

MAURÍLIO DE LUCAS XAVIER JUNIOR

**SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO E DE VITAMINA E EM DIETAS PARA FRANGOS
DE CORTE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR CALOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino

Coorientadores: Horacio Santiago Rostagno
Arele Arlindo Calderano
Melissa Izabel Hannas

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

X3s
2021
Xavier Junior, Maurílio de Lucas, 1991-
Suplementação de cromo e de vitamina E em dietas para
frangos de corte em condições de estresse por calor / Maurílio de
Lucas Xavier Junior. – Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (38 f.): il.

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 35-38.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.265>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Frango de corte. 2. Cromo na nutrição animal.
3. Vitamina E. I. Albino, Luiz Fernando Teixeira, 1953-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.5085

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB62578

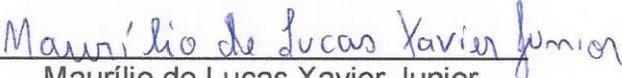
MAURÍLIO DE LUCAS XAVIER JUNIOR

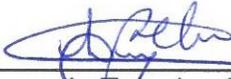
**SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO E DE VITAMINA E EM DIETAS PARA FRANGOS
DE CORTE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE POR CALOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de abril de 2021.

Assentimento:


Maurílio de Lucas Xavier Junior
Autor


Luiz Fernando Teixeira Albino
Orientador

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é a Deus, pelo maior presente dado que é a minha vida, por todas as oportunidades e bênçãos que me foram concedidas até aqui. A fé na Sua presença me fortalece nos bons momentos e mesmo naqueles mais difíceis que parecem impossíveis de resolver.

Aos meus pais Maurílio e Raquel e aos meus irmãos Raphaela, João Gabriel e Fernando, pelos valores ensinados e por todo suporte dado na minha caminhada pessoal e profissional. À toda minha família, sobrinhos, tios, tias e primos que também estão sempre dispostos e prontos para me auxiliar.

A minha companheira Priscila, que esteve ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões durante todo meu doutorado, essa caminhada teria sido muito mais árdua sem você ao meu lado.

Ao meu grupo de pesquisa e companheiros de trabalho, pós-graduandos e estagiários: Bruna, Raully, Rodrigo, Thiago, Hallef, Pedro Aleixo, Rayanne, Romário, Tobias, Pedro Condé, Renan, Bianca, Samuel, Bruno, Carlos, Kelly e Ruan. Sem a ajuda e o companheirismo durante os árduos dias de trabalho, esse projeto não teria saído do papel.

Aos funcionários do Setor de Avicultura e do Departamento de Zootecnia, meu muito obrigado pelo suporte durante todas as fases da minha pesquisa.

Ao meu orientador Luiz Fernando Teixeira Albino, por aceitar ser meu mentor durante essa jornada na pós-graduação, pelo suporte e apoio dado em todas as fases do meu aprendizado e projetos, por me compreender nos momentos em que precisei me ausentar e pela força dada em todo meu trajeto.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia, que contribuíram com meu ensinamento e com a minha formação, graças a vocês eu aprendi muito durante minha caminhada e levarei comigo pro resto da vida. Em especial aos meus coorientadores Arele Calderano e Horacio Rostagno, pessoas fundamentais para o meu aprendizado e para a realização do projeto.

Aos demais membros da banca, professora Luciana Rennó e Doutor Felipe Dalólio, por aceitarem meu convite para participar da minha defesa. Agradeço também ao Doutor Felipe Dalólio pela participação ativa na idealização do projeto e por todos os conselhos dados durante a execução do trabalho, foi fundamental para que fosse concluído.

Aos meus amigos e companheiros de República, João Victor e Guilherme, por dividirem tantos momentos comigo durante todo meu doutorado.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso.

A empresa Zinpro por ter concedido o aditivo cromo-metionina e a empresa DSM por ter concedido a vitamina E, ingredientes principais para a realização dessa pesquisa.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

BIOGRAFIA

MAURÍLIO DE LUCAS XAVIER JUNIOR, filho de Maurílio de Lucas Xavier e Raquel Gomes de Paula Xavier, nasceu em João Monlevade, MG, em 6 de setembro de 1991.

Em 2010 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em janeiro de 2015.

Em 2015 ingressou no programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia para realização do Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2017.

Em 2017 ingressou no programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia para realização do Doutorado na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da tese em abril de 2021.

RESUMO

JUNIOR, Maurílio de Lucas Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2021. **Suplementação de Cromo e de Vitamina E em dietas para frangos de corte em condições de estresse por calor.** Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino. Coorientadores: Horacio Santiago Rostagno, Arele Arlindo Calderano e Melissa Izabel Hannas.

Objetivou-se com esse experimento avaliar o efeito da utilização de cromo e de vitamina E em frangos de corte submetidos à temperatura elevada. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioclimatologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O trabalho foi realizado em duas fases iguais e subsequentes, utilizando a técnica de repetição no tempo. As aves foram distribuídas em um delineamento em blocos casualizados segundo o esquema fatorial constituído por 12 tratamentos, 4 níveis de adição de cromo (0; 500; 1000 e 1500ppb de Cr) associado a 3 doses de suplementação de vitamina E (0; 150 e 300ppm) com 8 repetições por tratamento. Ao todo foram utilizados, nas duas fases do experimento, 768 pintainhos, da linhagem Cobb 500 machos. No 22º dia de idade as aves foram transferidas para as câmaras climáticas e submetidas a estresse por calor de $32,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$ na forma cíclica, das 7:00h da manhã às 19:00h. No restante do dia os animais foram expostos à temperatura constante de 23°C . Os valores de umidade relativa do ar no interior das câmaras climáticas, foram estabelecidos em torno de $65,2 \pm 3,5\%$. Foram mensuradas as seguintes variáveis: consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, viabilidade das aves, rendimento de carcaça, peso relativo de baço e Bursa, peroxidação lipídica por dosagem de MDA, concentrações de T3 e T4, relação heterófilo:linfócito, teor de glicose e triglicérides no sangue e expressão gênica relativa da HSP70. As análises estatísticas dos dados experimentais foram realizadas por meio do proc mixed do programa SAS 9.1.3 para estabelecer se houve interação entre os fatores estudados ou dos fatores isoladamente ao nível de significância de $\alpha=5\%$. As aves que foram suplementadas com 150 ppm de vitamina E apresentaram maior consumo de ração e maior ganho de peso médio. Para a conversão alimentar houve interação entre os fatores estudados, onde a suplementação de 150 ppm de vitamina E combinada com a suplementação de 1500

ppb de cromo foi responsável pela menor conversão alimentar das aves. O nível de 300 ppm de vitamina E foi responsável pelo maior peso relativo de baço dos frangos suplementados. Para os níveis de MDA no músculo *Pectoralis major*, foi observado menor concentração nas aves que não foram suplementadas com cromo (0 ppb) e nas aves que foram suplementadas com 150 ppm de vitamina E. A suplementação combinada de 150 ppm de vitamina E e 500 ppb de cromo foi responsável pela maior concentração plasmática dos hormônios T3 e T4. Em relação aos parâmetros sanguíneos, a suplementação de 1500 ppb de cromo foi responsável por diminuir os níveis de glicose e triglicerídeos no sangue. A suplementação em conjunto de 150 ppm de vitamina E e 1500 ppb de cromo foram responsáveis pela menor relação heterófilo:linfócito das aves e pela maior expressão gênica relativa da HSP70. A suplementação de 150ppm de vitamina E em conjunto com 1500ppb de cromo foi eficaz em melhorar o desempenho de frangos de corte submetidos ao estresse por calor, melhorando a conversão alimentar das aves.

Palavras-chave: Vitamina E. Cromo. Frangos.

ABSTRACT

JUNIOR, Maurílio de Lucas Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2021. **Chromium and Vitamin E supplementation in broiler diets under heat stress conditions.** Adviser: Luiz Fernando Teixeira Albino. Co-advisers: Horacio Santiago Rostagno, Arele Arlindo Calderano and Melissa Izabel Hannas.

The objective of this experiment was to evaluate the effect of the use of chromium and vitamin E in broiler chickens subjected to high temperature. The experiments were carried out at the Laboratory of Bioclimatology of the Department of Animal Science at the Federal University of Viçosa. The work was carried out in two equal and subsequent phases, using the technique of repetition over time. The birds were distributed in a randomized block design according to a factorial scheme consisting of 12 treatments, 4 levels of chromium (0; 500; 1000 and 1500ppb of Cr) associated with 3 doses of vitamin E (0; 150 and 300ppm) supplementation with 8 replicates per treatment. Were used 768 chicks of the Cobb 500 male lineage in the two phases of the experiment. On the day 22 the birds were transferred to the climatic chambers and reared at a density of 8 birds per cage, remaining until 42 days of age, subjected to heat stress of $32.0\pm 0.8^{\circ}\text{C}$ in the cyclic form, from 7:00h in the morning to 19:00h. During the remaining period of the day, the animals were exposed to a constant temperature of 23°C . The relative humidity values inside the climatic chambers, for all treatments, were established around $65.2\pm 3.5\%$. The following variables were measured: feed intake, weight gain, feed conversion, poultry viability, carcass yield, relative weight of spleen and bursa, lipid peroxidation by MDA dosage, concentrations of T3 and T4, heterophyll:lymphocyte ratio, blood glucose and triglyceride content and relative gene expression of HSP70. Statistical analyzes of experimental data were performed using proc mixed of the SAS 9.1.3 program to establish whether there was interaction between the studied factors or the factors alone at the significance level of $\alpha=5\%$. Birds that were supplemented with 150 ppm of vitamin E had higher feed intake and higher average weight gain. For feed conversion there was interaction between the studied factors, where the supplementation of 150 ppm of vitamin E combined with the supplementation of 1500 ppb of chromium was responsible for the lower feed conversion of birds. The 300 ppm level of vitamin E was responsible for the higher

relative spleen weight of the supplemented chickens. For the MDA levels in the Pectoralis major muscle, a lower concentration was observed in birds that were not supplemented with chromium (0 ppb) and in birds that were supplemented with 150 ppm of vitamin E. The combined supplementation of 150 ppm of vitamin E and 500 ppb of chromium was responsible for the higher plasmatic concentration of hormones T3 and T4. Regarding blood parameters, 1500 ppb chromium supplementation was responsible for decreasing blood glucose and triglyceride levels. The combined supplementation of 150 ppm of vitamin E and 1500 ppb of chromium were responsible for the lowest heterophil:lymphocyte ratio in birds and the highest relative gene expression of HSP70. The supplementation of 150ppm of vitamin E together with 1500ppb of chromium was effective in improving the performance of broilers subjected to heat stress, consequently improving the feed conversion of the birds.

Keywords: Vitamin E. Chromium. Broilers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de corte tem hoje destaque mundial quando o assunto é proteína de origem animal. Apesar do frango de corte ser cada vez mais eficiente para converter alimentos em proteína animal, as aves passam por desafios que acarretam problemas como o estresse. Os fatores estressores presentes na avicultura possuem uma variedade de aspectos físicos, fisiológicos e contagiosos (Dohms e Metz, 1991; Dietert et al., 1994). As principais causas de estresse presente na avicultura são: alta densidade de criação, desafio sanitário, temperaturas inadequadas, manejo excessivo das aves e possíveis restrições de água e alimento.

O estresse por calor tem destaque principalmente em países tropicais, pois nesses ambientes a temperatura constantemente passa dos 30°C e compromete a eficácia da troca de calor das aves com o ambiente. Durante a exposição ao estresse térmico por calor, as aves utilizam mecanismos para dissipar o calor excedente e a temperatura elevada é o fator físico de maior importância (Silva et al., 2014). Dentre os processos utilizados pelo animal destaca-se em primeiro lugar a redução no consumo de ração, com conseqüente queda na produtividade (Oliveira et al., 2006). Aliado a esse fator, aumenta-se o consumo de água, o ofego, a produção de glicocorticoides e de catecolaminas e a queda no metabolismo com redução dos hormônios da tireoide (Bahrami et al., 2012). Além disso, ocorre ainda queda na resposta imune por atrofia dos órgãos linfoides, prejudicando a saúde e a sobrevivência dos animais, e aumento da peroxidação lipídica (Sahin et al., 2001), afetando a qualidade dos produtos de origem animal. Como forma de defesa do organismo, ocorre aumento na síntese de proteínas do choque térmico (HSPs) que por sua vez, são responsáveis por manter a integridade celular durante o estresse por calor (Figueiredo et al., 2015).

Eliminar todos os fatores estressores de uma produção avícola é quase impossível, portanto modificar e melhorar o ambiente de criação das aves minimiza os efeitos severos do estresse, melhorando a qualidade de vida dos animais e conseqüentemente aumentando os índices de desempenho (Mench, 1992). Uma alternativa viável e eficaz para diminuir a intensidade do estresse é a suplementação na dieta com minerais e vitaminas, visando melhorar o desempenho dos animais (Ribeiro et al., 2008).

A popularidade da vitamina E aumentou simultaneamente com pesquisas que reportaram seus efeitos positivos contra algumas doenças, como arteriosclerose, diabetes e inflamações (Gey, 1998; Rosen e Toeller, 1999; González et al., 2001). A vitamina E é conhecida por ser um antioxidante natural de grande eficácia, atua na diminuição do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica da membrana das células dos animais (Jena et al., 2013). Por seu mecanismo antioxidante, a vitamina E tem capacidade de modular o sistema imune. O fator nuclear kappa β (NF κ β) é um complexo proteico que funciona como fator de transcrição para citocinas pró-inflamatórias como: a interleucina-1 β (IL-1 β), que atua como mediador da resposta inflamatória e aumenta a produção de anticorpos, em aves e mamíferos (Sterneck et al., 1992), o fator de crescimento mielomonocítico (MGF), que tem função de recrutamento e ativação de macrófagos em resposta a processos inflamatórios (York et al., 1996) e o interferon- γ (IFN γ), que possui efeitos pleiotrópicos sobre leucócitos e também induz a secreção de óxido nítrico (ON) em monócitos primários derivados de macrófagos (Schultz et al., 1995). Foi avaliado que a vitamina E, bem como outros antioxidantes, podem modular a expressão de NF κ β por sequestrar radicais livres, reduzindo a ativação de NF κ β e conseqüentemente reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Grimble, 1994; Sen e Packer, 1996).

O cromo é um micromineral que possui a capacidade de atenuar os efeitos do estresse, atuando principalmente na potencialização do efeito da insulina, uma vez que o cromo é um elemento constitutivo da molécula chamada de fator de tolerância a glicose e da cromodulina (Sahin et al., 2003; Hayirli, 2005). Chen et al. (2006) observaram que, ao adicionar cromo, houve aumento na mobilização de receptores dependentes de insulina, como o GLUT 4, do citoplasma para a membrana plasmática de adipócitos cultivados *in vitro*. Portanto, o cromo tem capacidade de diminuir a glicemia e a lipemia, aumentando o aporte de energia para as células.

Diante do exposto, objetivou-se com esse experimento avaliar o efeito da utilização de cromo e de vitamina E em frangos de corte submetidos à elevada temperatura, nos parâmetros de desempenho zootécnico, no rendimento de carcaça e de cortes, na concentração de hormônios e de metabólitos sanguíneos e na expressão gênica de proteínas de choque térmico, com o intuito de atenuar os prejuízos decorrentes do estresse por calor.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A comissão de ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, aprovou todos os procedimentos de manejo de animais (protocolo número 038/2018), e o experimento foi conduzido de acordo com o protocolo experimental para uso de aves vivas do Colégio Brasileiro de Anomais Experimentação (Marques et al., 2009).

2.1 Características gerais das instalações

Os experimentos foram conduzidos em 4 câmaras climáticas localizadas no Laboratório de Bioclimatologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A instalação está localizada no município de Viçosa, Minas Gerais, sob as seguintes coordenadas, latitude 20° 45' Sul e longitude 45° 52' Oeste, apresentando altitude média de 712m e clima caracterizado por inverno frio e seco e verão quente e úmido.

2.2 Características das câmaras climáticas

Os animais foram criados em gaiolas com dimensões de 0,50m de largura x 1,0m de comprimento (área de 0,5m²), e cada câmara climática tem capacidade para 12 gaiolas. Cada câmara climática apresenta as seguintes dimensões: 2,38 metros de altura, 3,2 metros de comprimento e 2,44 metros de largura e são equipadas com um aquecedor de ar de resistência elétrica (2000 W de potência), um condicionador de ar tipo Split quente/frio de 12000 BTU/h e um umidificador de ar com capacidade de 4,5 L e débito de névoa de 300 ml/hora.

O aquecedor e o umidificador foram operados por meio de um controlador eletrônico MT-531R plus, de temperatura e umidade que apresenta as seguintes especificações: temperatura de controle variando de -10 a 70°C com resolução de 0,1°C; umidade de controle variando de 20 a 85% com resolução de 0,1%. A instalação conta ainda com dois exaustores axiais AMB (modelo FD08025S1M; DC 12 V; 0,15 A), que foram responsáveis pela renovação de ar no interior das câmaras climáticas durante o período experimental.

2.3 Delineamento experimental, metodologias e composição das rações experimentais

O experimento foi realizado em duas fases iguais e subsequentes, cada uma com o período de duração de 42 dias. Foi conduzida uma etapa e logo em seguida

outra utilizando a técnica de repetição no tempo. Segundo Riboldi (2002), a repetição no tempo pode ser adotada para frangos de corte aclimatados, pois os mesmos estarão sob controle total de ambiente e não existe variação significativa de peso e desempenho dentro de uma mesma linhagem de animais recebendo a mesma ração em um mesmo período de tempo.

As aves foram distribuídas em um delineamento em blocos casualizados segundo o esquema fatorial constituído por 12 tratamentos (4 níveis de adição de cromo associado a 3 doses de suplementação de vitamina E) com 8 repetições por tratamento e conduzidos em duas etapas (Tabela 1). Em cada etapa foi utilizado 4 repetições para cada tratamento e 8 aves por unidade experimental, num total de 48 unidades. O primeiro fator foi os diferentes níveis de cromo quelatado, na forma de cromo-metionina 0,1% (0; 500; 1000 e 1500ppb de Cr). O segundo fator foi os níveis de vitamina E (0; 150 e 300ppm), conforme o modelo proposto:

$$Y_{ijk} = \mu + R_k + C_i + D_j + (CD)_{ij} + e_{ijk};$$

onde:

Y_{ijk} = valor observado no nível de cromo i , na dosagem de vitamina E j , no bloco k ;

μ = média geral;

R_k = efeito do bloco k ;

C_i = efeito do nível de cromo i , com $i = 1, 2, 3$ e 4 ;

D_j = efeito da dosagem de vitamina E j , com $j = 1, 2$ e 3 ;

$(CD)_{ij}$ = efeito da interação entre o nível de cromo i e a dosagem de vitamina E j ;

e_{ijk} = efeito do erro experimental associado a observação de ordem ijk .

Tabela 1- Tratamentos experimentais, de acordo com os fatores estudados.

Rações Experimentais (Tratamentos)	Suplementação de Cromo ¹ (ppb)	Doses de vitamina E ² (ppm)
Tratamento 1(CN) ³	0	0
Tratamento 2	0	150
Tratamento 3	0	300
Tratamento 4	500	0
Tratamento 5	500	150
Tratamento 6	500	300
Tratamento 7	1000	0
Tratamento 8	1000	150
Tratamento 9	1000	300
Tratamento 10	1500	0
Tratamento 11	1500	150
Tratamento 12	1500	300

¹Cromo-metionina (0,1%).

²Vitamina E (50%).

³Controle negativo (0% de adição de vitamina E e 0 % de cromo).

Ao todo foram utilizados, nas duas fases do experimento, 768 pintainhos, da linhagem Cobb 500, machos. No período inicial, 1 a 21 dias de idade, os animais foram criados no setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, alojados em círculos de proteção conforme recomendação da linhagem, com fornecimento de ração basal para atender às exigências nutricionais conforme a recomendação de Rostagno et al. (2017) e foram mantidos dentro da faixa de conforto térmico determinada pelo manual de criação. Após esse período, no 22º dia, as aves com peso inicial médio de $0,920 \pm 0,0009$ kg foram transferidas para as câmaras climáticas e criadas em uma densidade de 8 aves por gaiola, permanecendo até os 42 dias de idade, submetidos a estresse por calor de $32,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$. Os valores de umidade relativa do ar no interior das câmaras climáticas, para todos os tratamentos, foram estabelecidos em torno de $65,2 \pm 3,5\%$, por ser considerado um valor adequado à produção avícola, independentemente da idade das aves (TINÔCO, 2004).

O programa de iluminação foi de 16 horas de luz (artificial) e 08 horas de escuro, de 75 watts por câmara. As condições ambientais das câmaras climáticas foram monitoradas diariamente, cinco vezes ao dia (7:00, 10:00, 14:00, 16:00 e 18:00h), por meio de termômetros de bulbo seco, bulbo úmido e de globo negro, mantidos no centro das salas.

Os bebedouros utilizados foram do tipo nipple, na proporção de um por gaiola. Logo após o alojamento, os pintainhos foram orientados quanto à presença de água, molhando-se o bico de algumas aves na lâmina d'água. Os comedouros utilizados foram do tipo calha, em chapa metálica galvanizada, na razão de dois por gaiola.

As rações experimentais foram formuladas conforme a recomendação de Rostagno et al., (2017) e foram fornecidas duas vezes ao dia (7:00 e 18:00h), com o objetivo de evitar o desperdício de ração. A água foi fornecida à vontade, foram realizados estímulos nos nipples ao longo do dia (7:00, 10:00, 14:00, 16:00 e 18:00h) para evitar o superaquecimento da água e a depleção no consumo da mesma. Todos os dias, no período da manhã, foi efetuada a retirada de excretas e a limpeza das bandejas das baterias.

Na fase experimental de avaliação da inclusão de cromo e de vitamina E, 22 a 42 dias de idade (crescimento e terminação), as aves estiveram sob estresse por calor de $32\pm 0,8^{\circ}\text{C}$, na forma cíclica, das 7:00h da manhã às 19:00h com duração de 12 horas no período total. No outro período do dia os animais foram expostos à temperatura constante de 23°C , conforme adotado por CASSUCE et al. (2013).

Na tabela 2 têm-se a composição das rações experimentais que foram fornecidas aos animais no período de 22 a 42 dias.

Tabela 2. Composição das rações experimentais na matéria natural, para a fase de 21 a 42 dias.

Ingredientes (%)	Níveis de Cromo (ppb)			
	0	500	1000	1500
Milho	63,808	63,808	63,808	63,808
Farelo de soja (45%)	30,260	30,260	30,260	30,260
Óleo vegetal	2,650	2,650	2,650	2,650
Fosfato bicálcico	1,156	1,156	1,156	1,156
Calcário	0,816	0,816	0,816	0,816
Sal comum	0,440	0,440	0,440	0,440
DL-metionina (99%)	0,209	0,209	0,209	0,209
L-lisina HCl (79%)	0,136	0,136	0,136	0,136
Cloreto de colina (60%)	0,100	0,100	0,100	0,100
Suplemento vitamínico ¹	0,100	0,100	0,100	0,100
Suplemento mineral ²	0,050	0,050	0,050	0,050
Coccidiostático ³	0,055	0,055	0,055	0,055
Antioxidante ⁴	0,010	0,010	0,010	0,010
Cromo–metionina 0,1%	0,000	0,050	0,100	0,150
Vitamina E* (50%)	----	----	----	----
Inerte ⁵	0,210	0,160	0,110	0,060
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição calculada				
Proteína bruta (%)	19,00	19,00	19,00	19,00
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	3100	3100	3100	3100
Lisina digestível (%)	1,005	1,005	1,005	1,005
Met + cist digestível (%)	0,733	0,733	0,733	0,733
Cálcio (%)	0,683	0,683	0,683	0,683
Fósforo disponível (%)	0,319	0,319	0,319	0,319
Sódio (%)	0,190	0,190	0,190	0,190

¹ Níveis de garantia por kg de produto (Mínimo): Ác. fólico 0,3 mg, Ác. Pantotênico 12 mg, Ác. nicotínico 50 mg, Biotina 0,05 mg, Niacina 30 mg, Vitamina A 10.000.000 UI, Vitamina B1 1,5 mg, Vitamina B12 0,015 mg, Vitamina B2 6 mg, Vitamina B6 4 mg, Vitamina D3 2.000.000 UI, Vitamina K3 3mg.

² Níveis de garantia por kg de produto (Min): Cobalto 2 mg, Cobre 10 mg, Ferro 50 mg, Iodo 0,7 mg, Manganês 78 g, Selênio 0,18 mg, Zinco 55 mg,

³ Salinomicina 12%.

⁴ Butil Hidroxi Tolueno – BHT.

⁵ Areia.

*Para cada nível de cromo orgânico utilizado nas rações foi adicionado 0ppm, 150 ppm e 300 ppm de vitamina E, em substituição a areia.

Para as rações fornecidas às aves no período experimental (22 a 42 dias), foi necessário à formulação de um premix vitamínico de fabricação exclusiva sem a inclusão de vitamina E, pois, esta foi manipulada no experimento.

2.4 Desempenho Zootécnico

Para a avaliação do desempenho dos animais foram mensuradas as seguintes variáveis:

Consumo de ração: ao final do período experimental de estresse por calor, 22 a 42 dias, foi feita a divisão da quantidade de ração consumida pelo número de aves de cada tratamento divididos por 21 dias, expresso em quilos de ração consumida/ave/dia, a fim de se obter o consumo de ração. No caso de aves mortas durante o período, o seu consumo médio foi descontado e corrigido, obtendo-se o consumo médio verdadeiro para a unidade experimental em questão.

Ganho de peso: Todas as aves foram pesadas ao início e ao término do experimento, para determinação do ganho de peso dos animais.

Conversão alimentar: A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o consumo de ração pelo ganho de peso corporal acumulado no período.

Viabilidade das aves: A mortalidade das aves foi subtraída do número total de aves vivas, sendo os valores obtidos convertidos em porcentagem no final do período experimental.

2.5 Rendimento de carcaça e Peso relativo de órgãos linfóides

Ao final dos 42 dias de idade, em cada fase do experimento, foi amostrada uma ave de cada unidade experimental pesada após jejum de 6 horas, selecionada por peso corporal médio da parcela ($\pm 5\%$), totalizando assim 48 animais por fase, com 4 de cada tratamento. Após pesagem na plataforma de abate, as aves foram insensibilizadas por eletronarcose e submetidas imediatamente à sangria, seguida por intervalo de três minutos. O experimento com suas respectivas funções para avaliação dos animais foi conduzido de acordo com as normas vigentes do Comitê de Ética da UFV.

Foi feita a evisceração e realizada a pesagem da carcaça sem pés e sem cabeça. O pré-resfriamento ocorreu em água hipoclorada (5 ppm de cloro) a 15°C

por 20 minutos e, em seguida, as carcaças foram resfriadas em câmara fria regulada a 0°C (± 1), para cálculo de rendimento.

O rendimento de carcaça eviscerada sem cabeça, pescoço e pés foi calculado em relação ao peso corporal antes do abate (peso de plataforma), sendo: % RC = (peso carcaça x 100 / peso corporal).

No momento da evisceração, foi feita a retirada da Bursa e do baço e foi calculado o peso relativo dos órgãos.

2.6 Estresse Oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo após o período total de estresse por calor foi feita em amostra de músculo *Pectoralis major* por avaliação da peroxidação lipídica. Posteriormente as amostras foram enviadas ao Laboratório de Ciência da Carne da UFV, para dosagem dos produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malondialdeído (MDA) subproduto da lipoperoxidação que reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico e produz um complexo de coloração avermelhada (Rumley & Paterson, 1998).

2.7 Concentrações dos hormônios T3 e T4

Ao final do período experimental, foi coletado sangue de quatro aves por tratamento, totalizando 4 repetições por tratamento. Foram realizadas coletas de sangue das aves (5 mL) mediante punção da veia jugular com a utilização de seringas heparinizadas e agulhas descartáveis. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca e, posteriormente, o sangue coletado foi armazenado em tubos do tipo *ependorfs* de polietileno. Após a formação de coágulo, o sangue foi centrifugado sob refrigeração (3220g/15 minutos e temperatura ao redor de 4°C) para obtenção do soro, o qual foi armazenado em freezer, a - 80°C até a realização das análises hormonais.

Os ensaios para as dosagens hormonais foram executados utilizando-se a técnica de radioimunoensaio (RIE). Para as análises de T3 e T4 foram utilizados kits comerciais de marcadores de anticorpos ELISA (Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) específico para frangos. Os métodos de análise foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando um lavador de microplacas automatizado (Biolisa Washer Plus, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) e um leitor de microplacas (Biolisa Reader, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). Os conteúdos de de T3 e T4 foram

determinados de acordo com a curva padrão e expressados na forma de micrograma por mililitro ($\mu\text{g/ml}$).

2.8 Hemograma

De forma semelhante aos hormônios T3 e T4, foi coletado sangue de quatro aves por tratamento, totalizando 4 repetições por tratamento. As amostras de sangue foram enviadas ao laboratório LADVET, no município de Viçosa, para análises de glicose e triglicerídeos no sangue. A determinação dos hematócitos foi realizada por meio do método de microhematócrito, utilizando-se tubo capilar centrifugado a 11.360 G por 5 minutos em microcentrífuga. A contagem de leucócitos foi realizada em hemocítômetro em amostras de sangue diluídas a 1:200, em corante de Natt e Herrick's. A contagem diferencial leucocitária foi realizada em esfregaço sanguíneo, fixado com álcool metílico (Metanol) e posteriormente foi submetido à coloração com o corante rápido para hematologia (Panótipo rápido). A partir dos resultados foi determinado a relação heterofilo:linfócito, para a identificação do estresse por calor nos animais e sua relação com o sistema imune.

2.9 Expressão Gênica HSP70

Para as análises de expressão gênica foram selecionadas quatro aves, com pesos mais próximos da média do respectivo tratamento ($\pm 10\%$), para determinação da expressão de mRNA para a proteína do choque térmico de 70 kD (HSP70), no músculo *Pectoralis major*. As aves foram insensibilizadas, abatidas por sangria e tiveram a pele da região peitoral retirada. Imediatamente após esse processo foi coletado uma amostra de aproximadamente 2,0 cm de comprimento, 0,5 cm de largura e 0,5 cm de profundidade do músculo *Pectoralis major* direito, na região central da peça muscular. Em seguida, as amostras foram identificadas e imersas em RNA holder (BioAgency) e armazenadas em freezer a -20°C até o momento da extração.

O mRNA total de cada amostra foi extraído utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) seguindo-se as recomendações do fabricante. Foi determinado a concentração do mRNA total utilizando o espectrofotômetro Nano Vue Plus (GE Healthcare). A integridade do RNA foi avaliada utilizando gel de agarose a 1% e visualizado por meio da luz ultra-violeta. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen). Foram adicionados 6 microlitros do mRNA total, 1 μL de oligo (dT) (50 μM oligo(dT) 20 e 1 μL de *annealing buffer*. A mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C e em seguida, colocada no gelo

por 1 minuto. Subsequentemente, foram adicionados 10 μ L de 2x First-StrandReaction Mix solution e 2 μ L da enzima SuperScript III reverse transcriptase. As amostras foram estocadas a -20°C até a análise.

As sequências dos genes foram obtidas no banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os primers (tabela 3) foram desenhados de acordo com as sequências contidas em GeneBank, usando a ferramenta PrimerQuest Tool (www.idtdna.com). Foram testados dois controles endógenos, os genes β -actina e GAPDH. Foi utilizado o gene da β -actina como controle endógeno porque houve menor variação em relação ao GAPDH, quando utilizado o programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002). Todos os ensaios foram realizados em um volume final de 25 μ L e em duplicata. Foi utilizado para a PCR em tempo real, o composto fluorescente SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen).

Tabela 3. Primers genes

Genes		Sequência 5' → 3'	Nº Acesso
HSP70	F	CGTGACAATGCTGGCAATAAGCGA	MH422508.1
	R	TCAATCTCAATGCTGGCTTGCGTG	MH422508.1
β -actina	F	AGACATCAGGGTGTGATGGTTGGT	XM_026082987.1
	R	TCCCAGTTGGTGACAATACCGTGT	XM_026082987.1
GAPDH	F	CCCAGCAACATCAAATGGGCAGAT	NM_204305.1
	R	TGATAACACGCTTAGCACCACCT	NM_204305.1

Os valores de expressão gênica foram normalizados usando o método de $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) gerando contrastes, que é o valor da expressão relativa entre o gene de estudo e o gene endógeno.

2.10 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados experimentais foram realizadas por meio do proc mixed, pacote estatístico do programa SAS 9.1.3 (SAS Institute, 2010), para estabelecer se houve efeito da interação entre os fatores estudados ou dos fatores de forma isolada, ao nível de significância de $\alpha=5\%$. Em caso de efeito significativo, foi realizado o teste de médias Tukey para avaliar a diferença entre as médias dos tratamentos ou dos fatores estudados, utilizando um $\alpha=5\%$ de significância.

3. RESULTADOS

Os valores de consumo de ração médio (kg) das aves se encontram na tabela 4.

Tabela 4. Valores de Consumo de Ração Média (kg) das aves.

		Níveis Cromo (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	3,03	3,07	3,06	3,09	3,06B
Vit E	150	3,09	3,17	3,13	3,12	3,13A
(ppm)	300	3,10	3,06	3,08	3,03	3,07B
	Média	3,08	3,10	3,09	3,09	
Efeito	P valor					
Cr	0,89	CV (%)		3,12		
Vit E	0,01*					
Vit E*Cr	0,39					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

A,B: letras diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Não houve interação entre os fatores estudados para o consumo de ração das aves. Quando avaliado pelos fatores separadamente, houve diferença estatística ($p\text{-valor}\leq 0,05$) no consumo de ração influenciado pelo nível de vitamina E. Os animais que consumiram as dietas experimentais com 150 ppm de vitamina E apresentaram maior consumo de alimento que os demais. A suplementação de cromo não influenciou ($p\text{-valor}> 0,05$) o consumo de ração das aves.

Os valores de ganho de peso médio (kg) e conversão alimentar das aves se encontram na tabela 5.

Tabela 5. Ganho de Peso Médio (GPM) e conversão alimentar (CA) das aves.

		Níveis Cromo-metionina (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
GPM (kg)	0	1,84	1,89	1,83	1,81	1,84B
Níveis	150	1,86	1,92	1,88	1,94	1,90A
Vit E	300	1,87	1,87	1,85	1,85	1,86AB
	Média	1,86	1,89	1,85	1,87	
Efeito	P valor					
Cr	0,39	CV (%)		4,32		
Vit E	0,01*					
Vit E*Cr	0,31					
		Níveis Cromo (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
CA	0	1,67ab	1,61b	1,65ab	1,71Aa	1,66
Níveis	150	1,65	1,65	1,66	1,61B	1,65
Vit E	300	1,64	1,61	1,68	1,68A	1,66
	Média	1,66	1,63	1,67	1,67	
Efeito	P valor					
Cr	0,06	CV (%)		3,77		
Vit E	0,63					
Vit E*Cr	0,03*					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

De maneira similar ao consumo de ração, o ganho de peso médio das aves não apresentou interação entre os fatores estudados e mostrou diferença significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) apenas para o fator vitamina E. Os animais do tratamento sem inclusão de vitamina E apresentaram menor ganho de peso médio do que os animais que se alimentaram com as dietas com inclusão de 150 ppm de vitamina. Em relação à conversão alimentar, houve interação significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) entre os dois fatores estudados. Ao desmembrar os fatores, houve diferença ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para os níveis de cromo dentro do nível de 0 ppm de vitamina E, os animais consumindo 500 ppb de cromo apresentaram menor conversão alimentar. Também houve diferença significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) dos níveis de vitamina E dentro do nível de 1500 ppb de cromo sendo os animais consumindo 150 ppm de vitamina E os que apresentaram menor conversão alimentar. O nível de 150 ppm de vitamina E se mostrou eficiente em aumentar o consumo e ganho de peso dos animais e quando combinado ao nível de 1500 ppb de cromo, mostrou maior eficiência na utilização da dieta pelos frangos.

Os dados de rendimento de carcaça (%) estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Rendimento de carcaça (%).

		Níveis Cromo (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	78,79	79,13	80,26	78,22	79,10AB
Vit E	150	78,55	77,36	78,70	78,32	78,23B
(ppm)	300	79,17	79,72	78,96	79,15	79,25A
	Média	78,83	78,37	79,30	78,56	
Efeito	P valor	CV (%)				
Cr	0,38	1,94				
Vit E	0,02*					
Vit E*Cr	0,17					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Não houve interação entre os fatores estudados em relação ao rendimento de carcaça. Houve diferença significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para a vitamina E sobre o rendimento de carcaça dos frangos de corte. As aves que consumiram os níveis de 150 ppm de vitamina E apresentaram menor rendimento de carcaça em relação às aves que consumiram as dietas com suplementação com 300 ppm de vitamina E.

Os valores de peso relativo de órgãos linfoides (baço e Bursa) estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Peso Relativo (PR) de órgãos linfoides.

		Níveis Cromo (ppb)				
PR Baço (%)		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	0,081	0,088	0,070	0,076	0,079B
Vit E	150	0,080	0,092	0,079	0,080	0,082AB
(ppm)	300	0,088	0,090	0,098	0,096	0,093A
	Média	0,083	0,090	0,082	0,084	
Efeito	P valor					
Cr	0,57	CV (%)		25,42		
Vit E	0,03*					
Vit E*CR	0,60					
		Níveis Cromo (ppb)				
PR Bursa (%)		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	0,17	0,11	0,15	0,14	0,14
Vit E	150	0,13	0,13	0,15	0,16	0,14
(ppm)	300	0,15	0,16	0,17	0,13	0,15
	Média	0,15	0,13	0,16	0,14	
Efeito	P valor					
Cr	0,24	CV (%)		27,33		
Vit E	0,56					
Vit E*CR	0,06					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b : letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Não houve interação entre os fatores estudados em relação ao peso relativo do baço. Houve diferença significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para a vitamina E sobre o peso relativo do baço dos frangos de corte. Os animais que não receberam suplementação de vitamina E (0 ppm) apresentaram menor peso relativo do baço em comparação com os animais que foram suplementados com 300 ppm de vitamina E. Em relação ao peso relativo da Bursa, não houve interação entre os fatores e nem diferença significativa entre os fatores estudados de forma isolada.

Os dados de viabilidade das aves do estudo estão apresentados na tabela 8, não houve interação entre os fatores e nem diferença significativa entre os fatores estudados de forma isolada.

Tabela 8. Viabilidade das aves (%).

		Níveis Cromo-metionina (ppb)			
Viabilidade (%)		0	500	1000	1500
Níveis	0	98,44	92,19	98,44	98,44
Vit E	150	98,44	93,75	96,88	98,44
(ppm)	300	100,00	98,44	98,44	95,31

Os valores observados de MDA no peito de (mg/kg tecido) de frangos de corte estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Níveis MDA no peito (mg/kg tecido)

		Níveis Cromo (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	0,053	0,024	0,019	0,036	0,033AB
Vit E	150	0,052	0,022	0,016	0,031	0,030B
(ppm)	300	0,055	0,051	0,040	0,034	0,045A
	Média	0,053a	0,032b	0,025b	0,034b	
Efeito	P valor					
Cr	<0,01*	CV (%)		40,48		
Vit E	0,02*					
Vit E*Cr	0,32					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Não houve efeito de interação entre os fatores estudados. Houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para o fator cromo, sendo que os animais que não receberam suplementação de cromo (0 ppb) apresentaram o maior nível de MDA no tecido em relação aos animais dos demais tratamentos. Também houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) da vitamina E sobre o nível de MDA no peito dos frangos, o nível de 150 ppm de vitamina E foi responsável pela menor concentração de MDA em relação aos animais suplementados com 300 ppm de vitamina E.

Os dados de concentração sanguínea dos hormônios T3 e T4 ($\mu\text{g/ml}$) dos frangos de corte estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Níveis dos hormônios T3 e T4 no sangue ($\mu\text{g/ml}$)

Níveis Cromo (ppb)						
T3		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	114AB	156	109	126B	126
Vit E	150	95Bb	174a	135ab	126ABab	133
(ppm)	300	152A	131	132	173A	147
	Média	120	154	125	142	
Efeito	P valor					
Cr	0,02*	CV (%)		20,3		
Vit E	0,09					
Vit E*Cr	0,01*					
Níveis Cromo (ppb)						
T4		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	1,09Bb	1,49ABa	1,21Bab	1,18b	1,24
Vit E	150	1,48A	1,61A	1,48A	1,32	1,47
(ppm)	300	1,20Bb	1,30aBb	1,54Aa	1,36ab	1,35
	Média	1,25	1,47	1,41	1,29	
Efeito	P valor					
Cr	<0,01*	CV (%)		11,79		
Vit E	<0,01*					
Vit E*CR	0,03*					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para a interação entre os fatores estudados para a concentração do hormônio T3 na corrente sanguínea das aves. Ao estudar o desmembramento dos fatores, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para os níveis de cromo dentro do nível de 150 ppm de vitamina E, sendo que a maior concentração de T3 foi observada nos animais consumindo 500 ppb de cromo em relação aos animais que não receberam a suplementação do mineral (0 ppb). Para o nível 0 ppb de cromo, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) da vitamina E, onde a maior concentração de T3 ocorreu nos animais suplementados com 300 ppm de vitamina, e para o nível de 1500 ppb de cromo, a vitamina E também apresentou efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$), sendo o nível de 300 ppm de vitamina E ocasionando em maior concentração do hormônio T3 em relação às aves que não receberam suplementação de vitamina (0 ppm).

De maneira similar ao hormônio T3, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para a interação entre os fatores sobre a concentração do hormônio T4 no sangue dos frangos de corte. Ao desmembrar o efeito do cromo dentro dos níveis de vitamina E, foi observado diferença significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) no nível de 0 ppm de suplementação da vitamina, onde a maior concentração de hormônio T4 foi observado

nas aves consumindo 500 ppb de cromo em relação àquelas que não receberam suplementação (0 ppb) e que se alimentaram com 1500 ppb de cromo. Além disso, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) dos níveis de cromo dentro do nível de 300 ppm de vitamina E, sendo a menor concentração do hormônio T4 observado nas aves que não receberam suplementação do cromo (0 ppb) em relação às aves que receberam 1000 ppb de cromo. Ao desmembrar o efeito da vitamina E dentro dos níveis de cromo, foi encontrado efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) nos níveis de suplementação de 0, 500 e 1000 ppb de cromo, sendo o nível de 150 ppm de vitamina E ocasionando maior concentração de T4 no sangue das aves, com maior valor absoluto para as aves recebendo 150 ppm de vitamina E e 500 ppb de cromo.

Na tabela 11 estão apresentados os resultados obtidos para níveis de glicose (g/L) e triglicerídeos (g/L) sanguínea das aves.

Tabela 11. Níveis glicose (g/L) e de triglicerídeos (g/L) no sangue.

		Níveis Cromo (ppb)				
Glicose		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	221	230	220	221	223a
Vit E	150	208	227	219	199	213b
(ppm)	300	211	214	206	211	211b
	Média	213b	224a	215ab	210b	
Efeito	P valor					
Cr	<0,01*	CV (%)		4,02		
Vit E	<0,01*					
Vit E*Cr	0,07					
		Níveis Cromo (ppb)				
TG		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	23,8	25,8	24,3	14,8	22,1
Vit E	150	32	24,8	28,4	15,0	24,1
(ppm)	300	27,8	25,8	13,3	17,3	21,0
	Média	27,8a	25,4ab	20,8bc	15,7c	
Efeito	P valor					
Cr	<0,01*	CV (%)		25,62		
Vit E	0,31					
Vit E*Cr	0,08					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Não houve interação entre os fatores estudados para o nível de glicose circulante nas aves. Para os fatores estudados de forma isolada, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) da vitamina E e do cromo. As aves suplementadas com 1500 ppb de cromo apresentaram menor nível de glicose sanguínea e as aves que não receberam

suplementação de vitamina E (0 ppm) apresentaram maior nível de glicose circulante. Também não foi observado efeito de interação entre os fatores estudados para o nível de triglicerídeos das aves. Apenas o fator cromo foi significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$), sendo a maior suplementação de cromo (1500 ppb) responsável pela menor concentração de triglicerídeos no sangue dos animais.

Os resultados da relação heterofilo:linfócito das aves estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Relação Heterófilos:Linfócitos.

		Níveis Cromo (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
Níveis Vit E (ppm)	0	3,60	2,72B	3,45	1,80	2,89
	150	3,54a	2,21Bab	2,74ab	1,16b	2,41
	300	4,17b	6,41Aa	1,69c	1,25c	3,38
	Média	3,77	3,78	2,63	1,40	
Efeito	P valor	CV (%)				
Cr	<0,01*	39,33				
Vit E	0,07					
Vit E*Cr	<0,01*					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para a interação dos fatores estudados sob a relação heterofilo:linfócito dos animais. Ao desmembrar o efeito do cromo dentro dos níveis de vitamina E, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para o nível de 150 ppm de vitamina E, sendo a menor relação encontrada nos animais suplementados com 1500 ppb de cromo em relação aos animais que não receberam suplementação de cromo (0 ppb). Para o nível de 300 ppm de vitamina E houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) do cromo, onde a maior relação heterofilo:linfócito foi encontrado nos animais que receberam suplementação de 500 ppb de cromo em relação aos demais tratamentos, seguido dos animais que não receberam suplementação de cromo (0 ppb) e as menores relações foram encontradas nos animais que receberam 1000 e 1500 ppb de cromo. Ao desmembrar o fator vitamina E dentro dos níveis de cromo, foi encontrado diferença significativa ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para o nível de 500 ppb de cromo, sendo o nível de 300 ppm de suplementação de vitamina E o responsável pela maior relação heterofilo:linfócito das aves em comparação aos outros 2 níveis de suplementação de vitamina.

Os resultados de expressão relativa do gene HSP70 das aves estão apresentados na tabela 13.

Tabela 1. Expressão relativa do gene HSP70.

		Níveis Cromo (ppb)				
		0	500	1000	1500	Média
Níveis	0	1,55b	1,40b	1,54b	2,02Aa	1,63
Vit E	150	1,45b	1,55b	1,81ab	2,24Aa	1,76
(ppm)	300	1,35ab	1,49ab	1,72a	1,27Bb	1,46
	Média	1,45	1,48	1,69	1,84	
Efeito	P valor					
Cr	<0,01*	CV (%)		14,18		
Vit E	<0,01*					
Vit E(Cr)	<0,01*					

* significância ao valor de $\alpha=5\%$ ($p\text{-valor}\leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas diferentes determinam diferenças na linha pelo teste de Tukey.

A,B: letras maiúsculas diferentes determinam diferenças na coluna pelo teste de Tukey.

Houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para a interação entre os fatores estudados para a expressão relativa do gene HSP70. Ao desmembrar os níveis de cromo dentro de cada nível de vitamina E, houve efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para os três níveis de vitamina E. No nível 0 de inclusão de vitamina, a maior expressão relativa do gene HSP70 foi observado nas aves que receberam 1500 ppb de suplementação de cromo, seguindo comportamento semelhante no nível de 150 ppm de vitamina E (1500 ppb de cromo). No nível de 300 ppm de vitamina E, o nível de 1500 ppb de cromo foi responsável pela menor expressão relativa de HSP70 em relação ao nível de 1000 ppb de cromo. Ao desmembrar os níveis de vitamina E dentro de cada nível de cromo, só foi encontrado efeito significativo ($p\text{-valor}\leq 0,05$) para o nível de 1500 ppb de cromo, onde houve menor expressão relativa do gene HSP70 no nível de 300 ppm de vitamina E.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, não houve interação do cromo e da vitamina E na dieta das aves sob o consumo de ração e ganho de peso das aves. Isoladamente, a vitamina E proporcionou melhora no consumo de ração e ganho de peso dos frangos de corte submetidos ao estresse por calor. As aves suplementadas com 150ppm de Vitamina E apresentaram maior consumo de ração e maior ganho de peso, porém, houve interação dos fatores quando a conversão alimentar foi avaliada. Em combinação com o nível de 1500 ppb de cromo, as aves que consumiram 150 ppm de vitamina E foram mais eficientes do que as aves dos demais tratamentos. Animais

criados em temperaturas elevadas possuem perdas diretas no desempenho produtivo, como diminuição no consumo de ração, menor ganho de peso e perda de eficiência alimentar (Yalcin et al., 2006; Sahin et al., 2009). Além disso, os frangos podem sofrer imunossupressão e diminuir os níveis de vitaminas e minerais na corrente sanguínea, pois ocorre diminuição da absorção intestinal e aumento na mobilização nos tecidos e também excreção corporal desses nutrientes (McDowell, 1989; Donker et al., 1990; Klasing, 1998; Sahin et al., 2009).

Sahin et al. (2002a) reportaram que o aumento na suplementação de vitamina E para frangos de corte em 4 níveis crescentes (62,5, 125, 250 e 500ppm) aumentaram linearmente o consumo de ração e ganho de peso dos animais, sendo essa melhoria atribuída ao aumento dos níveis séricos de T3 e T4 das aves, hormônios diretamente relacionados com o metabolismo animal. Em um outro trabalho, avaliando os efeitos da suplementação de cromo sob o desempenho de codornas criadas em condições de estresse por calor, diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, Sahin et al. (2010) encontraram melhoras significativas no ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar das aves alimentadas com cromo em relação aos animais que não foram suplementados. Os autores também avaliaram que houve melhora na capacidade antioxidante e diminuição de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) das aves que receberam a suplementação de cromo, fatores que ajudam a explicar a melhora do desempenho das codornas.

Apesar das melhoras no desempenho observadas no presente trabalho e em outros trabalhos realizados descritos na literatura, as aves que consumiram 150 ppm de vitamina E apresentaram menor rendimento de carcaça em relação aos animais que consumiram 300 ppm de vitamina E. O cromo não alterou o rendimento de carcaça dos frangos.

Para avaliar possíveis efeitos da suplementação de vitamina E e cromo na dieta dos frangos de corte sobre o sistema imunológico, foi avaliado o peso relativo dos órgãos linfoides baço e Bursa e também da relação heterofilos:linfócitos (H:L). Não houve diferença no peso relativo da Bursa para nenhum dos tratamentos, porém o peso relativo do baço foi afetado diretamente pela suplementação de 300 ppm de vitamina E, sendo maior em relação aos animais que não receberam suplementação da vitamina, mostrando sua capacidade imunomoduladora. Além disso, foi verificado menor relação H:L das aves suplementadas com 150ppm de vitamina E e 1500ppb

de cromo, fato que mostra melhora nos animais submetidos ao estresse pela suplementação dos nutrientes.

Em estudos com humanos, ratos e aves, está bem definido que o sistema imune responde ativamente ao estresse (aumento nos níveis de corticosterona) com aumento na circulação de neutrófilos (ou heterófilos em aves) e diminuição da circulação de linfócitos. Em consequência disso há aumento na relação entre H:L, sendo essa relação um importante parâmetro para avaliação do estresse (Harmon, 1998). Rajalekshmi et al. (2014) avaliaram a suplementação de 7 níveis crescentes de cromo-picolinato (0, 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 ppb) na dieta de frangos de corte e observaram efeito positivo da suplementação sobre a relação H:L, onde todos os níveis suplementados apresentaram menor relação H:L quando comparados com as aves que não receberam cromo, tendo seu efeito potencializado nos níveis de 400, 800 e 1600 ppb de cromo. Resultados semelhantes sob a relação H:L foram encontrados por Rashidi et al. (2010) com a suplementação de vitamina E, onde os autores observaram diminuição da relação H:L de frangos criados em condição de estresse por calor que receberam 100 ppm de suplementação de vitamina E.

A avaliação de MDA nos tecidos é uma forma eficiente de se medir o status oxidativo em experimentos in vivo. Não houve interação entre os fatores estudados sob os níveis de MDA no músculo *Pectoralis major* dos frangos. Ao avaliar os fatores separadamente, foi observado diminuição dos níveis de MDA com a suplementação de cromo, todos os níveis apresentaram menor concentração de MDA no tecido em relação às aves que não receberam a suplementação. O cromo é um micromineral conhecido pela sua capacidade de atuar diretamente no sistema energético das células por aumentar a sensibilidade à insulina e aumentar a captação de substratos da corrente sanguínea, mas também possui ação antioxidante. Sua ação antioxidante parece estar vinculada à redução da quantidade de glicose e ácidos graxos circulantes no plasma sanguíneo (Opara, 2002). Outra forma que o cromo atua como antioxidante é na ativação do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2). O Nrf2 é uma proteína reguladora da transcrição de genes envolvidos com a capacidade antioxidante das células, estimulando a produção das enzimas antioxidantes (Kim et al., 2010).

Em relação à vitamina E, o nível de 300 ppm influenciou negativamente os níveis de MDA no tecido, sendo o nível de 150 ppm de vitamina E responsável pelo menor nível encontrado. Por ser um potente sequestrador de radicais livres, é esperado que

quanto mais vitamina E for suplementada na dieta dos animais maior será a capacidade antioxidante e conseqüentemente melhor será a resposta frente ao estresse por calor. Porém, foi observado que o nível intermediário de vitamina E (150ppm) foi mais eficiente em melhorar os parâmetros estudados, já o mesmo comportamento não ocorreu com a suplementação de 300ppm, fato que ocorreu também no estudo feito por Leshchinsky e Klasing (2001).

Para avaliar os efeitos da vitamina E sobre o sistema imune em frangos acometidos por estresse (aplicação de LPS), Leshchinsky e Klasing (2001) suplementaram as dietas com 6 níveis de vitamina E (0, 15, 40, 75, 150 e 375ppm). Os autores observaram que os níveis intermediários de vitamina E (40 e 75ppm) foram responsáveis por diminuir a relação H:L e pelo aumento da produção de anticorpos específicos para bronquite infecciosa viral (IBV), no qual as aves foram vacinadas no início do experimento.

A fim de entender os efeitos da alta dosagem de vitamina E, Leshchinsky e Klasing (2003) realizaram um segundo experimento para avaliar o efeito de 3 níveis (0, 50 e 300ppm) sobre a expressão gênica de alguns marcadores biológicos relacionados ao sistema imune em aves acometidas por estresse (aplicação de LPS). A expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , MGF e IFN γ) foi maior nas aves que receberam a aplicação de LPS, mas quando as aves foram suplementadas com vitamina E e receberam a aplicação de LPS ocorreu redução na expressão de MGF. Os autores sugerem que com o aumento de suplementação da vitamina E, houve diminuição da ativação de NF κ β , o que explica a redução na expressão de MGF. Outro resultado desse trabalho foi a expressão do fator de transformação de crescimento beta (TGF β), que diminuiu nas aves suplementadas com alta dose vitamina E (300ppm) e vacinadas com LPS. O TGF β é uma proteína sinalizadora que regula os processos de crescimento e diferenciação celular, além disso inibe a proliferação de células T e a ativação de macrófagos (Lawrence, 1996). A diminuição na expressão de TGF β em aves alimentadas com alta dose de vitamina E pode explicar o efeito negativo ocasionado pela dose de 300ppm, diminuindo a diferenciação de linfócitos, perdendo seu efeito protetor contra processos inflamatórios e aumentando a relação H:L.

Foi observado aumento dos níveis séricos de T3 e T4 nas aves que receberam a suplementação de 150ppm de vitamina E e 500ppb de cromo, fato que pode explicar

aumento no consumo de alimento dessas aves. Os hormônios da tireoide, T3 e T4, estão diretamente relacionados com o metabolismo animal e são necessários para manter a alta produção das aves. Várias pesquisas demonstram que, quando sob estresse por calor de forma crônica, os níveis séricos dos hormônios T3 e T4 caem, piorando o desempenho dos animais (Heninger et al., 1960; Bowen et al., 1984). Sahin et al. (2002b) suplementaram as dietas de frangos de corte com 4 níveis de cromo picolinato (200, 400, 800 e 1200 ppb de Cr) mais uma dieta basal sem suplementação e avaliaram os níveis séricos dos hormônios insulina, corticosterona, T3 e T4, bem como os níveis plasmáticos de glicose e colesterol das aves. A suplementação de cromo aumentou linearmente os níveis dos hormônios insulina, T3 e T4, e de forma inversa, diminuiu a concentração de corticosterona. De acordo com os efeitos observados nas concentrações dos hormônios, houve diminuição na concentração plasmática de glicose e colesterol, como o esperado, pois a insulina tem papel fundamental na captação de nutrientes pelas células, principalmente fibras musculares e adipócitos, e com mais substrato e mais T3 e T4, houve maior anabolismo.

Como esperado pelo efeito conhecido do cromo, houve efeito benéfico da suplementação de 1500ppb de cromo sobre os níveis de glicose e triglicerídeos no sangue. Sua ação é bem conhecida por aumentar a ação da insulina, ou seja, ele aumenta a sensibilidade dos receptores de insulina nas células e aumenta a captação de substrato (Sundaram et al., 2012). As aves alimentadas com o maior nível de cromo tiveram suas taxas de glicose e triglicerídeos circulantes reduzidas, concluindo que houve maior captação de substratos pelas células. O efeito foi mais evidente para a taxa de triglicerídeos no sangue do que para a glicose, mostrando que a insulina em aves tem menos efeito sobre a glicose do que comparado a mamíferos, pois aves possuem menor concentração do transportador de glicose GLUT 4 na membrana plasmática das células. Em relação à vitamina E, foi observado maior glicemia nas aves que não foram suplementadas com a vitamina, o que pode ter relação direta com a corticosterona. Apesar de não ter sido avaliado no presente estudo, as aves suplementadas com 150 ppm de vitamina E apresentaram menores níveis de corticosterona circulantes, o que pode ser concluído indiretamente por terem apresentado maior capacidade antioxidativa e menor estresse oxidativo. Maiores níveis circulantes de corticosterona tem efeito direto sobre aumento na glicemia dos

animais (Mayes, 1996), fato que pode explicar redução da glicemia nas aves suplementadas com vitamina E.

A maior captação de substratos pelas células pode explicar a melhor conversão alimentar dos animais suplementados com 150ppm de vitamina E e 1500ppb de cromo, portanto houve um efeito sinérgico entre a vitamina E, potente antioxidante e o cromo, responsável por melhorar a atividade da insulina, principalmente em situações de estresse.

Houve maior expressão relativa de HSP70 nas aves que receberam a suplementação com 150ppm de vitamina E e 1500ppb de cromo. Esse efeito mostra mais um mecanismo de ação cito protetivo que a vitamina E e o cromo possuem, ajudando a explicar a melhora na eficiência alimentar das aves submetidas ao estresse por calor consumindo os níveis combinados de 150ppm de vitamina E e 1500ppb de cromo. Heat shock proteins (HSP) são proteínas da família das chaperonas e possuem papel fundamental na homeostase proteica das células (Frydman, 2001), e também são fundamentais na degradação de proteínas e agregados proteicos (Doyle et al., 2013). As HSP's estão diretamente envolvidas em diversas atividades biológicas, como apoptose celular, carcinogênese e proteção contra moléculas citotóxicas, portanto tem sua síntese regulada sob condições de estresse ambientais, fisiológicas e fisiopatológicas (Baoge et al., 2015). A família da HSP70 é um grupo particular de chaperonas que tem a função de reduzir a desnaturação e agregação de proteínas induzidas pelo estresse (Rokutan, 2000).

Para avaliar o efeito da HSP70 em frangos de corte, Gu et al. (2012) avaliaram a inoculação de um agente inibidor da HSP, a quercetina e em outro tratamento, inocularam um agente estimulador da HSP70, a glutamina e mensuraram a expressão gênica da HSP70 nos enterócitos, os níveis séricos de corticosterona e a relação H:L, 0, 2, 3, 5 e 10 horas após a exposição dos animais a 36°C. Os autores constataram aumento da expressão gênica da HSP70 nas aves que receberam a glutamina 2 e 3h após a exposição do calor, menores níveis de corticosterona entre 2 e 5 horas de exposição e não viram diferença na relação H:L, porém nas aves que a quercetina foi inoculada, não houve diferença na expressão gênica do HSP70, houve maior concentração de corticosterona e a relação H:L foi maior. Outro resultado observado no experimento foi o aumento na concentração da enzima glutathione peroxidase (GSH-PX) após 2 horas de exposição ao calor nas aves inoculadas com a glutamina

e, portanto, houve correlação positiva entre a expressão de HSP70 e a concentração de GSH-PX. Fica evidente o poder protetivo da HSP70 e sua inibição ocasiona efeitos mais severos do estresse, como aumento nos níveis de corticosterona, aumento na relação H:L e aumento na concentração de MDA.

A vitamina E se mostrou eficaz em atenuar os efeitos negativos causados pelo estresse por calor, principalmente pelo seu efeito antioxidante evidenciado pela redução dos níveis de MDA e conseqüentemente teve capacidade de modular o sistema imunológico das aves. O cromo desempenhou seu papel de estimulador da insulina e aumentou a capacidade de captação de substratos energético para as células. Os dois nutrientes juntos exerceram um efeito sinérgico melhorando parâmetros de saúde, hormonal e energético e conseqüentemente aumentaram o desempenho produtivo dos frangos de corte submetidos ao estresse por calor.

5. CONCLUSÃO

A suplementação de 150ppm de vitamina E em conjunto com 1500ppb de cromo foi eficaz em melhorar a conversão alimentar de frangos de corte em condição de estresse por calor. Houve efeito sinérgico dos nutrientes estudados, melhorando a capacidade antioxidativa e conseqüente melhoria na saúde das aves.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHRAMI, A.; MOEINI, M.M.; GHAZI, S.H. et al. The effect of different levels of organic and inorganic chromium supplementation on immune function of broiler chicken under heat-stress conditions. *Appl. Poult. Scie. Res.* 21: 209-215. 2012.
- Baoge, Q.; Jia, Y.; Liu, Y.; Wang, H.; Ren, G.; Wang, H. 2015. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress and Chaperones.* 20: 885-892.
- Bowen S.J., Washburn K.W., Huston T.M. 1984. Involvement of the thyroid gland in the response of the young chicken to heat stress. *Poultry Sci.*, 63, 66-69.
- CASSUEC, D.C.; TINÔCO, I.F.F.; BAÊTA, F.C. et al. Thermal comfort temperature update for broiler chickens up to 21 days of age. *Eng. Agríc., Jaboticabal*, v.33, n.1, p.28-36, jan./fev. 2013.
- Dietert, R. R., K. A. Golemboski, and R. E. Austic. 1994. Environment- immune interactions. *Poult. Sci.* 73:1062-1076.
- Dohms, J. E., and A. Metz. 1991. Stress—Mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30:89-109.

DONKER, R.A., NIEUWLAND, M.G.B. and VAN DER ZIJPP, A.J. (1990) Heat-stress influences on antibody production in chicken lines selected for high and low immune responsiveness. *Poultry Science* 69: 599-607.

Doyle, S.M., Genest, O. and Wickner, S. (2013). Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 617-29.

FIGUEIREDO, E.M.; DONZELE, R.F.M.O.; DONZELE, J.L.; SOUSA, K.R.S.; CARDOSO, E.F.; SÉLOS, A.N.; SILVA, A.D.; JACOB, R.F. Glutamina para frangos de corte mantidos em termoneutralidade dos 21 aos 42 dias. *Semina. Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 1633-1642, 2015.

Frydman, J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 70, 603-47.

Gey, K.F. 1998. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *BioFactors* 7, 113–174.

González, R.; Sánchez de Medina, F.; Gálvez, J.; Rodríguez-Cabezas, M. E.; Duarte, J.; Zarzuelo, A. 2001. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 71, 243–250.

Gu, X. H.; Hao, Y.; Wang, X. L. 2012. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. *Poultry Science*. 91:790-799.

Harmon, B. G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Sci.* 77:972–977.

Hayirli, A., 2005. Chromium nutrition of livestock species. *Nutr. Abs. Rev. Ser. B: Livestock Feeds Feed.* 75, 1N–14N.

Heninger R.W., Newcorner W.S., Thayer R.H. 1960. The effect of elevated ambient temperatures and the thyroxine secretion rate of chickens. *Poultry Sci.*, 39, 1332–1337.

Jena, B.P.; Panda, N.; Patra, R.C. et al. Supplementation of vitamin E and C reduces oxidative stress in broiler breeder hens during summer. *Food and Nutrition Sciences*, 433-37. 2013.

Kim J, Cha YN, Surh YJ (2010) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* 690:12–23.

KLASING, K.C. (1998) Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science* 77: 1119- 1125.

Lawrence, D. A. 1996. Transforming growth factor-beta: A general review. *Eur. Cytokine Netw.* 7:363–374.

Leshchinsky, T. V., Klasing, K. C. 2003. Profile of Chicken Cytokines Induced by Lipopolysaccharide Is Modulated by Dietary α -Tocopheryl Acetate. *Poultry Science* 82:1266–1273.

Leshchinsky, T. V., Klasing, K. C. 2003. Profile of Chicken Cytokines Induced by Lipopolysaccharide Is Modulated by Dietary α -Tocopheryl Acetate. *Poultry Science* 82:1266–1273

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-428, 2001.

Marques, R. G., Morales, M. M., Petroianu, A., 2009. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir. Bras.* 24, 69-74. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000100015>.

Mayes, P. A. 1996. Gluconeogenesis and control of the blood glucose. Pages 153–162 in Harper's Biochemistry. 24th ed. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell, ed. Appleton and Lange, Stamford, CT.

MCDOWELL, L.R. (1989) Vitamins in animal nutrition: vitamin C, folacin, in: MCDOWELL, L.R. (Ed) Comparative Aspects to Human Nutrition, pp. 298-322.

Mench, J. A. 1992. Introduction: Applied ethology and poultry science. *Poultry Science* 71:631–633.

OLIVEIRA, R.F.M; DONZELE, J.L.; ABREU, M.L.T. et al. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.3, p. 797-803, 2006.

Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Promot Health* 2002;122:28–34.

Rajalekshmi, M., Sugumar, C., Chirakkal, H., Ramarao, V. Influence of chromium propionate on the carcass characteristics and immune response of commercial broiler birds under normal rearing conditions. 2014. *Poultry Science* 93 :574–580.

RASHIDI, A.A., GOFRANI, F., IVARI, Y., KHATIBJOO, A. and VAKILI, R. (2010) Effect of dietary fat, vitamin E and zinc on immune response and blood parameters of broilers reared under heat stress. *Research Journal of Poultry Science* 3: 32-38.

Ribeiro, A.M.L.; Vogt, L.K.; Canal; C.W. et al. 2008. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.4, p.636-644.

RIBOLDI, J. Delineamentos experimentais de campo - Parte 1 - Complementos - Versão 2. Porto Alegre: Instituto de Matemática - UFRGS, 2002 (Cadernos de Matemática e Estatística).

Rokutan, K. 2000. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection [J]. *J Gastroenterol Hepatol.* 15:12–19.

Rosen P.; Toeller, M. 1999. Vitamin E in diabetes. Increased oxidative stress and its prevention as a strategy to prevent vascular complications? *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 69, 206-212.

ROSTAGNO, H.S. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição dos alimentos e exigências nutricionais. 4ed. Viçosa: UFV; Departamento de Zootecnia, 2017. 488P.

RUMLEY, A.G.; PATERSON, J.R. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*, London, v. 35, n.2 p. 181-200, mar., 1998.

Sahin, K., Sahin, N. and Onderci, M. (2002a). Vitamin E supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, egg quality, digestibility of nutrients and egg yolk mineral concentrations of Japanese quails. *Research in Veterinary Science* 73: 307-312.

SAHIN, K., SAHIN, N., KUCUK, O., HAYIRLI, A. and PRASAD, A.S. (2009). Role of dietary zinc in heatstressed poultry: A review. *Poultry Science* 88: 2176-2183.

SAHIN, K., SAHIN, N., ONDERIC, M., GURSU, F. and CIKIM, G. (2002b) Optimal dietary concentration of chromium for alleviating the effect of heat stress on growth, carcass qualities, and some serum metabolites of broiler chickens. *Biological Trace Element Research* 89: 53-64.

SAHIN, K.; KÜÇÜK, O.; SAHIN, N. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on performance and plasma concentrations of insulin and corticosterone in laying hens under low ambient temperature. *Journal of Animal Physiology and Nutrition*, v.85, p.142-147, 2001.

SAHIN, K.; SAHIN, N.; KÜÇÜK, O. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high environmental temperature (32°C). *Nutrition Research*, v. 23, p. 225-238, 2003.

Sahin, N.; Akdemir, F.; Tuzcu, M.; Hayirli, A.; Smith, M. O.; Sahin, K. 2010. Effects of supplemental chromium sources and levels on performance, lipid peroxidation and proinflammatory markers in heat-stressed quails. *Animal Feed Science and Technology*. 159: 143-149.

SAS Institute, Inc. **SAS OnlineDoc® Version 9.1.3**. SAS Institute, Inc. 2010, Cary, NC, USA.

SILVA, S.R.G.; ABREU, M.L.T.; LOPES, J.B. et al. Desempenho e resposta imune de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com cromo na forma orgânica. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 21, n. 3, p. 199-203. 2014.

Sundaram B, Singhal K, Sandhir R. Ameliorating effect of chromium administration on hepatic glucose metabolism in streptozotocin-induced experimental diabetes. *Biofactors* 2012;38:59–68.

TINÔCO, I.F.F. A granja de frangos de corte. *Produção de frangos de corte/ editado por Ariel Antônio Mendes, Irenilza de Alencar Naas, Marcos Macari – Campinas: FACTA, 356p. 2004.*

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. de; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n. 7, p. 03-07, 2002.

YALCIN, S., OZKAN, S., TURKMUT, L. and SIEGEL, P.B. (2001) Responses to heat stress in commercial and local broiler stocks. 1. Performance traits. *British Poultry Science* 42: 149-152.