,68	0,64
Vitamina D (UI/Kg)	3.750	3.750	3.750	3.750
Vitamina K (mg/Kg)	3,75	3,75	3,75	3,75

¹Composição por kg do produto: Ferro 100.000,00 mg; cobre 20.000,00 mg; Manganês 130.000,00 mg; Zinco 130.000,10 mg; Iodo 2.000,00 mg; ²Composição por kg do produto: Vit. A 9.000.000,00 UI; Vit. D3 2.500.000,00 UI; Vit. E 20.000,00 UI; Vit. K3 2.500,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 6.000,00 mg; Vit. B6 3.000,38 mg; Vit. B12 15,00 mg; Ácido fólico 1.500,00 mg; ácido nicotínico 35000 mg; Ácido pantotênico 12.000,00 mg; Biotina 100mg; Selênio 250,00 mg; ³Inerte: Areia lavada.

4.2.3 Avaliação da incidência de miopatias peitorais

Aos 42 dias todas as aves foram pesadas e foram selecionadas 2 aves de cada unidade experimental, com peso vivo mais próximo do peso médio da parcela, totalizando 96 frangos de corte. As aves selecionadas foram insensibilizadas através de eletronarcose, seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração. Em seguida, foi realizado o corte para a retirada do peito inteiro para a avaliação da incidência de miopatias peitorais.

As miopatias avaliadas foram *white striping* (WS) e *wooden breast* (WB), sendo classificadas a partir de avaliação visual e palpação do músculo peitoral maior.

Uma pessoa treinada avaliou individualmente cada músculo peitoral estabelecendo graus de severidade (0 – normal, sem presença de linhas brancas; 1 – moderado, linhas brancas paralelas às fibras musculares com espessura < 1 mm; 2 – severo, linhas brancas paralelas às fibras musculares com espessura entre 1 e 2 mm; 3 – extremo, linhas brancas paralelas às fibras musculares com espessura > 2 mm) conforme descrito por Albrecht *et al.* (2019) e Petracci *et al.* (2019).

A incidência de WB foi avaliada de acordo com o aparecimento de áreas endurecidas e pontos hemorrágicos segundo metodologia descrita por Petracci *et al.* (2019), na qual também foram estabelecidos graus de severidade (0 – normal, tecido completamente maleável, 1 – moderado, presença suave de regiões endurecidas; 2 – severo, presença de grandes áreas endurecidas e/ou palidez; 3 – extremo, tecido completamente firme e/ou presença de pontos hemorrágicos e exsudato).

4.2.4 Avaliação da qualidade da carne

Após a avaliação da incidência de miopatias peitorais, os peitos inteiros de cada ave foram selecionados para serem divididos ao meio e desossados. Cada metade foi embalada a vácuo, em sacos plásticos, devidamente identificados. De cada ave foram obtidas duas porções de peito, totalizando quatro porções por repetição (2 aves por parcela). As duas metades de peito esquerdas de cada parcela foram utilizadas para determinar a qualidade da carne e as metades direitas foram usadas para determinar o valor de fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante e estabilidade lipídica da carne.

As variáveis de qualidade de carne avaliadas foram cor, pH, perda por gotejamento (%), perda de água por cocção (%) e força de cisalhamento (kgf/cm²).

As medidas de coloração da carne foram avaliadas na face ventral do filé do peito, em três pontos diferentes de leitura por amostra, utilizado o colorímetro digital Minolta (CR-400; Minolta Camera Co, Osaka, Japão). Os resultados foram expressos em L* (luminosidade), a* (componente vermelho – verde), b* (componente amarelo – azul) do sistema de cor CIELAB.

O pH da carne foi medido utilizando um peagâmetro (Sentron 1001 pH System, Roden, Holanda), calibrado em pH 4,0 e pH 7,0, a partir da inserção do eletrodo em três diferentes pontos de coleta na carne do peito, 24h após o abate.

A perda por gotejamento foi determinada de acordo com Wang *et al.* (2017), em que uma amostra de carne do peito foi pesada e acondicionada de forma suspensa em copos, cobertos com filme plástico a 4°C por 24h. Após esse período, as amostras foram novamente

pesadas e foi calculada a perda por gotejamento a partir da diferença entre o peso inicial e o peso final.

As perdas de água por cocção foram determinadas segundo Cason *et al.* (1997), em que amostras de peito foram cortadas de forma cilíndrica, com aproximadamente 1,5cm de diâmetro. Essas amostras foram pesadas, identificadas, acondicionadas em sacos plásticos, seladas e submetidas a cozimento em banho-maria a 85°C por 25min. Após esse procedimento, as amostras foram retiradas do banho-maria, resfriadas em temperatura ambiente, desembaladas e pesadas novamente. A diferença entre o peso inicial e o peso final das amostras correspondeu às perdas durante a cocção.

Para avaliação da força de cisalhamento, as amostras cozidas provenientes da perda de água por cocção foram submetidas a um analisador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido), acoplado a uma lâmina Warner-Bratzler (G-R Electrical Manufacturing Company, Manhattan-KS, USA). As amostras foram cortadas perpendicularmente à orientação das fibras musculares segundo metodologia de Lyon *et al.* (1998), determinando-se a força máxima (kgf/cm²) necessária para o cisalhamento.

4.2.5 Avaliação dos fenólicos totais, capacidade antioxidante (DPPH), atividade antioxidante (ABTS) e estabilidade lipídica da carne (TBARS)

Para a avaliação dos fenólicos totais, capacidade antioxidante e atividade antioxidante da carne do peito, uma amostra de 5g de carne foi homogeneizada em 15ml de água destilada e depois centrifugada a 1500g por 2min. Em seguida, 9ml de clorofórmio foram adicionados à amostra para separar os lipídios (JANG *et al.*, 2008), e o sobrenadante foi usado para determinar os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total.

Os fenólicos totais foram determinados seguindo a metodologia de Singleton *et al.* (1999) com adaptações, utilizando o método Folin-Ciocalteu. A quantificação foi feita com base em uma curva padrão gerada usando ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por grama de carne (mgEqAG/g carne).

A capacidade antioxidante da carne foi avaliada pela porcentagem de captura de radicais livres do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958). Foi removido o sobrenadante (100µl), ao qual foi adicionado 400µl de água destilada e 500µl de solução metanólica de radical livre DPPH (0,2mM). A mistura foi agitada em vórtex e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Um tubo contendo 500µl de água destilada e 500µl de solução de metanol de radical livre DPPH (0,2mM) serviu como controle. A absorbância da solução foi medida a 517nm. A porcentagem de captura de radicais livres DPPH

foi obtida a partir da seguinte equação: Atividade de captura= $[1 - (\text{teste de abs}/\text{controle de abs})] \times 100$.

A atividade antioxidante total foi obtida pela porcentagem de captação de radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico) (ABTS)^{°+} (RE *et al.*, 1999). O teste ABTS é um método caracterizado pelo sequestro do radical ABTS^{°+}+cátions por antioxidantes presentes em um composto antioxidante, sendo um método indireto com boa estabilidade semelhante ao teste DPPH. Uma alíquota de 10µl de sobrenadante foi adicionada a 1ml da solução diluída ABTS^{°+}+radical a 30°C e a absorbância foi lida exatamente 6min após a mistura inicial. A porcentagem de inibição de absorbância do branco (0,70±0,02) foi calculada para cada amostra. Para o cálculo do potencial antioxidante, foi aplicada a mesma equação utilizada para o cálculo da captura de radicais livres do DPPH: Atividade de captura= $[1 - (\text{teste de abs}/\text{controle de abs})] \times 100$.

A estabilidade lipídica da carne foi avaliada conforme metodologia descrita por Cherian *et al.* (2002), com adaptações, a partir da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Alíquotas de 2g de carne foram homogeneizadas com 6,75ml de ácido perclórico 3,86% e 18,75µl de BHT 4,5%. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10min a 4°C e filtradas em papel filtro. Do sobrenadante, 1ml foi retirado e 1ml de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (20mM) foi adicionada e incubada em banho-maria a 95°C por 30min. A reação foi interrompida em banho de gelo e a absorbância em 531nm foi determinada usando um espectrofotômetro (Femto® 700 Plus, FEMTO Indústria e Comércio de Instrumentos, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de malondialdeído (MDA) por g de carne.

4.2.6 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *Statistical Analyses Sistem*. Os dados obtidos para qualidade da carne, fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante total e estabilidade lipídica da carne foram analisados procedimento ANOVA, segundo modelo inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância, quando os efeitos dos tratamentos foram significativos para as diferentes variáveis avaliadas ($P < 0,05$). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de *Student–Newman–Keuls* a 5% de probabilidade.

Para a incidência de miopatias peitorais a análise estatística dos dados de escores de avaliação para WS e WB foi realizada usando o teste do quiquadrado.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Incidência de miopatias peitorais

A incidência de miopatias peitorais a partir dos escores de avaliação de WS pode ser observada na Tabela 6. Não houve diferença entre os tratamentos recebidos pelos frangos de corte ($P>0,05$) para a presença dessa miopatia. Já os escores de avaliação de WB podem ser observados na Tabela 7, na qual a suplementação de vitamina D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3 não influenciou a frequência de aparecimento de WB no peito das aves, independente dos escores de avaliação (0 – normal, 1 – moderado, 2 – severo, 3 – extremo).

Tabela 6 – Escores de avaliação para *white striping* (WS) em frangos de corte alimentados com rações contendo vit. D, isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Escore de avaliação							
	0 – normal		1 – moderado		2 – severo		3 – extremo	
	N ⁸	% ⁹	N	%	N	%	N	%
RC ¹	3	16,67	10	55,56	4	22,22	1	5,56
RC + Vit.D ²	7	38,89	8	44,44	3	16,67	0	0,00
RC + Vit. D + Ant. A ³	4	22,22	10	55,56	3	16,67	1	5,56
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	5	27,78	7	38,89	6	33,33	0	0,00
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	4	22,22	9	50,00	4	22,22	1	5,56
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	2	11,11	9	50,00	4	22,22	3	16,67
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	2	11,11	14	77,78	1	5,56	1	5,56
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	6	33,33	9	50,00	2	11,11	1	5,56
Total	33	22,92	76	52,78	27	18,75	8	5,56
Efeitos – ANOVA ⁷	<i>p – valor</i>							
Tratamento	0,5937		0,8700		0,6991		0,9140	

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicolecalciferol; ³Ant. A – DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfito de nicotinamida; ⁷ANOVA – Análise de variância ($P>0,05$): Efeito estatístico não significativo; ⁸N. – Número de amostras por escore; ⁹% – Porcentagem de amostra por escore.

Para a frequência de ocorrência de estrias brancas, foi observada uma maior proporção de amostras identificadas com escore de avaliação 1 (moderado), que já caracteriza a presença de WS, independente do tratamento avaliado. Também foi observado que 77,1% das amostras de peito avaliadas apresentaram escores para WS de moderado ao extremo.

Tabela 7 – Escores de avaliação para *wooden breast* (WB) em frangos de corte alimentados com rações contendo vit. D isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Escores de avaliação							
	0 – normal		1 – moderado		2 – severo		3 – extremo	
	N ⁸	% ⁹	N	%	N	%	N	%
RC ¹	9	50,00	7	38,89	1	5,56	1	5,56
RC + Vit.D ²	7	38,89	10	55,56	0	0,00	1	5,56
RC + Vit. D + Ant. A ³	6	33,33	11	61,11	0	0,00	1	5,56
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	6	33,33	7	38,89	3	16,67	2	11,11
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	6	33,33	11	61,11	0	0,00	1	5,56
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	5	27,78	9	50,00	1	5,56	3	16,67
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	7	38,89	10	55,56	0	0,00	1	5,56
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	8	44,44	9	50,00	1	5,56	0	0,00
Total	54	37,50	74	51,39	6	4,17	10	6,94
Efeitos – ANOVA ⁷	<i>p</i> – valor							
Tratamento	0,9744		0,9656		0,9029		0,9013	

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicolecalciferol; ³Ant. A – D α -alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfato de nicotinamida; ⁷ANOVA – Análise de variância (P>0,05); Efeito estatístico não significativo; ⁸N. – Número de amostras por escore; ⁹% – Porcentagem de amostra por escore.

Para *wooden breast*, também foi observada uma maior frequência de peitos acometidos com escore de avaliação moderado. No entanto, as aves alimentadas com RC apresentaram uma maior incidência de peitos em condição considerada normal, porém, não diferindo significativamente dos demais tratamentos.

De maneira geral, frangos de corte que apresentam maior hipertrofia e um maior rendimento de carne de peito podem apresentar uma maior susceptibilidade as miopatias peitorais, prejudicando aspectos de qualidade da carne (RADAELLI *et al.*, 2017; CORDOVA-NOBOA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o uso de alguns aditivos, como os metabólitos da vitamina D, podem atuar favorecendo o crescimento e o desenvolvimento muscular das aves, principalmente do músculo peitoral (HUTTON *et al.*, 2014; VIGNALE *et al.*, 2015), além de também influenciar na deposição de gordura e na composição corporal (BHAT *et al.*, 2014), o que pode favorecer a incidência de miopatias peitorais. Todavia, como não foi observada diferença significativa entre as aves que receberam RC ou RC + vit. D, pode-se inferir que o uso de 25OHD3 não influenciou no aparecimento de WS e WB em frangos de corte, uma vez que não potencializou o crescimento e o desenvolvimento do músculo peitoral desses animais a ponto de favorecer o aparecimento de miopatias.

Diaz (2018) também não verificou efeito do metabólito $1\alpha\text{OHD}_3$ (4000 UI/kg de ração) para frangos de corte sobre a incidência de miopatias peitorais do tipo WS e WB. Todavia, Ribeiro *et al.* (2020) obtiveram resultados favoráveis utilizando 25OHD_3 (2760 UI/kg de ração) sobre a integridade das fibras musculares em frangos de corte acometidos por WS. No entanto, esses autores ressaltaram que além de fatores nutricionais, componentes genéticos, saúde animal e fatores ambientais podem estar envolvidos na ocorrência de miopatias e que os efeitos da suplementação de vit. D também podem ser muito variáveis, uma vez que diversos fatores podem interferir, tais como a disponibilidade de nutrientes da dieta, a inter-relação entre eles, o tipo de metabólito de vit. D utilizado, a concentração, o ambiente, a condição em que o animal se encontra, dentre outros.

De acordo com Fatemi *et al.* (2021), uma menor incidência de WB está associada a aves que apresentam um menor rendimento de peito, porém o uso 25OHD_3 *in ovo* (96 UI/ 50 μL de diluente) pode proporcionar menores escores de WB extremo em frangos de corte ao atingirem 41 dias de idade, significando uma redução das respostas inflamatórias com o uso de vitamina D, o que não foi observado no presente estudo com a suplementação dietética de 25OHD_3 .

De maneira geral, alterações ao metabolismo parecem estar relacionadas aos distúrbios metabólicos, às complicações musculares e neurológicas, ao envelhecimento celular e às doenças neuromusculares (CÓRDOVA-NOBOA *et al.*, 2018). Dessa forma, danos oxidativos podem estar diretamente associados à maior incidência de miopatias peitorais e consequentemente, qualquer falha ao sistema antioxidante, pode contribuir para o aparecimento de miopatias que ocorrem nas linhagens atuais de frangos de corte (BAILEY *et al.*, 2015).

Nesse aspecto, o uso de antioxidantes na dieta de frangos de corte pode significar uma alternativa ao controle da incidência de miopatias peitorais, uma vez que as causas para o aparecimento de WS e WB ainda são controversas. Todavia há indícios que as miopatias peitorais podem ser resultantes de uma condição de hipóxia, devido a uma alta demanda metabólica e circulatória dos frangos de corte (BOERBOOM *et al.*, 2018), o que resulta no acúmulo de resíduos metabólicos, como os radicais livres que favorecem o aparecimento de lesões nas células e tecidos, como as miopatias (KUTTAPPAN *et al.*, 2021). No entanto, o uso de diferentes antioxidantes, associados à vit. D ou às vitaminas D e K3, não demonstraram efeito protetor sobre as fibras musculares, não influenciando na incidência de WS e WB nos frangos de corte.

Além disso, diferindo do que foi encontrado no presente estudo, os antioxidantes podem apresentar ação sobre o músculo peitoral, uma vez que os peitos acometidos com

miopatias apresentam genes envolvidos no estresse oxidativo e marcadores de oxidação proteica que podem ter sua expressão controlada pela ação dos antioxidantes (MUTRYN *et al.*, 2015; BODLE *et al.*, 2018; GRATTA *et al.*, 2019).

Kuttappan *et al.* (2021) relataram que a inclusão de antioxidante dietético (etoxiquina) não influenciou a incidência de WB quando as aves não foram submetidas a um desafio de gordura oxidada e estresse térmico. No entanto, quando as aves foram expostas a uma dieta contendo gordura oxidada, a utilização de antioxidante nas rações reduziu significativamente a incidência de WB severo. Já Bodle *et al.* (2018) observaram que a inclusão de vitamina C reduziu a presença de WB no nível severo, havendo uma melhora na incidência de peitos com escores de avaliação normal e moderado, assemelhando-se com o que foi encontrado no presente estudo, em que a inclusão de antioxidantes melhorou a incidência de músculos peitorais considerados normais, todavia, não diferindo significativamente dos demais tratamentos.

4.3.2 Qualidade da carne

Em relação às variáveis de qualidade de carne, a adição de vitamina D, vitamina K e antioxidantes na dieta das aves não influenciou o pH, a cor da carne, a capacidade de retenção de água e a força de cisalhamento (Tabela 8).

Os resultados obtidos no estudo corroboram com os encontrados por Zhang *et al.* (2020b), visto que a vitamina D na forma de 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) adicionada à ração controle, com níveis adequados de cálcio e fósforo, não influenciou os valores de pH, coloração da carne e perda por gotejamento.

Apesar de estudos recentes sugerirem que a 25OHD3 afeta a hipertrofia do músculo esquelético por atuar sobre a composição e o tamanho das fibras musculares (HUTTON *et al.*, 2014; VIGNALE *et al.*, 2015), podendo influenciar na cor e as características sensoriais da carne (BOZKURT *et al.* 2017; ZHANG *et al.*, 2020b), no presente estudo, não foi possível observar relação entre a suplementação de metabólito de vitamina D na dieta e a qualidade da carne.

Segundo Montgomery *et al.* (2000), a vitamina D está envolvida diretamente no metabolismo do cálcio e na ativação de calpaínas e outras proteases cálcio-dependentes que atuam diretamente no processo de amaciamento da carne, interferindo na maciez, na cor, na textura e na capacidade de retenção de água, uma vez que essas proteases agem sobre as ligações das fibras musculares (GARCIA *et al.*, 2013) e podem ser influenciadas pelo fluxo de cálcio e alterações promovidas pela vitamina D.

Tabela 8 – Qualidade da carne de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada, a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados						
	pH	Cor ⁹			PG ¹⁰ (%)	PC ¹¹ (%)	FC ¹² (kgf)
		L*	a*	b*			
RC ¹	5,89	48,31	12,14	10,24	2,16	32,82	4,67
RC + Vit.D ²	5,83	47,80	13,10	10,42	2,08	30,00	4,84
RC + Vit. D + Ant. A ³	5,84	49,41	12,38	12,06	2,01	31,75	4,74
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	5,83	49,85	13,48	11,06	2,57	34,92	3,82
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	5,86	50,77	13,14	11,18	2,16	31,27	3,98
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	5,88	50,32	12,72	10,25	2,27	32,75	4,97
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	5,86	50,46	11,32	12,64	2,20	32,87	4,72
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	5,79	48,89	13,20	11,67	2,21	33,50	4,66
Média	5,85	49,46	13,23	11,16	2,21	32,48	4,52
CV ⁷ (%)	1,48	5,77	12,71	13,69	29,07	10,42	23,66
Efeitos - ANOVA ⁸	p – valor						
Tratamentos	0,5813	0,5698	0,4634	0,1000	0,8932	0,3510	0,5489

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicolecalciferol; ³Ant. A – DI-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfito de nicotinamida; ⁷CV – Coeficiente de variação; ⁸ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo; ⁹Parâmetros de cor (L* intensidade de luminosidade; a* intensidade de vermelho; b* intensidade de amarelo); ¹⁰Perda de água por gotejamento; ¹¹Perda de água por cocção; ¹²Força de cisalhamento.

A forma ativa da vitamina D estimula um maior transporte e absorção de cálcio no músculo esquelético, assim, a suplementação dessa vitamina em dietas de animais pode influenciar positivamente a maciez da carne (MONTGOMERY *et al.*, 2000; NOOR *et al.*, 2016). Todavia, a suplementação de vit. D, de forma isolada ou associada a outros aditivos, não foi eficiente para estimular o processo de amaciamento da carne de frangos no estudo, uma vez que os valores de força de cisalhamento foram semelhantes para todos os tratamentos, concordando com outras pesquisas (GARCIA *et al.*, 2013; FARIAS *et al.*, 2019; BONAMIGO *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2022).

Outro aspecto importante é que o processo de oxidação muscular também pode atuar sobre as enzimas de degradação de proteínas musculares após a morte dos animais (ROWE *et al.*, 2004), inibindo reversivelmente as atividades das enzimas de degradação e, em seguida, reduzindo a sensibilidade do músculo. Assim, aspectos de qualidade da carne estão relacionados diretamente à capacidade antioxidante e a melhora dessa propriedade pode interferir na qualidade dos produtos cárneos (GUO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017). Porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada neste estudo entre os tratamentos sem

antioxidantes (tratamentos 1, 2 e 6) e os tratamentos com RC + antioxidantes + vit. D ou RC + antioxidantes + vit. D + vit. K3, não havendo uma correlação dos aditivos no processo de amaciamento da carne.

Em geral, o encolhimento das fibras musculares é causado pela diminuição do pH, o que aumenta a perda de líquido e a reflexividade de luz na carne (GARCIA *et al.*, 2013), afetando assim a maciez (JUDGE *et al.* 1981). Essa condição é favorecida pela desnaturação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, que aumentam a suscetibilidade a reações oxidativas e favorecem a perda excessiva de exsudato, comprometendo propriedades funcionais da carne, além de influenciar a intensidade de luminosidade (MAGANHINI *et al.*, 2007; BARBUT *et al.*, 2007).

Dessa forma, apesar dos tratamentos com RC + Vit. D (tratamento 2) e RC + Vit. D + DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico (tratamento 3) apresentarem uma menor perda de água por gotejamento e uma menor perda de água por cocção em relação ao tratamento 1 (apenas RC), não houve diferença estatística significativa entre eles, assemelhando-se aos resultados encontrados com o uso de vit. D, antioxidantes e vit. K3, associados ou não, na alimentação animal (DUFFY *et al.*, 2018; FARIAS *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020; BONAMIGO *et al.*, 2022).

O grau e a taxa de declínio do pH no músculo, pós morte, também pode influenciar diretamente a cor, a maciez, o sabor, a capacidade de retenção de água e o período de armazenamento da carne (GAO *et al.*, 2022). Os valores de pH do músculo estão associados normalmente à taxa de glicólise (ENGLAND *et al.*, 2014) e uma rápida diminuição desse pH após a morte, enquanto a temperatura da carcaça permanece elevada, significa um aumento dessa taxa, podendo caracterizar carnes do tipo pálidas, moles e exsudativas (PSE), que apresentam oxidação 42% maior do que carnes normais (MAGANHINI *et al.*, 2007). Todavia, os valores de pH encontrados neste estudo, independente dos tratamentos avaliados, estão dentro da faixa considerada normal, mantendo adequadamente os aspectos de qualidade da carne.

A coloração da carne é outro indicador importante para avaliar a qualidade sensorial, sendo um dos critérios determinantes na escolha do consumidor (WANG *et al.*, 2017), estando relacionada ao pH do músculo e à taxa de oxidação da mioglobina (CHENG *et al.*, 2007). De acordo com O'Grady *et al.* (2001), como as reações oxidativas continuam após o abate, os radicais livres produzidos podem oxidar o átomo de ferro ou causar desnaturação da molécula de mioglobina, afetando negativamente a cor da carne e a qualidade dos produtos cárneos.

Nesse contexto, a cor da carne depende principalmente da oxidação e da reflexão da luz, o que evidencia que o acúmulo de substâncias antioxidantes pode aumentar a estabilidade da cor dos produtos avícolas (FAUSTMAN e CASSENS, 1990), afetando os parâmetros de coloração e consequentemente, de qualidade da carne. Porém, no presente estudo, os tratamentos com suplementação de vit. D ou vit. D combinada à vit. K3, associados ou não a antioxidantes, não foram capazes de influenciar significativamente o pH e a cor da carne de frangos de corte, corroborando com diversos estudos que também não verificaram a influência desses aditivos, combinados ou não, sobre o pH e a coloração da carne (RYU *et al.*, 2005; FARIAS *et al.*, 2019; TIZZIANI *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2022).

Embora não tenha sido possível observar diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis de qualidade da carne avaliadas nesta pesquisa, os resultados indicam que o uso combinado dos aditivos não proporciona prejuízos a aspectos físicos e de qualidade de carne, podendo estas serem bem aceitas pelos consumidores.

4.3.3 Fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante e estabilidade lipídica da carne

A quantidade de fenólicos totais, a capacidade antioxidante, a atividade antioxidante e a estabilidade lipídica da carne não foram influenciados significativamente pela suplementação de vit. D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3 na dieta dos frangos de corte (Tabela 9).

De maneira geral, os eventos oxidativos que ocorrem durante a transformação do músculo em carne afetam diretamente sua qualidade e podem ser retardados por aditivos que são incorporados à carne através da dieta (HANCZAKOWSKA *et al.*, 2015).

Os antioxidantes são aditivos que são amplamente utilizados na indústria com o objetivo de minimizar os processos oxidativos decorrentes de atividades metabólicas naturais que quando não controladas danificam biomoléculas importantes, especialmente em alimentos musculares (ZHANG *et al.*, 2021b). Além disso, essas reações oxidativas ainda podem continuar no músculo e no tecido adiposo após o abate, sendo uma das principais causas da deterioração da qualidade durante o processamento e armazenamento da carne e dos produtos cárneos (DELLES *et al.*, 2014).

Segundo Kim *et al.* (2012), o processo de peroxidação causada por altos níveis de radicais livres pode não apenas induzir o estresse oxidativo e aumentar o teor de malondialdeído (MDA) na carne, como também pode causar deterioração da mesma, depreciando aspectos sensoriais, prejudicando a vida útil e a aceitabilidade dos produtos cárneos pelos consumidores.

Tabela 9 – Fenólicos totais, capacidade antioxidante, atividade antioxidante total e estabilidade oxidativa da carne de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vit. D, isolada ou associada, a antioxidantes e vit. K3.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados			
	Fenólicos totais (mgEqAG ⁹ /g)	DPPH (%)	ABTS (%)	TBARS (mgMD ¹⁰ /g)
RC ¹	3,99	48,42	61,69	0,36
RC + Vit.D ²	3,63	49,24	61,92	0,43
RC + Vit. D + Ant. A ³	3,70	45,55	63,09	0,37
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	3,63	46,84	61,58	0,43
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	3,80	45,91	61,46	0,40
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	3,90	42,10	60,82	0,43
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	3,73	42,27	62,73	0,36
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	3,99	44,56	62,81	0,39
Média	3,80	45,61	62,01	0,40
CV ⁷ (%)	12,56	13,95	6,02	13,08
Efeitos - ANOVA ⁸		<i>p – valor</i>		
Tratamentos	0,7689	0,4460	0,9634	0,0853

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicoлекаliferol; ³Ant. A – DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfito de nicotinamida; ⁷CV – Coeficiente de variação; ⁸ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo; ⁹EqAG – Equivalente de ácido gálico; ¹⁰MDA – Malondialdeído.

Quando se avaliou a estabilidade oxidativa da carne do peito com adição de vit. D associada a antioxidantes ou a vit. K3 e antioxidantes não foi observado efeito significativo. Porém, a utilização de antioxidantes pode representar um potencial controle aos danos oxidativos, uma vez que não houve nenhum prejuízo em relação à estabilidade oxidativa da carne e, conseqüentemente, à rancificação das amostras a ponto de interferir na qualidade das mesmas. Além disso, nas rações experimentais, não foram utilizados ingredientes que promovessem desafio oxidativo, como óleo reutilizado ou farinhas engorduradas, a ponto de comprometer a estabilidade oxidativa dos animais e dos produtos cárneos.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Bonamigo *et al.* (2022), em que os autores não observaram diferença significativa na oxidação lipídica da carne do peito de frangos alimentados tanto com dieta controle quanto suplementados com antioxidante e 25OHD3 (2760 UI/kg de ração), a partir da avaliação dos valores de MDA. No entanto, Lahucky *et al.* (2007), ao avaliar o uso de vitamina D3 (5000 UI/ kg de ração) sobre a estabilidade oxidativa em suínos, verificaram a eficiência dessa vitamina em melhorar o status antioxidante no músculo do lombo, mantendo a qualidade da carne e da gordura, prolongando assim o tempo de prateleira do produto.

Outro aspecto importante é que a vitamina K está relacionada a reações de carboxilação fundamentais ao organismo (FERLAND, 2012; YAKOVIICHUK *et al.*, 2018). Porém, de acordo com Yakoviichuk *et al.* (2021), a importância dessa vitamina vai além do processo de coagulação sanguínea e de metabolismo ósseo, podendo estar relacionada também a alterações na composição de ácidos graxos em tecidos musculares de gansos, promovendo uma possível redução dos danos oxidativos. Além disso, a menadiona e seus derivados estão associados a uma atividade anti-inflamatória, suprimindo processos inflamatórios (OHSAKI *et al.*, 2010) que pode significar uma redução do estresse fisiológico.

A capacidade e atividade antioxidante em eliminar radicais livres é avaliada a partir dos valores de DPPH e ABTS, em que quanto maior a taxa de eliminação desses radicais, mais forte é a capacidade antioxidante e maiores são os valores encontrados de DPPH e ABTS (KUMAR *et al.*, 2020). Gao *et al.* (2022) não verificaram a influência da vitamina D3 sobre a capacidade antioxidante do peito da carne de frango, sendo esse resultado semelhante ao encontrado neste estudo. Todavia, para os dados de MDA, os autores observaram que uma maior adição de vitamina D3 (5000 UI/kg de dieta) promoveu uma maior estabilidade oxidativa quando comparada a uma menor suplementação dessa vitamina (3000 UI/kg de dieta), mesmo essa suplementação sendo inferior à encontrada neste trabalho (5586 UI/ kg de ração).

Os valores de fenólicos totais da carne não diferiram significativamente com os tratamentos (Tabela 9), demonstrando que a atividade antioxidante total se manteve com a adição de vitamina D, de forma isolada ou associada a antioxidantes e vitamina K3, não havendo o declínio da quantidade desses compostos com o a suplementação dos aditivos.

Os compostos fenólicos são capazes de desempenhar atividade antioxidante a partir da inativação de radicais livres nos compartimentos celulares (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Contudo, a adição de diferentes antioxidantes (tocoferóis, extratos vegetais e antioxidantes sintéticos) não foi suficiente para aumentar a capacidade antioxidante total da carne do peito, bem como melhorar a ação de enzimas envolvidas no sistema antioxidante. Resultados semelhantes foram obtidos por FARIAS *et al.* (2019), que verificaram que a adição de extrato vegetal e antioxidante sintético para frangos de corte não promoveu o aumento nos valores de fenólicos totais e na atividade antioxidante total na carne.

4.4 Conclusões

A vitamina D e suas associações com antioxidantes e/ou vitamina K3 nas doses avaliadas para a suplementação dos frangos de corte além do aportado pelo suplemento

vitamínico da ração não promove benefícios sobre a incidência das miopatias peitorais e dos aspectos de qualidade e estabilidade oxidativa da carne de frangos de corte.

5 QUALIDADE ÓSSEA E SÍNDROME DO OSSO NEGRO EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D, ANTIOXIDANTES E VITAMINA K3

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D com antioxidantes e vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre a qualidade óssea e a incidência da síndrome do osso negro. Foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em oito rações formuladas para serem isoenergéticas e isonutritivas: Os tratamentos consistiram em oito rações formuladas para serem isoenergéticas e isonutritivas: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C. O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 (1836 UI/kg) e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida (0,63 mg/kg). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a incidência da síndrome do osso negro, comprimento, densidade, resistência, matéria seca e matéria mineral da tíbia. Conclui-se que a suplementação de vitamina D associada a antioxidantes e vitamina K3 não afeta a qualidade óssea e a incidência da síndrome do osso negro.

Palavras-chave: 25-hidroxicolecalciferol; deformidade ósseo; escurecimento de carne; estabilidade oxidativa; tíbia; vitamina K.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of vitamin D supplementation with antioxidants and vitamin K3 in broiler feed on the bone quality and the incidence of black bone syndrome. A total of 768 one-day-old male chicks of the Ag Ross 308 strain were used, distributed in a completely randomized design, with eight treatments and six replications of sixteen birds each. The treatments consisted of eight feeds formulated to be isoenergetic and isonutritive: T1 – Control diet (CD); T2 – CD + Vitamin D; T3 – CD + Vitamin D + Antioxidant A; T4 – CD + Vitamin D + Antioxidant B; T5 – CD + Vitamin D + Antioxidant C; T6 – CD + Vitamin D + Vitamin K3; T7 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant B and T8 – CD + Vitamin D + Vitamin K3 + Antioxidant C. The vitamin D metabolite used was 25OHD3 (1836 IU/kg) and for vitamin K3, menadione nicotinamide bisulfite (0.63 mg/kg) was used. There was no significant difference among treatments for the incidence of black bone syndrome, length, density, strength, dry matter and mineral matter of the tibia. It is concluded that vitamin D supplementation associated with antioxidants and vitamin K3 does not affect bone quality and the incidence of black bone syndrome.

Keywords: 25-hydroxycholecalciferol; bone deformity; meat browning; oxidative stability; tibia; vitamin K.

5.1 Introdução

A avicultura de corte vem passando por transformações significativas resultante de uma alta demanda por carne de frango e melhores índices de produção e qualidade dos produtos avícolas (MOTA *et al.*, 2019). Para atender essa demanda e aumentar a rentabilidade, o setor avícola investiu na seleção de linhagens genéticas que apresentem maior taxa de crescimento em um curto período de tempo.

Nesse sentido, a busca pelo rápido crescimento das aves desencadeou o surgimento de distúrbios fisiológicos associados a desordens ao sistema locomotor (TOSCANO *et al.*, 2013), à incidência de deformação e fragilidades ósseas (RATH *et al.*, 2000) e a uma condição de estresse metabólico (YANG *et al.*, 2019), que podem influenciar negativamente o tecido muscular, e, conseqüentemente, a qualidade da carne destes animais.

A síndrome do osso negro, também conhecida como *black bone syndrome* (BBS), pode ser considerada uma consequência ao desequilíbrio ósseo promovido pela elevada taxa de crescimento dos frangos de corte. Essa síndrome é caracterizada pelo extravasamento de sangue da medula óssea para a carne, ocorrendo principalmente na região da tíbia e do fêmur quando o osso está frágil ou poroso (WHITEHEAD, 2010; BALDO, 2018), o que resulta em uma carne de aparência e textura pouco apetitosa (BALDO *et al.* 2013).

Somado a isso, Vasquez e Soto-Salanova (2009) e Korver (2010) também evidenciam que a BBS pode resultar em um aumento de agentes pró-oxidantes nos tecidos, reduzindo assim a estabilidade oxidativa e o tempo de prateleira de carne *in natura* e processada, comprometendo além de aspectos sensoriais, também a segurança alimentar do consumidor.

Nesse contexto, a suplementação de algumas vitaminas na alimentação de frangos de corte associada a uma dieta equilibrada, visando a menor incidência de distúrbios fisiológicos relacionados ao sistema locomotor, pode ser considerada uma importante estratégia para contornar a problemática que envolve o rápido crescimento das aves. Dessa forma, além do desempenho, novos parâmetros estão sendo avaliados para determinar a eficiência de aditivos, como as vitaminas e os antioxidantes, sobre o crescimento dos frangos de corte modernos (MOTA *et al.*, 2019).

A vitamina D desempenha um papel importante na absorção de cálcio e fósforo e, portanto, pode apresentar ação efetiva sobre a qualidade óssea (ŚWIĄTKIEWICZ *et al.*, 2017). Segundo Whitehead (2010) e Mota *et al.* (2019), o uso de níveis elevados dessa vitamina na dieta das aves pode ser relacionado a uma menor incidência de síndrome do osso negro e de

deformidades ósseas. Além disso, a suplementação de outros aditivos combinados à vitamina D, como a vitamina K3 e os antioxidantes, também pode apresentar ação efetiva sobre o processo de mineralização óssea (LOMBARDI *et al.*, 2015) e estabilidade oxidativa (MELO *et al.* 2020).

Para Booth *et al.* (2013), quando a vitamina K é suplementada considerando diretamente o crescimento dos animais, acima dos valores de referência, que visam principalmente o processo de coagulação sanguínea, pode ocorrer um maior estímulo na formação da matriz orgânica óssea. Esse fato, conseqüentemente, favorece o processo de mineralização, o que pode significar uma diminuição no aparecimento de distúrbios fisiológicos ligados ao sistema locomotor e uma maior estabilidade oxidativa dos tecidos.

Ademais, de acordo com Abioja *et al.* (2012), Melo *et al.* (2020) e Bonamigo *et al.* (2022), a adição de antioxidantes dietéticos para frangos de corte também tem sido relatada como uma importante estratégia para reduzir os efeitos do estresse oxidativo associados a problemas relacionados à qualidade óssea, uma vez que é cada vez mais frequente o aparecimento de distúrbios fisiológicos, como a síndrome do osso negro, relacionados a reações oxidativas descontroladas que prejudicam a qualidade dos produtos cárneos (VASQUEZ E SOTO-SOLANOVA, 2009; KORVER, 2010).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D de forma isolada ou associada a antioxidantes e a vitamina K3 na alimentação de frangos de corte sobre os parâmetros ósseos e a incidência da síndrome do osso negro.

5.2 Material E Métodos

5.2.1 Experimento com aves

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 2313300919.

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura/DZ/CCA/UFC em um galpão convencional para criação de frangos de corte, dividido internamente em 48 boxes de 1,5m x 1,0m (1,5m²), contendo bebedouros do tipo pendular e comedouros do tipo tubular.

Para a condução do experimento foram utilizados 768 pintos machos de um dia de idade da linhagem Ag Ross 308 com peso médio inicial de $46,5g \pm 1,16g$, provenientes de uma granja comercial. As aves foram imunizadas para as doenças de Marek e Gumboro no incubatório.

5.2.2 Delineamento experimental

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e seis repetições de dezesseis aves cada. Os tratamentos consistiram em: T1 – Ração controle (RC); T2 – RC + Vit. D; T3 – RC + Vit. D + antioxidante A; T4 – RC + Vit. D + antioxidante B; T5 – RC + Vit. D + antioxidante C; T6 – RC + Vit. D + Vit. K3; T7 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante B e T8 – RC + Vit. D + Vit. K3 + antioxidante C.

O metabólito da vitamina D utilizado foi o 25OHD3 e para a vitamina K3 foi utilizada a menadiona bissulfito de nicotinamida.

A ração controle continha vitamina D (3750 UI/kg de ração) e vitamina K (3,75 mg/kg de ração) a partir do suplemento vitamínico (premix). Além disso, para os tratamentos que receberam concentrações superiores às recomendações convencionais para vitamina D e vitamina K, foram adicionadas quantidades extras de vitamina D (1836 UI de 25OHD3/kg de ração) e vitamina K (0,63 mg de K3/kg de ração), totalizando 5586 UI de vitamina D e 4,38 mg de vitamina K.

Os antioxidantes utilizados consistiram em três diferentes produtos comerciais: 500 mg/kg de antioxidante A (Alltech), composto por DL-alfa-tocoferol (90g/kg) e ácido cítrico (20g/kg); 150 mg/kg de antioxidante B (Kemin), composto por uma mistura de tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã e 30 mg/kg de antioxidante C (Laza Biotecnologia), composto por hidroxitolueno butilado (BHT) (100g/kg), hidroxianisol butilado (BHA) (30g/kg), etoxiquin (100g/kg), ácido cítrico (100g/kg) e ácido fosfórico (20/kg).

O programa de alimentação foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 21 dias), crescimento (21 a 35 dias) e final (35 a 42 dias). As rações experimentais (Tabela 10) foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais para frangos de corte recomendadas por Rostagno *et al.* (2011) e foram calculadas para serem isoenergéticas e isonutritivas, considerando os valores de composição dos alimentos propostos por Rostagno *et al.* (2011). O inerte da ração foi substituído conforme os tratamentos por vitamina D, vitamina K3 e antioxidantes.

As condições ambientais no interior do galpão foram monitoradas através de Data Logger (Data Logger U12-012; HOBO, Bourne, MA) instalado na altura das aves. Durante o período experimental, a temperatura média do galpão e a umidade relativa do ar foi de 29,2°C e 54,5% na fase pré-inicial, 28,3°C e 57,6% na fase inicial, 29,4°C e 59% na fase de crescimento e 29,3°C e 60,7% na fase final.

A cama de frango foi revolvida manualmente duas vezes por semana, a partir das 8h, e os ventiladores ligados durante os horários de temperaturas mais elevadas (9 às 15h), a partir dos 28 dias de idade.

Tabela 10 – Composição e valor nutricional da ração controle para frangos de corte em diferentes idades

Ingredientes (Kg)	Fases			
	Pré-Inicial	Inicial	Crescimento	Final
Milho	52,55	56,31	61,13	64,37
Farelo de soja	40,49	36,90	31,76	28,53
Óleo de soja	2,30	2,77	3,37	3,49
Fosfato monobásico	1,92	1,74	1,54	1,46
Calcário calcítico	1,23	0,96	1,00	0,96
Sal comum	0,50	0,48	0,46	0,44
Suplemento mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Suplemento vitamínico ²	0,15	0,15	0,15	0,15
DL – Metionina	0,34	0,29	0,27	0,25
L – Lisina HCL	0,20	0,13	0,12	0,14
L – Treonina	0,13	0,04	0,02	0,01
Anticoccidiano	0,05	0,05	0,05	0,05
Promotor de crescimento	0,003	0,003	0,003	0,003
Inerte ³	0,07	0,07	0,07	0,07
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
Nível Nutricional Calculado				
Energia Metab. (kcal/kg)	2.975	3.050	3.150	3.200
Proteína bruta (%)	23,00	21,50	19,50	18,30
Cálcio (%)	0,96	0,81	0,78	0,74
Fósforo disponível (%)	0,48	0,43	0,39	0,37
Sódio (%)	0,22	0,21	0,18	0,19
Lisina digestível Aves (%)	1,28	1,15	1,02	0,96
Metionina + cistina digestível Aves (%)	0,95	0,87	0,80	0,75
Metionina digestível Aves (%)	0,64	0,58	0,45	0,49
Treonina digestível Aves (%)	0,86	0,77	0,68	0,64
Vitamina D (UI/Kg)	3.750	3.750	3.750	3.750
Vitamina K (mg/Kg)	3,75	3,75	3,75	3,75

¹Composição por kg do produto: Ferro 100.000,00 mg; cobre 20.000,00 mg; Manganês 130.000,00 mg; Zinco 130.000,10 mg; Iodo 2.000,00 mg; ²Composição por kg do produto: Vit. A 9.000.000,00 UI; Vit. D3 2.500.000,00 UI; Vit. E 20.000,00 UI; Vit. K3 2.500,00 mg; Vit. B1 2.000,00 mg; Vit. B2 6.000,00 mg; Vit. B6 3.000,38 mg; Vit. B12 15,00 mg; Ácido fólico 1.500,00 mg; ácido nicotínico 35000 mg; Ácido pantotênico 12.000,00 mg; Biotina 100mg; Selênio 250,00 mg; ³Inerte: Areia lavada.

5.2.3 Avaliação da incidência da síndrome do osso negro

Para avaliação da BBS, aos 42 dias, após jejum alimentar de 6hrs, todas as aves foram pesadas e foram selecionadas 3 aves de cada unidade experimental, com peso vivo mais próximo do peso médio da parcela, totalizando 144 frangos de corte. As aves selecionadas

foram insensibilizadas através de eletronarcose, seguido de sangria, escaldagem, depena e evisceração.

Após a eutanásia e a evisceração, as carcaças foram pesadas, as sobrecoxas foram separadas, identificadas, pesadas e congeladas (-20°C) para posterior análise. Depois de 30 dias de congelamento, as sobrecoxas foram retiradas do freezer e descongeladas em geladeira a 4°C por 24 horas. Em seguida, para a determinação da incidência da síndrome do osso negro, as sobrecoxas foram cozidas em água fervente por 30 minutos.

Após esse cozimento, as amostras foram submetidas às avaliações dos escores de aparência, realizada por um único observador, para verificar a incidência da síndrome do osso negro segundo Melo *et al.* (2020), adotando-se metodologia de avaliação macroscópica do escurecimento da carne, atribuindo os seguintes escores: 0, 1, ou 2, de acordo com a aparência. O escore 0 foi classificado como aceitável (região próxima ao osso sem escurecimento), o escore 1 como intermediário (menos de 50% da região próxima ao osso comprometido) e o escore 2 como inaceitável (mais 50% da região próxima ao osso comprometido).

5.2.4 Avaliação dos Parâmetros Ósseos

Para mensuração dos parâmetros ósseos, após a eutanásia e a evisceração, as coxas dos frangos de corte foram separadas e as tíbias de cada coxa foram devidamente identificadas e limpas com bisturi, de acordo à metodologia descrita e adaptada de Bruno *et al.* (2000).

O comprimento da tíbia foi medido por meio de um paquímetro digital e o peso obtido em balança de precisão (0,01g). A densidade óssea foi obtida a partir da divisão do peso (mg) pelo comprimento (mm) dos ossos segundo Melo *et al.* (2020). A resistência óssea e a deformidade da tíbia foram determinadas usando um Testo/Prensa mecânica triaxial Ronald (Ronald Top Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com capacidade de 150kg.

As tíbias foram colocadas em posição horizontal sobre um suporte de madeira e depois foi aplicada uma força no centro de cada tíbia. A quantidade máxima de força aplicada na tíbia até a sua ruptura foi considerada a resistência à quebra (kgf/cm²), sendo esta mensurada através de um extensômetro digital. A deformidade do osso (mm) foi medida através de um extensômetro analógico a partir da flexão de cada tíbia em relação à sua posição horizontal, até antes da sua ruptura pela ação da força aplicada.

As mesmas amostras de tíbia utilizadas nos testes de resistência e deformidade óssea foram também utilizadas para determinar a matéria seca (MS) e a matéria mineral (MM) dos ossos de acordo com o método descrito por AOAC (2000).

5.2.5 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *Statistical Analyses Sistem*. Os dados obtidos para qualidade óssea foram analisados pelo procedimento ANOVA, segundo modelo inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância, quando os efeitos dos tratamentos foram significativos para as diferentes variáveis avaliadas ($P < 0,05$). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Student–Newman–Keuls a 5% de probabilidade.

Para a incidência de síndrome do osso negro a análise estatística dos dados de escores de avaliação foi realizada usando o teste do quiquadrado.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Incidência da síndrome do osso negro

A avaliação da incidência da síndrome do osso negro (Tabela 11) não influenciou significativamente os diferentes tratamentos, indicando que a suplementação de vit. D de forma isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3 não teve efeito sobre os escores de escurecimento da carne. Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Bonamigo *et al.* (2022), que testaram a adição de 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) e cantaxantina como antioxidante, e não encontraram influência significativa da adição dos mesmos na incidência da síndrome.

Nos escores de avaliação para osso negro das amostras de sobrecoxa pelo teste do quiquadrado (Tabela 11), observou-se que houve uma maior proporção de amostras consideradas intermediárias (68,06%), que já caracteriza a incidência da síndrome. No entanto, Colet *et al.* (2015) verificaram que a suplementação dietética de vitamina D nos níveis de 5454 UI/kg e 7000 UI/kg foi capaz de reduzir a incidência de escores de escurecimento considerados intermediários e inaceitáveis, somando apenas 33%, evidenciando a influência da vitamina D no combate a BBS.

Segundo Whitehead (2010) e Ribeiro *et al.* (2021), a síndrome do osso negro é uma condição caracterizada pelo escurecimento da carne adjacente ao osso devido ao extravasamento de sangue da medula óssea para a carne, o que afeta principalmente as características visuais dos produtos cárneos, sendo a cor o atributo que mais influencia a aceitação do consumidor.

Tabela 11 – Número e frequência de amostras para os escores de escurecimento da carne de frangos de corte alimentados com rações contendo vitamina D, vitamina K e antioxidantes.

Tratamentos	Escore de avaliação					
	0 – aceitável		1 – intermediário		2 – inaceitável	
	Num. ⁸	% ⁹	Num.	%	Num.	%
RC ¹	1	5,56	13	72,22	4	22,22
RC + Vit.D ²	2	11,11	9	50,00	7	38,89
RC + Vit. D + Ant. A ³	2	11,11	10	55,56	6	33,33
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	2	11,11	13	72,22	3	16,67
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	1	5,56	14	77,78	3	16,67
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	0	0,00	17	94,44	1	5,56
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. B	2	11,11	11	61,11	5	27,78
RC + Vit. D + Vit. K3+ Ant. C	1	5,56	11	61,11	6	33,33
Total	11	7,64	98	68,06	35	24,31
Efeitos – ANOVA ⁷			p – valor			
Tratamento	0,9983		0,8135		0,4971	

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicolecalciferol; ³Ant. A – DL-alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁴Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁵Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁶Vit. K3 – Menadiona bissulfato de nicotinamida; ⁷ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo; ⁸Num. – Número de amostras por escore; ⁹% – Porcentagem de amostra por escore.

Nesse contexto, a vitamina D na sua forma ativa participa diretamente dos processos ósseos, estando envolvida na absorção de cálcio intestinal e na mobilização e fixação de cálcio nos ossos, tendo assim um papel essencial na qualidade, rigidez e mineralização óssea, o que pode representar uma melhora na integridade e na qualidade do osso, garantindo a proteção da medula óssea e o controle do processo de extravasamento de sangue para regiões adjacentes ao osso durante o descongelamento/cozimento de coxas e sobrecoxas (BALDO *et al.* 2013; EBRAHIMI *et al.*, 2016; MOTA *et al.*, 2019; EL-SAFETY *et al.*, 2022).

Diante disso, de acordo com Pérez-Vendrell *et al.* (2011), o uso de 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) na dieta de frangos de corte pode apresentar eficiência na formação de uma estrutura óssea mais sólida, minimizando o vazamento de sangue e consequentemente, o escurecimento da carne. No entanto, neste estudo, a suplementação de vit. D (1836 UI de 25OHD3/kg de ração + 3750 UI de D3/kg de ração), associada ou não a antioxidantes e vit. K3 não foi o suficiente para promover o aumento no número de sobrecoxas consideradas aceitáveis, além de não promover a diminuição da intensidade de escurecimento da carne.

Apesar dos estudos relacionados ao efeito da vitamina K em relação aos parâmetros ósseos serem pouco investigados, essa vitamina também pode apresentar ação importante sobre a integridade óssea e ainda atuar possivelmente no controle da síndrome do osso negro, uma

vez que, na sua forma ativa, desempenha um papel fundamental como cofator enzimático (RUBINACCI, 2009).

Segundo Hamidi *et al.* (2013), a vitamina K auxilia na ligação da osteocalcina ao cálcio, facilitando a fixação do cálcio na hidroxiapatita e na matriz extracelular, o que pode atuar diretamente na mineralização do tecido ósseo. Porém, de acordo com os resultados, o uso combinado de vit. K3 e vit. D, associado ou não a antioxidantes, não foi capaz de influenciar a integridade do osso, assim como atuar no controle da porosidade óssea e do extravasamento de sangue da medula para regiões adjacentes, havendo a necessidade de maiores investigações sobre a atuação desses aditivos na integridade do osso e na incidência de BBS.

Os antioxidantes também vêm sendo relacionados à redução da incidência da síndrome do osso negro, a partir da diminuição do escurecimento da carne adjacente ao osso de coxas e sobrecoxas de frangos de corte modernos (FREITAS *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2020). Assim, a adição de antioxidantes à dieta das aves pode apresentar um efeito protetor no combate aos radicais livres, com um maior controle da oxidação lipídica e melhora na estabilidade das estruturas da membrana celular da medula óssea, além de agir na neutralização do oxigênio, preservando a coloração da carne, evitando assim a oxidação da hemoglobina e da mioglobina (LU *et al.*, 2014; MOTA *et al.*, 2019; PICOU *et al.* 2019).

Dessa forma, vários antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e alfa-tocoferol, protegem os lipídios das membranas dos processos oxidativos (MORDENTI e MARCHETTI, 1996). Todavia, neste estudo o uso de diferentes antioxidantes (tocoferóis, extratos vegetais e antioxidantes sintéticos) associados à vit. D ou à vit. D + vit. K3 não foi suficiente para preservar a medula óssea e consequentemente, combater o extravasamento de sangue da medula para regiões adjacentes ao osso, diferindo dos resultados encontrados por Mota *et al.* (2019) e Melo *et al.* (2020).

5.3.2 Qualidade óssea

As variáveis de qualidade óssea não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos avaliados (Tabela 12). De acordo com os resultados, a suplementação de vitamina D, combinada ou não, a antioxidantes e vitamina K3, não afetou significativamente o comprimento, o peso, a densidade, a resistência e a deformidade óssea. Também não foi possível observar efeito dos tratamentos para matéria seca e a matéria mineral da tíbia de frangos de corte.

Tabela 12 – Parâmetros ósseos da tíbia de frangos de corte alimentados com diferentes rações contendo vitamina D, vitamina K e antioxidantes.

Tratamentos	Parâmetros Avaliados						
	Peso (g)	Comp. ⁹ (mm)	Densid. ¹⁰ (mg/mm)	Res. ¹¹ (kgf/cm ²)	Def. ¹² (mm)	MS ¹³ (%)	MM ¹⁴ (%)
RC ¹	17,22	100,85	170,37	23,89	5,38	54,79	43,06
RC + Vit.D ²	16,13	98,93	162,89	21,60	5,20	57,99	43,57
RC + Vit. D + Ant. A ³	17,54	100,35	176,03	22,09	5,11	56,71	42,99
RC + Vit. D + Ant. B ⁴	16,49	101,48	162,89	23,52	5,07	56,48	41,27
RC + Vit. D + Ant. C ⁵	17,26	104,38	165,31	23,88	5,84	57,66	43,01
RC + Vit. D + Vit. K3 ⁶	17,79	104,14	170,98	22,22	5,40	56,87	42,20
RC + Vit. D + Vit.K3 + Ant. B	18,66	104,34	178,71	21,70	4,98	56,22	42,64
RC + Vit. D + Vit.K3 + Ant. C	18,02	104,29	172,70	24,65	5,31	56,41	42,39
Média	17,44	102,44	170,29	22,96	5,29	56,61	42,65
CV ⁷ (%)	9,09	3,61	7,94	14,63	13,96	4,22	5,26
Efeitos - ANOVA ⁸	<i>p</i> – valor						
Tratamento	0,2178	0,0833	0,4081	0,6687	0,6065	0,4860	0,8249

¹RC – Ração controle; ²Vit. D – 25-hidroxicolecalciferol; ³Vit. K3 – Menadiona bissulfato de nicotinamida; ⁴Ant. A – D α -alfa-tocoferol e ácido cítrico; ⁵Ant. B – Tocoferóis, dióxido de silício, pirofosfato tetassódico, extrato de alecrim, extrato de chá verde e extrato de hortelã; ⁶Ant. C – BHT, BHA, etoxiquin, ácido cítrico e ácido fosfórico; ⁷CV – Coeficiente de variação; ⁸ANOVA – Análise de variância (P>0,05): Efeito estatístico não significativo; ⁹Comprimento; ¹⁰Densidade; ¹¹Resistência; ¹²Deformidade; ¹³Matéria Seca; ¹⁴Matéria Mineral.

De maneira geral, elevados graus de porosidade comprometem a estrutura óssea, influenciando negativamente a mineralização e a rigidez do osso, além de possibilitar o extravasamento do conteúdo medular sobre a superfície óssea e as regiões adjacentes (RIBEIRO *et al.*, 2021). Como não foi observada influência significativa dos tratamentos sobre a incidência de BBS e os parâmetros de qualidade óssea, pode-se inferir que a suplementação de vit. D, de maneira isolada ou associada a antioxidantes e vit. K3, nas concentrações utilizadas neste estudo, não foram suficientes para atuar positivamente na qualidade óssea de frangos de corte, concordando com Ribeiro *et al.* (2021) que também não encontram efeito significativo do uso de 25OHD3 (2760 UI/kg de ração) e vitamina K (4 mg/kg de ração) para frangos de corte sobre os parâmetros ósseos.

Normalmente, os efeitos da suplementação de vitamina D estão associados a um desequilíbrio de Ca e P dietético. Todavia, neste estudo, os frangos de corte receberam RC com níveis balanceados desses minerais, o que pode significar que a suplementação alimentar acima dos níveis recomendado para vit. D não necessariamente promove melhorias as características ósseas, havendo muitas vezes, a necessidade de uma condição de desafio para os animais.

Já El-safty *et al.* (2022) observaram uma maior rigidez e resistência à ruptura da tíbia em aves suplementadas com 25OHD3 (12000 UI/kg de ração) + luz ultravioleta, havendo um maior estímulo das vias de vit. D, enquanto Zhang *et al.* (2019) verificaram uma melhora na densidade óssea em aves que receberam vit. D (2760 UI/kg de ração) + dieta pobre em Ca e P, ambos diferindo dos resultados encontrados nesta pesquisa.

O rápido crescimento dos frangos de corte, devido ao intenso processo de seleção genética ao longo dos anos, promoveu um desequilíbrio entre o crescimento muscular e esquelético desses animais, resultando em ossos inadequadamente mineralizados (BOZKURT *et al.*, 2017). Nesse contexto, a vitamina D e a vitamina K desempenham um papel complementar ao metabolismo e a resistência óssea (DAL JANG *et al.*, 2018; RUBINACCI (2009).

Em ação conjunta com o paratormônio (PTH), a vitamina D regula a manutenção dos níveis plasmáticos de Ca e P (GALVÃO *et al.*, 2013), garantindo manutenção e o equilíbrio desses minerais, que associados a outros componentes da matriz óssea, como colágeno, proteoglicanos, lipídios, proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteopontina e osteonectina), apresentam propriedades específicas no processo de mineralização e qualidade do osso (RATH *et al.*, 2000; BRUNO *et al.*, 2007; KIERSZENBAUM, 2008). Além disso, a biossíntese e a ativação de algumas proteínas que desempenham papel importante na formação e na mineralização óssea dependem da vitamina K, como é o caso da osteocalcina e da proteína de ácido glutâmico (GLA) da matriz óssea (ZHANG *et al.*, 2003; HAMIDI *et al.*, 2013).

Dessa maneira, alguns autores confirmam que a adição dietética de 25OHD3 apresenta potencial melhora aos parâmetros de qualidade óssea de frangos de corte, além de controlar a incidência de deformação esquelética dos ossos longos, devido a maior eficiência na retenção de Ca e P das dietas e ao aumento do conteúdo de colágeno na matriz orgânica do osso (HAN *et al.*, 2016; BOZKURT *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Contudo, neste trabalho não foi possível observar efeito significativo do uso de vit. D, vit. K3 e antioxidantes na qualidade da tíbia de frangos de corte, possivelmente estando esse resultado relacionado a uma falta de desafio às aves.

Já Abbasi *et al.* (2017), ao avaliarem a suplementação de 0,4µg/kg vitamina D3 associada a 6µg/kg vitamina K3 *in ovo*, verificaram uma influência sobre os parâmetros ósseos de frango de corte ao atingirem 42 dias, havendo uma maior resistência da tíbia à fratura. No entanto, na presente pesquisa, o uso combinado de 4,38 mg de menadiona bissulfito de nicotinamida (vit. K3) e 5586 UI de vit. D (1836 UI de 25OHD3/kg + 3750 UI de D3/kg) para frangos de corte nas diferentes fases não foi o suficiente para proporcionar efeitos sobre os

parâmetros ósseos, corroborando com Guo *et al.* (2020) em que o uso de vit. K3 não proporcionou aumento do diâmetro e do peso da tíbia, tão pouco melhorou a resistência óssea aos 42 dias de idade das aves.

Por sua vez, o uso de antioxidantes na ração pode contribuir indiretamente para a qualidade dos ossos, influenciando a oxidação celular a partir da redução da produção de radicais livres, evitando assim dano tecidual e perda óssea (ABIDIN e KHATOON, 2013). Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo pode afetar o desenvolvimento e a manutenção óssea (HOSSEINI-VASHAN *et al.*, 2016). Todavia, o uso de antioxidantes não proporcionou alterações nos parâmetros de qualidade da tíbia, diferindo dos resultados encontrados por Dukare *et al.* (2021) que observaram um aumento das dimensões ósseas e melhora na mineralização com uso de antioxidantes.

Apesar da ausência, nesta pesquisa, de resultados significativos em relação à qualidade óssea e à síndrome do osso negro em frangos de corte, a suplementação combinada de vit. D, antioxidantes e vit. K3 se mostra promissora. Dessa forma, é importante reconhecer que a eficácia singular de cada aditivo pode ser afetada pelas inter-relações entre eles, bem como por influências ambientais, nutricionais e fisiológicas e que novas pesquisas podem ajudar na compreensão mais completa dos benefícios potenciais desses aditivos quando utilizados de maneira associada.

5.4 Conclusões

A vitamina D e suas associações com antioxidantes e/ou vitamina K3 nas doses avaliadas para suplementação dos frangos de corte além do aportado pelo suplemento vitamínico da ração não promove benefícios sobre a qualidade óssea e a incidência da síndrome do osso negro.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. A.; GHAZANFARI, S.; SHARIFI, S. D.; AHMADI GAVLIGHI, H. Influence of dietary plant fats and antioxidant supplementations on performance, apparent metabolizable energy and protein digestibility, lipid oxidation and fatty acid composition of meat in broiler chicken. **Vet Med Sci**, v. 6, p. 54–68, 2020.
- ABBASI, T.; SHAKERI, M.; ZAGHARI, M.; KOHRAM, H. Growth performance parameters, bone calcification and immune response of in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol and vitamin K3 in male Ross 308 broilers. **Theriogenology**, v. 90, p. 260-265, 2017.
- ABIDIN, Z.; KHATOON, A. Heat stress in poultry and the beneficial effects of ascorbic acid (vitamin C) supplementation during periods of heat stress. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 135–152, 2013.
- ABIOJA, M. O.; OGUNDIMU, K. B.; AKIBO, T. E.; ODUKOYA, K. E.; AJIBOYE, O. O.; ABIONA, J. A.; WILLIAMS, T. J.; OKE, E. O.; OSINOWO, O. A. Growth, mineral deposition, and physiological responses of broiler chickens offered honey in drinking water during hot-dry season. **International Journal of Zoology**, p. 1-6, 2012.
- ABURTO, A.; EDWARDS JUNIOR, H. M.; BRITTON, W. M. The influence of vitamin A on the utilization and amelioration of toxicity of cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol, and 1,25-dihydroxycholecalciferol in young broiler chickens. **Poultry Science**, v. 77, n. 4, p. 585–593, 1998.
- AJIBADE, D.; BENN, B. S.; CHRISTAKOS, S. Mechanism of action of 1.25 dihydroxyvitamin D3 in intestinal calcium absorption and renal calcium transport. In: HOLICK, M. F. **Vitamin D: Physiology, Molecular, Biological and Clinical Applications**. Totowa: Humana Press, 2010, p. 175–187.
- AKBARI, R.; KAKHKI, M.; BAKHSHALINEJAD, R.; SHAFIEE, M. Effect of dietary zinc and α -tocopheryl acetate on broiler performance, immune responses, antioxidant enzyme activities, minerals and vitamin concentration in blood and tissues of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 12-26, 2016.
- AKBARI, S.; RASOULI-GHAHROUDI, A. A. Vitamin K and bone metabolism: a review of the latest evidence in preclinical studies. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2018.
- AKBARIAN, A.; MICHIELS, J.; DEGROOTE, J.; MAJDEDDIN, M.; GOLIAN, A.; DE SMET, S. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, p. 37, 2016.
- ALAGAWANY, M.; ELNESR, S. S.; FARAG, M. R.; TIWARI, R.; YATOO, M. I.; KARTHIK, K.; MICHALAK, I.; DHAMA, K. Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health – a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 1-29, 2021.

ALBRECHT, A.; HEBEL, M.; HEINEMANN, C.; HERBERT, U.; MISKEL, D.; SAREMI, B.; KREYENSCHMIDT, J. Assessment of meat quality and shelf life from broilers fed with different sources and concentrations of methionine. **Journal of Food Quality**, v.34, p. 332-337, 2019.

ALONSO, N.; MEINITZER, A.; FRITZ-PETRIN, E. D.; ENKO, D.; HERRMANN, M. Role of vitamin K in bone and muscle metabolism. **Calcified Tissue International**, v. 112, p. 178–196, 2023.

ALVES, MCF. **Condição de equilíbrio e problemas locomotores em frangos de corte. Condição de equilíbrio e problemas locomotores em frangos de corte**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

ALVES, O. S.; CALIXTO, L. F. L.; ARAUJO, A. H. B. A.; TORRES-CORDIDO, K. A. A.; REIS, T. L.; CALDERANO, A. A. Diminuição dos níveis de vitamina D3 e suplementação com 1,25-dihidroxivitamina D3 glicosídeo sobre o desempenho, o rendimento da carcaça e a qualidade dos ossos em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 48, n. 08, 2018.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 2000. 99 p.

AVILA-RAMOS, F.; PRO-MARTÍNEZ, A.; SOSA-MONTES, E.; CUCA-GARCIA, J. M.; BECERRIL-PÉREZ, C. M.; FIGUEROA-VELASCO, J. L.; NARCISO-GAYTÁN, C. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. **Poultry Science**, v. 9, p. 505–511, 2012.

AZUMA, K.; INOUE, S. Multiple modes of vitamin K actions in aging-related musculoskeletal disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 2019.

AZUMA, K.; CASEY, S. C.; ITO, M.; URANO, T.; HORIE, K.; OUCHI, Y.; KIRCHNER, S.; BLUMBERG, B.; INOUE, S. Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. **Journal of Endocrinology**, v. 207, n. 3, p. 257–263, 2010.

BAEK, K. H.; OH, K. W.; LEE, W. Y.; LEE, S. S.; KIM, M. K.; KWON, H. S.; RHEE, E. J.; HAN, J. H.; SONG, K. H.; CHA, B. Y.; LEE, K. W.; KANG, M. I. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. **Calcified Tissue International**, v. 87, p. 226–235, 2010.

BAILEY, R. A.; WATSON, K. A.; BILGILI, S. F.; AVENDANO, S. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. **Poultry Science**, v. 94, n. 12, p. 2870–2879, 2015.

BAJWA, M. H.; MIRZA, M. A.; AHMAD, G.; MAHMOOD, T. Comparative efficacy of vitamin D sources on growth response and bone mineralization in broilers. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 57, n. 1, 2020.

BALDO, G. A. A. **Planos nutricionais para desempenho regular, médio ou superior de frangos de corte em diferentes épocas do ano e idades de abate**. 2018. 114f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2018.

BALDO, G. A. A. **Suplementação com vitamina d (25-OHD3) e sua influência na produtividade e qualidade óssea de frangos de corte**. 2015. 82 f. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2015.

BALDO, G. A. A.; ALMEIDA PAZ, I. C. L.; ALVES, M. C. F.; NÄÄS, I. A.; GARCIA, R. G.; CALDARA, F. R.; GAVILAN, C. W. S. Blackbone syndrome in chicken meat. **Brazilian Journal of Poultry Science**, p. 317–322, 2013.

BARBUT, S.; SOSNICKI, A. A.; LONERGAN, S. M.; KNAPP, T.; CIOBANU, D. C. Dry em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, supl., p. 69–72, 2007.

BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAÚJO, R. P. C. Vitamina D: uma abordagem molecular. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 3, p. 309–315, 2007.

BARTON-DAVIS, E.; SHOTURMA, D.; MAUSARO, A.; ROSENTHAL, M.; SWEENEY, H. Viral mediated expression of insulin-like growth factor blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 15603–15607, 1998.

BELLO, A.; HESTER, P. Y.; GERARD, P. D.; ZHAI, W.; PEEBLES, E. D. Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on bone development and mineralization in male and female broilers. **Poultry Science**, v. 93, p. 2734–2739, 2014.

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MÜNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1215–1265, 2000.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: UFLA, 2006. 301 p.

BHAT, M.; NOOLU, B.; QADRI, S. S.; ISMAIL, A. Vitamin D deficiency decreases adiposity in rats and causes altered expression of uncoupling proteins and steroid receptor coactivator. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, p. 304–312, 2014.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123–130, 1999.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BODLE, B. C.; ALVARADO, C.; SHIRLEY, R. B.; MERCIER, Y.; LEE, J. T. Evaluation of different dietary alterations in their ability to mitigate the incidence and severity of woody breast and white striping in commercial male broilers. **Poultry Science**, v. 97, p. 3298–3310, 2018.

BOENGLER, K.; KOSIOL, M.; MAYR, M.; SCHULZ, R.; ROHRBACH, S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, p. 349–369, 2017.

BOERBOOM, G.; VAN KEMPEN, T.; NAVARRO-VILLA, A.; PEREZ-BONILLA, A. Unraveling the cause of white striping in broilers using metabolomics. **Poultry Science**, v. 97, n. 11, p. 3977–3986, 2018.

BONAMIGO, D. V.; ROSA, A. P.; PAIXÃO, S. J.; STEFANELLO, F. S.; LONDEROA, A.; MARIANI, A. B.; BITTENCOURT, L. C. Performance, carcass yield and cuts of male broilers fed with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, p. 115173, 2022.

BOOTH, S. L.; CENTI, A.; SMITH, S. R.; GUNDBERG, C. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 43–55, 2013.

BOOTH, S. L.; SUTTIE, J. W. Dietary intake and adequacy of vitamin K1. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 785–788, 1998.

BOZKURT, M.; YALÇIN, S.; KOÇER, B.; TÜZÜN, A. E.; AKŞIT, H.; ÖZKAN, S.; UYGUN, M.; EGE, G.; GÜVEN, G.; YILDIZ, O. Effects of enhancing vitamin D status by 25-hydroxycholecalciferol supplementation, alone or in combination with calcium and phosphorus, on sternum mineralisation and breast meat quality in broilers. **British Poultry Science**, v. 58, p. 452–461, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft und –Technologie**, v. 22, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRITO, J. A. G.; BERTECHINI, A. C.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES, P. A.; LIMA, E. M. C.; MENEGHETTI, C. Efeito da vitamina D3 e 25-hidroxi-colecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 12, p. 2656–2663, 2010.

BROOM, D. M. Animal welfare in the European Union. European Parliament. **Policy Department C: Citizens' Rights and Constitutional Affairs**, PE 583.114, 2017.

BRUNO, L. D. G.; FURLAN, R. L.; MALHEIROS, E. B.; MACARI, M. Influence of early quantitative food restriction on long bone growth at different environmental temperatures in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 41, p. 389–394, 2000.

BRUNO, L. D. G.; LUQUETTI, B. C.; FURLAN, R. L.; MACARI, M. Influence of early qualitative feed restriction and environmental temperature on long bone development of broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, n. 6, p. 349–354, 2007.

CAPLEN, G.; HOTHERSALL, B.; NICOL, C. J.; PARKER, R. M. A.; WATERMAN-PEARSON, A. E.; WEEKS, C. A.; MURRELL, J. C. Lameness is consistently better at predicting broiler chicken performance in gait score tests than other broiler characteristics. **Animal Welfare**, v. 23, p. 179–187, 2014.

CASON, J. A.; LYON, C. E.; PAPA, C. M. Effect of muscle opposition during rigor on development of broiler breast meat tenderness. **Poultry Science**, v. 76, p. 725–787, 1997.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 566–575, 2011.

CHAN, K. M.; DECKER, E. A.; FEUSTMAN, C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 403–426, 1994.

CHAUHAN, P.; KUMAR, R. R.; MENDIRATTA, S. K.; TALUKDER, S.; GANGWAR, M.; SAKUNDE, D. T.; et al. In-vitro functional efficacy of extracts from *Phyllanthus emblica*, *Eucalyptus globulus*, *Tinospora cordifolia* as pancreatic lipase inhibitor and source of antioxidant in goat meat nuggets. **Food Chemistry**, v. 348, Article 129087, 2021.

CHE, S.; WANG, C.; IVERSON, M.; VARGA, C.; BARBUT, S.; BIENZLE, D.; SUSTA, L. Characteristics of broiler chicken breast myopathies (spaghetti meat, woody breast, white striping) in Ontario, Canada. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, 2022.

CHENG, J.; WANG, S.; OCKERMAN, H. W. Lipid oxidation and color change of salted pork patties. **Meat Science**, v. 75, n. 1, p. 71–77, 2007.

CHENG, K.; ZHANG, M.; HUANG, X.; ZHENG, X.; SONG, Z.; ZHANG, L.; WANG, T. An evaluation of natural and synthetic vitamin E supplementation on growth performance and antioxidant capacity of broilers in early age. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 98, p. 187–193, 2017.

CHERIAN, G.; SELVARAJ, R. K.; GOEGER, M. P.; STITT, P. A. Muscle fatty acid composition and thiobarbituric acid-reactive substances of broilers fed different cultivars of sorghum. **Poultry Science**, v. 81, n. 9, p. 1415–1420, 2002.

CHIN, K. Y. The relationship between vitamin K and osteoarthritis: a review of current evidence. **Nutrients**, v. 12, p. 1208, 2020.

CHOI, M. J.; JUNG, Y. J. Effects of taurine and vitamin D on antioxidant enzyme activity and lipids profiles in rats fed diet deficient calcium. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 975, Pt 2, p. 1081–1092, 2017.

CHOU, S. H.; CHUNG, T. K.; YU, B. Effects of supplemental 25-hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, p. 2333–2341, 2009.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 749–762, 2010.

COLET, S.; GARCIA, R.; ALMEIDA PAZ, I.; CALDARA, F.; BORILLE, R.; ROYER, A. Bone characteristics of broilers supplemented with vitamin D. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 3, p. 325–332, 2015.

COLLINS, M. T.; LINDSAY, J. R.; JAIN, A.; KELLY, M. H.; CUTLER, C. M.; WEINSTEIN, L. S.; LIU, J.; FEDARKO, N. S.; WINER, K. K. Fibroblast growth factor-23 is

regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 11, p. 1944–1950, 2005.

CONEGLIAN, S. M.; LIMA, B. DA S.; SILVA, L. G.; LAZZARI, C. M.; SERRANO, R. D. C.; TONELLO, C. L. Utilização de antioxidantes nas rações. **PUBVET – Publicação em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Ed. 152, Londrina, v. 5, n. 5, 33p., 2011.

CÓRDOVA-NOBOA, H. A.; OVIEDO-RONDON, E. O.; SARSOOR, A. H.; BARNES, J.; FERZOLA, P.; RADEMACHER-HEILSHORN, M.; BRAUN, U. Performance, meat quality, and pectoral myopathies of broilers fed either corn or sorghum based diets supplemented with guanidinoacetic acid. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2479–2493, 2018.

CORSELLO, T.; KOMARAVELLI, N.; CASOLA, A. Role of hydrogen sulfide in NRF2- and Sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance. **Antioxidants**, v. 7, p. 10, 2018.

CRUZ, R. F. A.; VIEIRA, S. L.; KINDLEIN, L.; KIPPER, M.; CEMIN, H. S.; RAUBER, S. M. Occurrence of white striping and wooden breast in broilers fed grower and finisher diets with increasing lysine levels. **Poultry Science**, v. 96, p. 501–510, 2017.

CRUZ, C. E. B.; FREITAS, E. R.; BRAZ, N. M.; SALLES, R. P. R.; SILVA, I. N. G. Blood parameters and enzymatic and oxidative activity in the liver of chickens fed with calcium anacardate. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, p. 343–352, 2019.

CZOGALLA, K. J.; BISWAS, A.; HONING, K.; HORNUNG, V.; LIPHARDT, K.; WATZKA, M.; OLDENBURG, J. Warfarin and vitamin K compete for binding to Phe55 in human VKOR. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 65, p. 433, 2017.

DAL JANG, J.; MA, J.; LU, N.; LIM, J.; MONEGUE, H. J.; STUART, R. L.; LINDEMANN, M. D.; LINDEMANN. Administration of vitamin D3 by injection or drinking water alters serum 25-hydroxycholecalciferol concentrations of nursery pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, p. 278–286, 2018.

DANTAS, A. T.; DUARTE, A. L. B.; MARQUES, C. D. L. A vitamina D na artrite reumatoide e no lúpus eritematoso sistêmico. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 2, 2009.

DELLES, R. M.; XIONG, Y. L.; TRUE, A. D.; AO, T.; DAWSON, K. A. Dietary antioxidant supplementation enhances lipid and protein oxidative stability of chicken broiler meat through promotion of antioxidant enzyme activity. **Poultry Science**, v. 93, p. 1561–1570, 2014.

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1689–1696, 2004.

DIAZ, V. E. A. M. **Effects of 1- α -hydroxycholecalciferol and other Vitamin D analogs on live performance, bone development, meat yield and quality, and mineral digestibility on broilers.** (MS Thesis), 2018. 180 p.

DIRKS-NAYLOR, A. J.; LENNON-EDWARDS, S. The effects of vitamin D on skeletal muscle function and cellular signaling. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, p. 159–168, 2011.

DOMAZETOVIC, V.; MARCUCCI, G.; IANTOMASI, T.; BRANDI, M. L.; VINCENZINI, M. T. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 209–216, 2017.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421–431, 1990.

DUARTE, C.; BRATTI, F.; MURAKAMI, A.; FERNANDES, J.; OSPINA-ROJAS, I.; FURLAN, A. Efecto de la suplementación de vitamina K3 sobre el comportamiento productivo y calidad ósea de pollos de engorde. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, n. 2, p. 305–313, 2014.

DUFFY, S. K.; KELLY, A. K.; RAJAURIA, G.; JAKOBSEN, J.; CLARKE, L. C.; MONAHAN, F. J.; DOWLING, K. G.; HULL, G.; GALVIN, K.; CASHMAN, K. D.; HAYES, A.; O'DOHERTY, J. V. The use of synthetic and natural vitamin D sources in pig diets to improve meat quality and vitamin D content. **Meat Science**, v. 143, p. 60–68, 2018.

DUKARE, S.; MIR, N. A.; MANDAL, A. B.; DEV, K.; BEGUM, J.; ROKADE, J. J.; BISWAS, A.; TYAGI, P. K.; BHANJA, S. K. A comparative study on the antioxidant status, meat quality, and mineral deposition in broiler chicken fed dietary nano zinc viz-a-viz inorganic zinc. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 3, p. 834–843, 2021.

DZIK, K.; SKROBOT, W.; FLIS, D. J.; KARNIA, M.; LIBIONKA, W.; KLOC, W.; KACZOR, J. J. Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. **European Journal of Applied Physiology**, v. 118, p. 143–151, 2018.

EBRAHIMI, H.; SHARIATMADARI, F.; KARIMI TORSHIZI, M. A. Dietary supplementation and in ovo injection of 1 α -OHD3 in a low-calcium and low-phosphorous diets for broilers. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, p. 113–117, 2016.

EDWARDS, JR, H.M. Studies on the efficacy of cholecalciferol and derivatives for stimulating phytaseutilization in broilers. **Poultry Science**, v. 81, p. 1026-1031, 2002.

EL-BOSHY, M.; BASALAMAH, M.A.; IDRIS, J.; AHMAD, S.; MAHBUB, A.; ABDELGHANY, A.H. Vitamin D protects against oxidative stress, inflammation and hepatorenal damage induced by acute paracetamol toxicity in rat. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, p. 310-321, 2019.

EL HUSSEINY, O.; CREGER, C.R. Effect of ambiente temperature on mineral retention and balance of the broiler chicks (abstract). **Poultry Science**, v. 60, p. 1651, 1981.

EL-SAFETY, S.A.; GALAL, A.; EL-GENDI, G.M.; ABD EL-AZEEM, N.A.; GHAZALY, M.A.; ABDELHADY, A.Y.M. Effect of 25-hydroxyvitamin D supplementation, ultraviolet light and their interaction on productive performance, bone characteristics, and some behavioral aspects of broiler chicks. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 67, n. 1, p. 72-78, 2022.

ENGLAND, E.M.; MATARNEH, S.K.; SCHEFFLER, T.L.; WACHET, C.; GERRARD, D.E. pH inactivation of phosphofructokinase arrests postmortem glycolysis. **Meat Science**, v. 98, p. 850-857, 2014.

ERINLE, T.J.; MACISAAC, J.; YANG, C.; ADEWOLE, D.I. Effect of red osier dogwood extract on growth performance, blood biochemical parameters, and gut functionality of broiler chickens challenged or unchallenged intraperitoneally with *Salmonella Enteritidis* lipopolysaccharide. **Poultry Science**, v. 101, n. 7, 2022.

ESTEVEZ, M. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. **Poultry Science**, v. 94, p. 1368-1378, 2015.

FARAHAT, M.; ABDALLAH, F.; ABDEL-HAMID, T.; HERNANDEZ-SANTANA, A. Effect of supplementing broiler chicken diets with green tea extract on the growth performance, lipid profile, antioxidant status and immune response. **British Poultry Science**, v. 117, p. 339-343, 2016.

FARIAS, N.N.P.; FREITAS, E.R.; GOMES, H.M.; SOUZA, D.H.; SANTOS, E.O. DOS; AGUIAR, G.C.; WATANABE, P.H. Ethanolic extract of mango seed in feeding of broilers: phenolic compounds, antioxidant activity and meat quality. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 98, p. 445-467, 2019.

FARIAS, N.N.P.; FREITAS, E.R.; NEPOMUCENO, R.C.; MARQUES GOMES, H.; SOUZA, D.H.; COSTA, M.K. DE O.; WATANABE, P.H. Ethanolic extract of mango seed in broiler feed: Effect on productive performance, segments of the digestive tract and blood parameters. **Animal Feed Science and Technology**, v. 279, p. 114999, 2021.

FATEMI, S. A.; ELLIOTT, K. E. C.; BELLO, A.; PEEBLES, E. D. Effects of the in ovo injection of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in Ross 708 broilers subsequently challenged with coccidiosis. I. performance, meat yield and intestinal lesion incidence. **Poultry Science**, v. 100, n. 10, p. 101382, 2021.

FAUSTMAN, C.; CASSENS, R. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. **J. Muscle Foods**, v. 1, p. 217–243, 1990.

FERLAND, G. The discovery of vitamin K and its clinical applications. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, p. 213-218, 2012.

FERREIRA, C. S.; VASCONCELLOS, R. S.; PEDREIRA, R. S.; SILVA, F. L.; SÁ, F. C.; KROLL, F. S. A.; MARIA, A. P. J.; VENTURINI, K. S.; CARCIOFI, A. C. Alterations to oxidative stress markers in dogs after a short-term stress during transport. **Journal of Nutritional Science**, v. 3, n. 27, p. 1-5, 2014.

FILAIRE, E.; TOUMI, H. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: friend or enemy? **Joint Bone Spine**, v. 79, p. 341–346, 2012.

FLEET, J. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3215–3218, 2004.

FLEMING, R. Nutritional factors affecting poultry bone health: Symposium on 'Diet and bone health'. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 2, p. 177-183, 2008.

FLEMING, R. H.; MCCORMACK, H. A.; MCTEIR, L.; WHITEHEAD, C. C. Effects of dietary particulate limestone, vitamin K3 and fluoride and photostimulation on skeletal morphology and osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science**, v. 44, p. 683-689, 2003.

FONTANI, F.; MARCUCCI, G.; IANTOMASI, T.; BRANDI, M. L.; VINCENZINI, M. T. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: involvement of JNK and ERK1/2 signalling. **Calcified Tissue International**, v. 96, p. 335–346, 2015.

FRASER, W.; MILAN, A. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties and developments. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 118-127, 2013.

FREITAS, E. R.; BORGES, A. S.; PEREIRA, A. L.; ABREU, V. K.; TREVISAN, M. T.; WATANABE, P. H. Effect of dietary ethanol extracts of mango (*Mangifera indica* L.) on lipid oxidation and the color of chicken meat during frozen storage. **Poultry Science**, v. 94, p. 2989-2995, 2015.

FRITTS, C.A., WALDROUP, P.W. Comparison of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in broiler diets designed to minimize phosphorus excretion. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, p. 156-166, 2005.

GALVÃO, L.O.; GALVÃO, M.F.; REIS, C.M.S.; BATISTA, C.M.; CASULARI, E.L.A. Considerações atuais sobre a vitamina D. **Brasília Médica**, v.50, n.4, p.324-332, 2013.

GAO, H.; ZHANG, Y.; LIU, K.; FAN, R.; LI, Q.; ZHOU, Z. Dietary sodium butyrate and/or vitamin D3 supplementation alters growth performance, meat quality, chemical composition, and oxidative stability in broilers. **Food Chemistry**, v. 390, p.133-138. 2022.

GARCIA, A. F. Q. M. **Utilização de vitamina D e seus metabólitos na alimentação de frangos de corte**. 2012. 74 f. Dissertação. (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 2012.

GARCIA, A.F., MURAKAMI, A. E., DUARTE, C. R., ROJAS, I. C., PICOLI, K. P., PUZOTTI, M. M. Use of vitamin D3 and its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. **Asian Australas J. Anim. Sci.**, v. 26, p. 408-415, 2013.

GARCIA, L. A.; KING, K. K.; FERRINI, M. G.; NORRIS, K. C.; ARTAZA, J. N. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 152, p. 2976–2986, 2011.

GARCION, E.; SINDJI, L.; LEBLONDEL, G.; BRACHET, P.; DARCY, F. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of γ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, p. 859-866, 1999.

GIRGIS, C. M.; CLIFTON-BLIGH, R. J.; HAMRICK, M. W.; HOLICK, M. F.; GUNTON, J. E. The roles of vitamin D in skeletal muscle: form, function, and metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 34, p. 33–83, 2013.

GLANCY, B.; BALABAN, R. S. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. **Biochemistry**, v. 51, n. 14, p. 2959–2973, 2012.

GLERUP, H.; MIKKELSEN, K.; POULSEN, L. Hypovitaminosis D myopathy without biochemical signs of osteomalacic bone involvement. **Calcified Tissue International**, v. 66, p. 419–424, 2000.

GÓMEZ-VERDUZCO, G.; MORALES-LÓPEZ, R.; AVILA-GONZÁLEZ, E. Use of 25-hydroxycholecalciferol in diets of broiler chickens: effects on growth performance, immunity and bone calcification. **The Journal of Poultry Science**, 2013, v. 58, p. 445–456.

GONZÁLEZ-CERÓN, F.; REKAYA, R.; ANTHONY, N. B.; AGGREY, S. E. Genetic analysis of leg problems and growth in a random mating broiler population. **Poultry Science**, v. 94, p. 162–168, 2015.

GRATTA, F.; BIROLO, M.; SACCHETTO, R.; RADAELLI, G.; XICCATO, G.; BALLARIN, C.; BERTOTTO, D.; PICCIRILLO, A.; PETRACCI, M.; MAERTENS, L.; TROCINO, A. Effect of feed restriction timing on live performance, breast myopathy occurrence, and muscle fiber degeneration in 2 broiler chicken genetic lines. **Poultry Science**, v. 98, p. 5465–5476, 2019.

GRIFFIN, J. R.; MORAES, L.; WICK, M.; LILBURN, M. S. Onset of white striping and progression into wooden breast as defined by myopathic changes underlying Pectoralis major growth. Estimation of growth parameters as predictors for stage of myopathy progression. **Avian Pathology**, v. 47, p. 2–13, 2018.

GUO, Z.; LI, J.; ZHANG, L.; JIANG, Y.; GAO, F.; ZHOU, G. H. Effects of alpha-lipoic acid supplementation in different stages on growth performance, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 55, p. 635–643, 2014.

GUO, S.; XU, J.; LI, Y.; BI, Y.; HOU, Y.; DING, B. Interactive effects of dietary vitamin K3 and *Bacillus subtilis* PB6 on the growth performance and tibia quality of broiler chickens with sex separate rearing. **Animal**, v. 14, n. 8, p. 1610–1618, 2020.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601–617, 1995.

HAMIDI, M. S.; GAJIC-VELJANOSKI, O.; CHEUNG, A. M. Vitamin K and bone health. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 16, p. 409–413, 2013.

HAN, J. C.; CHEN, G. H.; WANG, J. G.; ZHANG, J. L.; QU, H. X.; ZHANG, C. M.; YAN, Y. F.; CHENG, Y. H. Evaluation of relative bioavailability of 25-hydroxycholecalciferol to cholecalciferol for broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, p. 1145–1151, 2016.

- HAN, J. C.; WANG, Y. L.; QU, H. X.; LIANG, F.; ZHANG, J. L.; SHI, C. X.; DONG, X. S.; CHENG, Y. H. One alpha-hydroxycholecalciferol improves growth performance, tibia quality, and meat color of broilers fed calcium- and phosphorus-deficient diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, p. 267-271, 2012.
- HANCZAKOWSKA, E.; ŚWIĄTKIEWICZ, M.; GRELA, E. R. Effect of dietary inclusion of a herbal extract mixture and different oils on pig performance and meat quality. **Meat Science**, v. 108, p. 61-66, 2015.
- HAUSSLER, M. R.; WHITFIELD, G. K.; KANEKO, I.; HAUSSLER, C. A.; HSIEH, D.; HSIEH, J. C.; JURUTKA, P. W. Molecular mechanisms of vitamin D action. **Calcified Tissue International**, v. 92, p. 77-98, 2013.
- HEKIMI, J. L.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a 'good' look at free radicals in the aging process. **Trends in Cell Biology**, v. 21, p. 569-576, 2011.
- HINEK, A.; POOLE, A. R. The influence of vitamin D metabolites on the calcification of cartilage matrix and the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 3, p. 421-429, 1988.
- HOSEINIFAR SH, YOUSEFI S, VAN DOAN H, ASHOURI G, GIOACCHINI G, MARADONNA F, CARNEVALI O. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**. P. 1–20, 2020.
- HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M.F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, n.07, p. 720- 755, 2013.
- HOSSEINI-VASHAN, S. J., GOLIAN, A., YAGHOB FAR, A. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n.8, p. 1183-1192, 2016.
- HSIAO, F. S.-H., CHENG, Y.-H., HAN, J.-C., CHANG, M.-H., YU, Y.-H. Effect of different vitamin D3 metabolites on intestinal calcium homeostasis-related gene expression in broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47. 2018.
- HUTTON, K. C., VAUGHN, M.A., LITTA, G., TURNER, J., STARKEY, J.D. Effect of vitamin D status improvement with 25-hydroxycholecalciferol on skeletal muscle growth characteristics and satellite cell activity in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 8, p. 3291-3299, 2014.
- JACKSON, M.J., VASILAKI, A., MCARDLE, A. Cellular mechanisms underlying oxidative stress in human exercise. **Free Radic. Biol. Med.** v. 98, p. 13–17, 2016.
- JANG, A.; LIU, X.-D.; SHIN, M.-H.; LEE, B.-D.; LEE, S.-K.; LEE, J.H.; JO, C. Antioxidative Potential of Raw Breast Meat from Broiler Chicks Fed a Dietary Medicinal Herb Extract Mix. **Poultry Science**, v. 87, p. 2382–2389, 2008.
- JESUS, D. N. C. **Avaliação dos efeitos da adição do óleo essencial de orégano (origanum vulgare) na dieta, sobre a fisiologia e a produtividade de codornas japonesas (Coturnix**

Coturnix Japonica). 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

JILKA, R.L., NOBLE, B., WEINSTEIN, R.S. Osteocyte apoptosis. **Bone**. v. 54, p. 264–271, 2013.

JORGE, J.L.; CORDEIRO, J. R.; ROSA, M. L. G.; BIANCHI, D. B. C. Deficiência da Vitamina D e Doenças Cardiovasculares. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 4, p.422-432, 2018.

JUDGE, M., REEVES, E., ABERLE E. Effect of electrical stimulation on thermal shrink age temperature of bovine muscle collagen. **J. Anim. Sci.** v, 52, p. 530–534, 1981.

JULIAN, R. J. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry – A review. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 350–369, 2005.

JUNTACHOTE, T., BERGHOFER, E., SIEBENHANDL, S., BAUER, F. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. **Meat Sci.** v. 72, n. 3, p. 446-56, 2006.

KARRE, L.; KELLY, K. L.; GETTY, J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, n. 2, p. 220–227, 2013.

KAWAMURA, F.; NAKANISHI, M.; HIRASHIMA, N. Effects of menadione, a reactive oxygen generator, on leukotriene secretion from RBL-2H3 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 881-885, 2010.

KHAN, R. U.; NAZ, S.; ULLAH, H.; KHAN, N. A.; LAUDADIO, V.; RAGNI, M.; PIEMONTESE, L.; TUFARELLI, V. Dietary vitamin D: growth, physiological and health consequences in broiler production. **Animal Biotechnology**, v. 30, p. 1-7, 2021.

KHAN, S. H.; SHAHID, R.; MIAN, A. A.; SARDAR, R.; ANJUM, M. A. Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 584-593, 2010.

KIDO, S.; KANEKO, I.; TATSUMI, S.; SEGAWA, H.; MIYAMOTO, K. Vitamin D and type II sodium-dependent phosphate cotransporters. **Contributions to Nephrology**, v. 180, p. 86–97, 2013.

KIERSZENBAUM, A. L. Tecidos conjuntivos. In: KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 133-144, 2008.

KIM, J. E.; CLARK, R. M.; PARK, Y.; LEE, J.; FERNANDEZ, M. L. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, p. 113–119, 2012.

- KIM, M.; NA, W.; SOHN, C. Vitamin K1 (phylloquinone) and K2 (menaquinone-4) supplementation improves bone formation in a high-fat diet-induced obese mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 108–113, 2013.
- KORVER, D. Reducing the incidence of black bone. **World Poultry**, v. 26, p. 36-38, 2010.
- KUMAR, F.; TYAGI, P. K.; MIR, N. A.; DEV, K.; BEGUM, J.; BISWAS, A.; et al. Dietary flaxseed and turmeric is a novel strategy to enrich chicken meat with long chain ω -3 polyunsaturated fatty acids with better oxidative stability and functional properties. **Food Chemistry**, v. 305, Article 125458, 2020.
- KUTTAPPAN, V. A.; MANANGI, M.; BEKKER, M.; CHEN, J.; VAZQUEZ-ANON, M. Nutritional intervention strategies using dietary antioxidants and organic trace minerals to reduce the incidence of wooden breast and other carcass quality defects in broiler birds. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 663409, 2021.
- KUTTAPPAN, V. A.; HARGIS, B. M.; OWENS, C. M. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. **Poultry Science**, v. 95, n. 11, p. 2724–2733, 2016.
- KUTTAPPAN, V. A.; OWENS, C. M.; COON, C.; HARGIS, B. M.; VAZQUEZ-ANON, M. Incidence of broiler breast myopathies at different ages and its impact on selected raw meat quality parameters. **Poultry Science**, v. 96, n. 8, p. 3005–3009, 2017.
- LACKNER, J.; HESS, V.; STEF, L.; SAUERWEIN, H. Effects of feeding different histidine to lysine ratios on performance, meat quality, and the occurrence of breast myopathies in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 101, p. 101568, 2022.
- LAHUCKY, R.; BAHNELKA, I.; KUECHENMEISTER, U.; VASICKOVA, K.; NUERNBERG, K.; ENDER, K.; NUERNBERG, G. Effects of dietary supplementation of vitamins D3 and E on quality characteristics of pigs and longissimus muscle antioxidative capacity. **Meat Science**, v. 77, p. 264–268, 2007.
- LANHAM, S.; CAGAMPANG, F. R.; OREFFO, R. O. C. Maternal high fat diet affects offspring's vitamin K-dependent proteins expression levels. **PLoS One**, 2015.
- LATHAM, C. M.; BRIGHTWELL, C. R.; KEEBLE, A. R.; MUNSON, B. D.; THOMAS, N. T.; ZAGZOOG, A. M.; FRY, S. C.; FRY, J. L. Vitamin D promotes skeletal muscle regeneration and mitochondrial health. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 660498, 2021.
- LEDWABA, M. F.; ROBERSON, K. D. Effectiveness of twenty-five hydroxycholecalciferol in the prevention of tibial dyschondroplasia in Ross cockerels depends on dietary calcium level. **Poultry Science**, v. 82, p. 1769-1777, 2003.
- LEE, K. W.; KIM, J. S.; OH, S. T.; KANG, C. W.; AN, B. K. Effects of dietary sanguinarine on growth performance, relative organ weight, cecal microflora, serum cholesterol level and meat quality in broiler chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 52, p. 15-22, 2015.
- LEE, N. K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J. D.; CONFAVREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P. J.; MCKEE, M. D.; JUNG, D. Y.; ZHANG, Z.; KIM, J. K.;

MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, p. 456–469, 2007.

LEE, S.-K.; CHON, J.-W.; YUN, Y.-K.; LEE, J.-C.; JO, C.; SONG, K.-Y.; KIM, D.-H.; BAE, D.; KIM, H.; MOON, J.-S.; SEO, K.-H. Properties of broiler breast meat with pale color and a new approach for evaluating meat freshness in poultry processing plants. **Poultry Science**, v. 101, p. 101627, 2022.

LENGKIDWORRAPHIPHAT, P.; WONGPOOMCHAI, R.; TAYA, S.; JATURASITHA, S. Effect of genotypes on macronutrients and antioxidant capacity of chicken breast meat. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 11, p. 1817-1823, 2020.

LEVINGER, I.; SCOTT, D.; NICHOLSON, G. C.; STUART, A. L.; DUQUE, G.; MCCORQUODALE, T.; HERRMANN, M.; EBELING, P. R.; SANDERS, K. M. Undercarboxylated osteocalcin, muscle strength and indices of bone health in older women. **Bone**, v. 64, p. 8-12, 2014.

LI, W.; ZHANG, S.; LIU, J.; LIU, Y.; LIANG, Q. Vitamin K2 stimulates MC3T3-E1 osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 5, p. 3676-3684, 2019.

LIN, H. D.; EDDY, A. N. D.; JOHAN, B. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 144, p. 11-17, 2006.

LIU, H. S.; MAHFUZ, S. U.; WU, D.; SHANG, Q. H.; PIAO, X. S. Effect of chestnut wood extract on performance, meat quality, antioxidant status, immune function, and cholesterol metabolism in broilers. **Poultry Science**, v. 99, n. 9, p. 4488-4495, 2020.

LIU, X.; PENG, C.; QU, X.; GUO, S.; CHEN, J. F.; HE, C.; ZHU, S. Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 on production, hatching performance, egg quality, serum antioxidant capacity and immune response of laying breeders. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, p. 182–190, 2019.

LIU, Y.; MOSENTHIN, R.; ZHAO, L.; ZHANG, J.; JI, C.; MA, Q. Vitamin K alleviates bone calcium loss caused by *Salmonella Enteritidis* through carboxylation of osteocalcin. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, p. 80, 2021.

LOMBARDI, G.; PEREGO, S.; LUZI, L.; BANFI, G. A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles. **Endocrine Journal**, v. 48, n. 2, p. 394–404, 2015.

LONG, S. F.; HE, T. F.; WU, D.; YANG, M.; PIAO, X. S. *Forsythia suspensa* extract enhances performance via the improvement of nutrient digestibility, antioxidant status, anti-inflammatory function, and gut morphology in broilers. **Poultry Science**, v. 99, p. 4217-4226, 2020.

LU, T.; HARPER, A. F.; ZHAO, J.; DALLOUL, R. A. Effects of a dietary antioxidant blend and vitamin E on growth performance, oxidative status, and meat quality in broiler chickens fed a diet high in oxidants. **Poultry Science**, v. 93, p. 1649-1657, 2014.

LYON, C. E.; LYON, B. G.; DICKENS, J. A. Effects of carcass stimulation, deboning time, and marination on color and texture of broiler breast meat. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 1, p. 53-60, 1998.

MABELEBELE, M.; NG'AMBI, J. W.; NORRIS, D. Effect of dietary vitamin D3 supplementation on meat quality of naked neck chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 3576-3582, 2013.

MAGALHÃES, N.; CARVALHO, F.; DINIS-OLIVEIRA, R. J. Human and experimental toxicology of diquat poisoning: toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, p. 1131-1160, 2018.

MAGANHINI, M. B.; MARIANO, B.; SOARES, A. L.; GUARNIERI, P. D.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, supl., p. 69-72, 2007.

MAHARJAN, P.; BEITIA, A.; WEIL, J.; SUESUTTAJIT, N.; HILTON, K.; CALDAS, J.; UMBERSON, C.; MARTINEZ, D.; KONG, B.; OWENS, C. M.; COON, C. Woody breast myopathy broiler show age-dependent adaptive differential gene expression in *Pectoralis major* and altered in-vivo triglyceride kinetics in adipogenic tissues. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, 2021.

MARTINS, J. M. S.; DOS SANTOS NETO, L. D.; NOLETO-MENDONÇA, R. A.; DE CARVALHO, G. B.; SGAVIOLI, S.; BARROS DE CARVALHO, F.; CAFÉ, M. B. Dietary supplementation with glycosaminoglycans reduces locomotor problems in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 12, p. 6974-6982, 2020.

MAZUR-KUŚNIREK, M.; ANTOSZKIEWICZ, Z.; LIPÍŃSKI, K.; KALINIEWICZ, J.; KOTLARCZYK, S. The effect of polyphenols and vitamin E on the antioxidant status and meat quality of broiler chickens fed low-quality oil. **Archives Animal Breeding**, v. 62, n. 1, p. 287-296, 2019.

MCDOWELL, L. R. **Vitamin in Animal Nutrition**, Academic Press, 1989, p. 93-131.

MELO, M. C. A.; GOMES, H. M.; FARIA, N. N. P.; FREITAS, E. R.; WATANABE, P. H.; WATANABE, G. C. A.; FERNANDES, D. R. Black bone syndrome in broilers fed ethanolic extract of mango seeds. **Poultry Science**, v. 99, n. 6, p. 3229-3236, 2020.

MISHRA, B.; JHA, R. Oxidative stress in the poultry gut: potential challenges and interventions. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 60, 2019.

MONTGOMERY, J. L.; PARRISH, F. C. JR; BEITZ, D. C.; HORST, R. L.; HUFF-LONERGAN, E. J.; TRENKLE, A. H. The use of vitamin D3 to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2615-2621, 2000.

MOOPANAR, T. R.; ALLEN, D. G. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 °C. **Journal of Physiology**, v. 564, p. 189-199, 2005.

- MORDENTI, A.; MARCHETTI, M. Use of vitamins for nonconventional purpose. In: **Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress**, Bologna, Italy, p. 39–44, 1996.
- MOREIRA, R. O.; BALDUÍNO, A.; MARTINS, H.; REIS, J.; DUARTE, M.; FARIAS, M.; BOROJEVIC, R. Ribavirin, but not Interferon- α , is associated with impaired osteoblast proliferation and differentiation in vitro. **Calcified Tissue International**, v. 75, n. 2, p. 160–168, 2004.
- MORRIS, A.; SHANMUGASUNDARAM, R.; LILBURN, M. S.; SELVARAJ, R. K. 25-Hydroxycholecalciferol supplementation improves growth performance and decreases inflammation during an experimental lipopolysaccharide injection. **Poultry Science**, v. 93, p. 1951–1956, 2014.
- MOSELHY, H. F.; REID, R. G.; YOUSEF, S.; BOYLE, S. P. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 3, p. 852–858, 2013.
- MOTA, M. M.; HERMES, R. G.; ARAÚJO, C. S. S.; PEREIRA, A. S. C.; ULTIMI, N. B. P.; LEITE, B. G. S.; ARAÚJO, L. F. Effects on meat quality and black bone incidence of elevated dietary vitamin levels in broiler diets challenged with aflatoxin. **Animal**, v. 13, p. 1–7, 2019.
- MUNIYAPPAN, M.; JEON, S. Y.; CHOI, M. K.; KIM, I. H. Dietary inclusion of *Achyranthes japonica* extract to corn-soybean meal-wheat-based diet on the growth performance, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, p. 101852, 2022.
- MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021.
- MUTRYN, M. F. M.; BRANNICK, E. M.; FU, W.; LEE, W. R.; ABASHT, B. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 399, 2015.
- NÄÄS, I. A. Deficiências locomotoras em frangos de corte e bem-estar animal. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n. 2, 2008.
- NAIR, S. P.; MEGHJI, S.; WILSON, M.; REDDI, K.; WHITE, P.; HENDERSON, B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2371–2380, 1996.
- NOOR, S.; RADHAKRISHNAN, N. S.; HUSSAIN, K. Emerging trends and technologies adopted for tenderization of meat: a review. **International Journal of Biotech Trends and Technology**, v. 6, n. 4, 2016.
- OHSAKI, Y.; SHIRAKAWA, H.; MIURA, A.; GIRIWONO, P. E.; SATO, S.; OHASHI, A.; KOMAI, M. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation

of nuclear factor B through the repression of IKK α/β phosphorylation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 1120-1126, 2010.

OVIEDO-RONDÓN, E. O.; FERKET, P. R.; HAVESTEIN, G. B. Nutritional factors that affect leg problems in broilers and turkeys. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 17, p. 89-103, 2006.

OWENS, D. J.; SHARPLES, A. P.; POLYDOROU, I.; ALWAN, N.; DONOVAN, T.; TANG, J.; FRASER, W. D.; COOPER, R. G.; MORTON, J. P.; STEWART, C.; CLOSE, G. L. A systems-based investigation into vitamin D and skeletal muscle repair, regeneration, and hypertrophy. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, p. E1019–E1031, 2015.

PART, C. E.; EDWARDS, P.; HAJAT, S.; COLLINS, L. M. Prevalence rates of health and welfare conditions in broiler chickens change with weather in a temperate climate. **Royal Society Open Science**, v. 3, e160197, 2016.

PARKER, T. L.; WANG, X. H.; PAZMIÑO, J.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity and phenolic content of grapes, sun-dried raisins, and golden raisins and their effect on ex vivo serum antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8472–8477, 2007.

PEARSON, D. A. Bone health and osteoporosis: the role of vitamin K and potential antagonism by anticoagulants. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22, n. 5, p. 517-544, 2007.

PEDROSA, M. A. C.; CASTRO, M. L. Papel da vitamina D na função neuro-muscular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 4, p. 495-502, 2005.

PERAI, A. H.; KERMANSHAHI, H.; NASSIRI MOGHADDAM, H.; ZARBAN, A. Effects of supplemental vitamin C and chromium on metabolic and hormonal responses, antioxidant status, and tonic immobility reactions of transported broiler chickens. **Biological Trace Element Research**, v. 157, p. 224-233, 2014.

PETRACCI, M.; BIANCHI, M.; CAVANI, C. The European perspective on pale, soft, exudative conditions in poultry. **Poultry Science**, v. 88, p. 1518-1523, 2009.

PETRACCI, M.; SOGLIA, F.; MADRUGA, M.; CARVALHO, L.; IDA, E.; ESTÉVEZ, M. Wooden breast, white striping, and spaghetti meat: causes, consequences and consumer perception of emerging broiler meat abnormalities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2019.

PETRACCI, M.; CAVANI, C. Muscle growth and poultry meat quality issues. **Nutrients**, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2012.

PICOU, F.; VIGNON, C.; DEBEISSAT, C.; LACHOT, S.; KOSMIDER, O.; GALLAY, N.; FOUCAULT, A.; ESTIENNE, M. H.; RAVALET, N.; BENE, M. C.; DOMENECH, J.; GYAN, E.; FONTENAY, M.; HERAULT, O. Bone marrow oxidative stress and specific antioxidant signatures in myelodysplastic syndromes. **Blood Advances**, v. 3, n. 24, p. 4271-4279, 2019.

POINTON, J. J.; FRANCIS, M. J.; SMITH, R. Effect of vitamin D deficiency on sarcoplasmic reticulum function and troponin C concentration of rabbit skeletal muscle. **Clinical Science**, v. 57, p. 257-263, 1979.

POON, C. C.; LI, R. W.; SETO, S. W.; KONG, S. K.; HO, H. P.; HOI, M. P.; LEE, S. M.; NGAI, S. M.; CHAN, S. W.; LEUNG, G. P.; KWAN, Y. W. In vitro vitamin K2 and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 combination enhances osteoblasts anabolism of diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 3, p. 448-4456, 2015.

PROKOSKI, K.; BITTENCOURT, L. C.; TEIXEIRA, L. V.; BORTOLUZZI, C.; VANROO, E.; PALMA, S.; FERNANDES, J. I. M. Classic and non-classic effects of the duration of supplementation of 25-hydroxicholecalciferol in broiler chicken diets. **Animals**, v. 11, p. 2971, 2021.

RADAELLI, G.; PICCIRILLO, A.; BIROLO, M.; BERTOTTO, D.; GRATTA, F.; BALLARIN, C.; VASCELLARI, M.; XICCATO, G.; TROCINO, A. Effect of age on the occurrence of muscle fiber degeneration associated with myopathies in broiler chickens submitted to feed restriction. **Poultry Science**, v. 96, p. 309–319, 2017.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, p. 761264, 2014.

RAMA RAO, S. V.; RAJU, M. V. L. N.; PANDA, A. K.; SHYAM SUNDER, G.; SHARMA, R. P. Performance and bone mineralisation in broiler chicks fed on diets with different concentrations of cholecalciferol at a constant ratio of calcium to non-phytate phosphorus. **British Poultry Science**, v. 504, p. 528-535, 2019.

RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; BALOG, J.M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1024-1032, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS^{o+} radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REDDY, D.M., REDDY, G.V.B., MANDAL, P.K. Application of Natural Antioxidants in Meat and Meat Products-A Review. **Food Nutr J**: FDNJ-173, 2018.

REGASSA, A., ADHIKARI, R., NYACHOTI, C.M., KIM W.K. Effects of 25-(OH)D3 on fecal Ca and P excretion, bone mineralization, Ca and P transporter mRNA expression and performance in growing female pigs. **J. Environ. Sci. Health B**, v. 50, p. 293-299. 2015.

REN, Z.Z. ZENG Q.F. WANG, J.P. DING, X.M. BAI, S.P. SU, Z.W. XUAN, Y. ZHANG K.Y. Effects of maternal dietary canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on antioxidant status and calcium-phosphate metabolism of progeny ducks. **Poult. Sci.**, v.97, p. 1361-1367, 2018.

RIBEIRO, M.V.I., BITTENCOURT, L.C., HERMES, R.G. RÖNNAU, M., RORIG, A., LIMA F.K., FERNANDES, J.I.M. Mineral Source and Vitamin Level in Broiler Diets:

Effects on Performance, Yield, and Meat Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 37, p. 333-350, 2020.

RIBEIRO, M. V., CRISTO, A. B. D., BORDIGNON, H. L. F., SIMÕES, E. P., BITTENCOURT, L. C., FERNANDES, J. I. M. Supplementation of minerals and vitamins in broiler diets: effect on performance and bone quality. **Ciência Animal Brasileira**, v. 22, 2021.

RIBEIRO, S.M.R.; BARBOSA, L.C.A.; QUEIROZ, J.H.; KNODLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v.110, n.3, p.620–626, 2008.

RODRIGUES, B.B.; CORRÊA, G. N.; NUNUES NETO, G. A. X.; BORGES, N. M. P.; SILVA, M. P.; FERNANDES, R. F. D. Vitamina D na regulação do organismo humano e implicações de sua deficiência corporal. **Braz. J. Hea. Rev.**, v. 2, n. 5, p. 4682-4692, 2019.

RONNING, S.B., PEDERSEN, M.E., BERG, R.S., KIRKHUS, B., RØDBOTTEN, R. Vitamin K2 improves proliferation and migration of bovine skeletal muscle cells in vitro. **PLoS One**. v. 5, p. 4-13, 2018.

ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., AND DONZELE, J.L. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, 2011.

ROWE, L. J.; MADDOCK, K.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3254–3266, 2004.

RUBINACCI, A. Expanding the functional spectrum of vitamin K in bone: focus on: vitamin K promotes mineralization, osteoblast to osteocyte transition, and an anti-catabolic phenotype by γ -carboxylation-dependent and -independent mechanisms. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 297, p. 1336-1338, 2009.

RUDOLF, R.; MONGILLO, M.; MAGALHAES, P. J.; POZZAN, T. In vivo monitoring of Ca^{2+} uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. **Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 4, p. 527–536, 2004.

RYU, C.; RHEE, M. S.; LEE, K. M.; KIM, B. C. Effects of different levels of dietary supplemental selenium on performance, lipid oxidation, and color stability of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 84, p. 809-815, 2005.

SALLES, G. B. C.; BOIAGO, M. M.; SILVA, A. D.; MORSCH, V. M.; GRIS, A.; MENDES, R. E.; DA SILVA, A. S. Lipid peroxidation and protein oxidation in broiler breast fillets with white striping myopathy. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 4, e12792, 2019.

SANCHEZ-VALLE, V.; CHAVEZ-TAPIA, N. C.; URIBE, M.; MENDEZ-SANCHEZ, N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4850-4860, 2012.

SARDAR, S.; CHAKRABORTY, A.; CHATTERJEE, M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 66, p. 39-45, 1995.

STANQUEVIS, C. E.; MARCATO, S. M.; FURLAN, A. C.; PERINE, T. P.; BATISTA, E.; GRIESER, D. O.; ZANCANELA, V.; BENITE, M. I. Níveis de suplementação de vitamina K para codornas de corte em crescimento de 15 a 35 dias de idade. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 1006-1012, 2017.

SAVARIS, V. D. L.; BROCH, J.; SOUZA, C.; JUNIOR, N. R.; AVILA, A. S.; POLESE, C.; KAUFMANN, C.; CARVALHO, P. L. O. C.; POZZA, P. C.; VIEITES, F. M.; NUNES, R. V. Effects of vitamin A on carcass and meat quality of broilers. **Poultry Science**, v. 100, n. 12, 2021.

SHANMUGASUNDARAM, R.; SELVARAJ, R. K. Vitamin D-1alpha-hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase mRNA studies in chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 1819–1824, 2012.

SHAO, Y.; WEN, Q.; ZHANG, S.; LU, L.; ZHANG, L.; LIAO, X.; LUO, X. Dietary supplemental vitamin D3 enhances phosphorus absorption and utilisation by regulating gene expression of related phosphate transporters in the small intestine of broilers. **British Journal of Nutrition**, v. 121, p. 9–21, 2018.

SHIM, M. Y.; KARNUAH, A. B.; ANTHONY, N. B.; PESTI, G. M.; AGGREY, S. E. The effects of broiler chicken growth rate on valgus, varus, and tibial dyschondroplasia. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 62–65, 2012.

SIHVO, H. K.; IMMONEN, K.; PUOLANNE, E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the *pectoralis major* muscle of broilers. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 3, p. 619–623, 2014.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-175, 1999.

SINHA, A.; HOLLINGSWORTH, K. G.; BALL, S.; CHEETHAM, T. Improving the vitamin D status of vitamin D deficient adults is associated with improved mitochondrial oxidative function in skeletal muscle. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, p. E509–E513, 2013.

SMITH, C.; LIN, X.; SCOTT, D.; BRENNAN-SPERANZA, T. C.; AL SAEDI, A.; MORENO-ASSO, A.; WOESSNER, M.; HASSAN, E. B.; EYNON, N.; DUQUE, G.; LEVINGER, I. Uncovering the bone-muscle interaction and its implications for the health and function of older adults (The Wellderly Project): protocol for a randomized controlled crossover trial. **JMIR Research Protocols**, v. 10, n. 4, e18777, 2021.

SOGLIA, F.; MAZZONI, M.; PETRACCI, M. Spotlight on avian pathology: current growth-related breast meat abnormalities in broiler. **Avian Pathology**, v. 48, p. 1-3, 2019.

- SOLEIMANI, A. F.; ZULKIFLI, I.; OMAR, A. R.; RAHA, A. R. Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. **Poultry Science**, v. 90, p. 1435–1440, 2011.
- SONG, Z. H.; CHENG, K.; ZHENG, X. C.; AHMAD, H.; ZHANG, L. L.; WANG, T. Effects of dietary supplementation with enzymatically treated *Artemisia annua* on growth performance, intestinal morphology, digestive enzyme activities, immunity, and antioxidant capacity of heat-stressed broilers. **Poultry Science**, v. 97, p. 430–437, 2018.
- SRIKUEA, R.; HIRUNSAI, M. Effects of intramuscular administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ during skeletal muscle regeneration on regenerative capacity, muscular fibrosis, and angiogenesis. **Journal of Applied Physiology**, v. 120, p. 1381–1393, 2016.
- SRIKUEA, R.; ZHANG, X.; PARK-SARGE, O. K.; ESSER, K. A. VDR and CYP27B1 are expressed in C2C12 cells and regenerating skeletal muscle: potential role in suppression of myoblast proliferation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 303, p. C396–C405, 2012.
- ST-ARNAUD, R.; ARABIAN, A.; TRAVERS, R.; BARLETTA, F.; RAVAL-PANDYA, M.; CHAPIN, K.; DEPOVERE, J.; MATHIEU, C.; CHRISTAKOS, S.; DEMAY, M. B.; GLORIEUX, F. H. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. **Endocrinology**, v. 141, p. 2658–2666, 2000.
- STAFFORD, D. W. The vitamin K cycle. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2005.
- STARKEY, J. D. Triennial growth symposium—A role for vitamin D in skeletal muscle development and growth. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 3, 2014.
- STOCK, M.; SCHETT, G. Vitamin K-dependent proteins in skeletal development and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9328, 2021.
- SU, X.; WANG, W.; FANG, C.; NI, C.; ZHOU, J.; WANG, X.; ZHANG, L.; XU, X.; CAO, R.; LANG, H.; WANG, F. Vitamin K2 alleviates insulin resistance in skeletal muscle by improving mitochondrial function via SIRT1 signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2019.7908, 2020.
- SUN, Z. W.; YAN, L.; ZHAO, J. P.; LIN, H.; GUO, Y. M. Increasing dietary vitamin D3 improves the walking ability and welfare status of broiler chickens reared at high stocking densities. **Poultry Science**, v. 92, p. 3071–3079, 2013.
- SURAI, P. F.; KOCHISH, I. I.; FISININ, V. I.; KIDD, M. T. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: an update. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, p. 235, 2019.
- SURAI, P. F.; FISININ, V. I. Vitagenes in poultry production. Part 1. Technological and environmental stresses. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, p. 721–733, 2016.
- ŚWIĄTKIEWICZ, S., ARCZEWSKA-WŁOSEK, A., BEDERSKA-LOJEWSKA, D., JÓZEFIK, D. Efficacy of dietary vitamin D and its metabolites in poultry - review and implications of the recent studies. **World's Poultry Science Journal**, 73(1), 57–68, 2017.

TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189-1194, 2009.

TANG, L-P.; LIU, Y-L.; ZHANG, J-X.; DING, K-N.; LU, M-H.; HE, Y-M. Heat stress in broilers of liver injury effects of heat stress on oxidative stress and autophagy in liver of broilers. **Poultry Science**, v. 101, 102085. 2022.

TIZZIANI T., DONZELE, R. F. M. O, DONZELE, J. L., SILVA, A.D., MUNIZ, J. C. L., JACOB, R. F., BRUMANO, G., ALBINO, L. F. T. Reduction of calcium levels in rations supplemented with vitamin D3 or 25-OH-D3 for broilers. **R Bras Zootec.** 48:1–14, 2019.

TOSCANO, M.J., NASR, M.A.F, HOTHERSALL, B. The gait dynamics of the modern broiler chicken: a cautionary tale of selective breeding. **Poultry Science**; 92: 2251–2258, 2013.

VASQUEZ, M. A.; SOTO- SALANOVA, M. F. **Quality Breeding of vitamins is the key to success.** The black – bone – syndrome and its impact on the quality of meat. *Fleischwirtschaft, Alemanha*, v. 89, p. 21 2009.

VAZQUEZ, J.R., GÓMEZ, G.V., LÓPEZ, C.C., CORTÉS, A.C., DÍAZ, A.C., FERNÁNDEZ, S.R.T., AVILA., A.G. Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D3 vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. **J. Anim. Physiol. An. N.**, 102, pp. e493-e497, 2018.

VELDURTHY, V., WEI, R., OZ, L. DHAWAN, P., JEON, Y. H., CHRISTAKOS, S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. **Bone Res** 4, 16041, 2016.

VELLEMAN, S.G. Pectoralis major (breast) muscle extracellular matrix fibrillar collagen modifications associated with the wooden breast fibrotic myopathy in broilers. **Front Physiol**, v. 5, p. 231-256, 2020.

VERMEER, C., JIE, K.S., KNAPEN, M.H. **Role of vitamin K in bone metabolism.** Annual Review of Nutrition, Palo Alto, v.15, p.1-22, 1995.

VERVLOET, M. G.; MASSY, Z. A.; BRANDENBURG, V. M.; MAZZAFERRO, S.; COZZOLINO, M.; UREÑA-TORRES, P.; BOVER, J. M. D.; GOLDSMITH, D. Bone: a new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 2, p. 427-436, 2014.

VEUM, T. L. Phosphorus and calcium nutrition and metabolism. In: VITTI, D. M. S. S.; KEBREAB, E. (Eds.). **Phosphorus and calcium utilisation and requirements in farm animals.** Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 94-111, 2010.

VIGNALE, K.; GREENE, E. S.; CALDAS, J. V.; ENGLAND, J. A.; BOONSINCHAI, N.; SODSEE, P.; POLLOCK, E. D.; DRIDI, S.; COON, C. N. 25-Hydroxycholecalciferol enhances male broiler breast meat yield through the mTOR pathway. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 5, p. 855-863, 2015.

VIZZIER-THAXTON, Y.; CHRISTENSEN, K. D.; MENCH, J. A.; RUMLEY, E. R.; DAUGHERTY, C.; FEINBERG, B.; PARKER, M.; SIEGEL, P.; SCANES, C. G. Symposium: animal welfare challenges for today and tomorrow. **Poultry Science**, v. 95, p. 2198-2207, 2016.

VOS, M.; ESPOSITO, G.; EDIRISINGHE, J. N.; VILAIN, S.; HADDAD, D. M.; SLABBAERT, J. R.; VAN MEENSEL, S.; SCHAAP, O.; DE STROOPER, B.; MEGANATHAN, R.; MORAIS, V. A.; VERSTREKEN, P. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues Pink1 deficiency. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1306–1310, 2012.

WALDENSTEDT, L. Nutritional factors of importance for optimal leg health in broilers: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 126, n. 3-4, p. 0–307, 2006.

WANG, S.; ZHANG, L.; LI, J.; CONG, J.; GAO, F.; ZHOU, G. Effects of dietary marigold extract supplementation on growth performance, pigmentation, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 71–77, 2017.

WARREN, M. F.; VU, T. C.; TOOMER, O. T.; FERNANDEZ, J. D.; LIVINGSTON, K. A. Efficacy of 1- α -hydroxycholecalciferol supplementation in young broiler feed suggests reducing calcium levels at grower phase. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 245, 2020.

WEIMER, L.; ZUELLY, S.; DAVIS, M.; KARCHER, D. M.; ERASMUS, M. A. Differences in carcass composition and meat quality of conventional and slow-growing broiler chickens raised at 2 stocking densities. **Poultry Science**, p. 101833, 2022.

WEN, L.; CHEN, J.; DUAN, L.; LI, S. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health: a review. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 1, p. 3-15, 2018.

WHITEHEAD, C. C. **Update on current european broiler bone problems**. In: 21st Annual 405 australian poultry science symposium, Sydney, New South Wales, 2010, p. 204.

WHITEHEAD, C. C.; MCCORMACK, H. A.; MCTEIR, L.; FLEMING, R. H. High vitamin D3 requirements in broilers for bone quality and prevention of tibial dyschondroplasia and interactions with dietary calcium, available phosphorus and vitamin A. **British Poultry Science**, v. 45, p. 425-436, 2004.

WIDEMAN, R. F.; BLANKENSHIP, J.; PEVZNER, I. Y.; TURNER, B. J. Efficacy of 25-OH vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. **Poultry Science**, v. 94, p. 1821-1827, 2015.

XIE, Q.; XIE, K.; YI, J.; SONG, Z.; ZHANG, H.; HE, X. The effects of magnolol supplementation on growth performance, meat quality, oxidative capacity, and intestinal microbiota in broilers. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, 2022.

YAKOVIICHUK, O. V.; DANCHENKO, O. O.; KURTYAK, B.; NIKOLAEVA, Y.; FEDORKO, A. S.; HALKO, T. Ontogenetic features of redox reactions in the myocardium of geese. **Biologija**, v. 64, p. 259-266, 2018.

YAKOVIICHUK, O. V.; DANCHENKO, O. O.; VOVK, S. O.; SHEVCHUK, T. O.; CHROMYSHEVA, O. O.; MAKSYMOM, O. S.; KULYK, I. O.; HAPONENKO, T. M.; YUSUPOVA, O. V.; BREN, O. G.; FEDORKO, A. S. Menadione sodium bisulfite effect on growth performance and fatty acid profiles of geese muscle tissues. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 11, n. 6, p. 46-53, 2021.

YANG, L.; LIU, G.; ZHU, X.; LUO, Y.; SHANG, Y.; GU, X. L. The anti-inflammatory and antioxidant effects of leonurine hydrochloride after lipopolysaccharide challenge in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 98, p. 1648-1657, 2019.

ZAMBONELLI, P.; ZAPPATERRA, M.; SOGLIA, F.; PETRACCI, M.; SIRRI, F.; CAVANI, C.; DAVOLI, R. Detection of differentially expressed genes in broiler *pectoralis major* muscle affected by White Striping–Wooden Breast myopathies. **Poultry Science**, v. 95, n. 12, p. 2771-2785, 2016.

ZHANG, C.; LI, D.; WANG, F.; DONG, T. Effects of dietary vitamin K levels on bone quality in broilers. **Archives of Animal Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 197-206, 2003.

ZHANG, H.; MAJDEDDIN, M.; GAUBLOMME, D.; TAMINIAU, B.; BOONE, M.; ELEWAUT, D.; DAUBE, G.; JOSIPOVIC, I.; ZHANG, K.; MICHIELS, J. 25-hydroxycholecalciferol reverses heat-induced alterations in bone quality in finisher broilers associated with effects on intestinal integrity and inflammation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, p. 104, 2021.

ZHANG, L.; HE, T.; LI, M.; HU, J.; PIAO, X. Effects of dietary calcium and phosphorus levels and supplementation of 25-hydroxycholecalciferol on performance and bone properties of broiler starters. **Archives of Animal Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 445-456, 2019.

ZHANG, L.H. LIU H.S. LIU, S.J. PIAO X.S. PIAO. Dietary supplementation with 25 hydroxycholecalciferol and phytase in growing-finishing pigs: I. Effects on performance, carcass traits, muscle antioxidant capacity and fatty acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, v. 280, p. 115065, 2021b.

ZHANG, L.H.; HE, T.F.; HU, J.X.; LI, M.; PIAO X.S. Effects of normal and low calcium and phosphorus levels and 25-hydroxycholecalciferol supplementation on performance, serum antioxidant status, meat quality, and bone properties of broilers. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 5663-5672, 2020b.

ZHANG, Y.; WANG, P.; XU, X.; XIA, T.; LI, Z.; ZHAO, T. Effect of wooden breast myopathy on water-holding capacity and rheological and gelling properties of chicken broiler breast batters. **Poultry Science**, v.99, n.7, p.3742-3751, 2020a.

ZHANG, Y. L.; YIN, J. H.; DING, H.; ZHANG, W.; ZHANG, C. Q.; GAO, Y. S. Protective effect of VK2 on glucocorticoid-treated MC3T3-E1 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, p. 160–166, 2017.

ZHOU, T.; PRATHER, E. R.; GARRISON, D. E.; LI, Z. Interplay between ROS and antioxidants during ischemia-reperfusion injuries in cardiac and skeletal muscle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 417, 2018.

ZHU, Y.; DING, Q.; CHAN, J.; CHEN, P.; WANG, C. The effects of concurrent supplementation of dietary phytase, citric acid and vitamin D3 on growth and mineral utilization in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, v. 436, p. 143-150, 2015.

ZOCH, M. L.; CLEMENS, T. L.; RIDDLE, R. C. New insights into the biology of osteocalcin. **Bone**, v. 82, p. 42–49, 2016.

ZUO, L.; ZHOU, T.; PANNELL, B. K.; ZIEGLER, A. C.; BEST, T. M. Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. **Acta Physiologica**, v. 214, p. 329–348, 2015.