

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PRISCILA MICHELIN GROFF

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E
PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE
SUBMETIDOS A NUTRIÇÃO *IN OVO***

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS – PR

2018

PRISCILA MICHELIN GROFF

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E
PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE
SUBMETIDOS A NUTRIÇÃO *IN OVO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Profa. Dra. Sabrina Endo Takahashi.

DOIS VIZINHOS – PR

2018

G874a Groff, Priscila Michelin.
Avaliação do desempenho, morfometria intestinal e parâmetros de incubação de frangos de corte submetidos a nutrição *in ovo* / Priscila Michelin Groff – Dois Vizinhos, 2018.
71f.:il.

Orientadora: Prof. Dra. Sabrina Endo Takahashi
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos, 2018.
Bibliografia p.57-67

1. Aves - Criação 2. Nutrição animal 3. Metionina
I. Takahashi, Sabrina Endo, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos III. Título

CDD: 636.513

Ficha catalográfica elaborada por Rosana da Silva CRB: 9/1745

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 089

Avaliação do desempenho, morfometria intestinal e parâmetros de incubação de frangos de corte submetidos a nutrição *in ovo*

Priscila Michelin Groff

Dissertação apresentada às treze horas e trinta minutos do dia primeiro de fevereiro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Sabrina Endo Takahashi
UTFPR-DV

Patrícia Franchi De Freitas
UTFPR-DV

Cynthia Eyng
UNIOESTE

Coordenador do PPGZO
Assinatura e carimbo

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Ao meu Pai

Orides Groff

A minha mãe

Juete Groff

Minhas fontes de inspiração

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todo o bem que tens feito em minha vida, guiando meu caminho e dando forças para seguir em frente.

Sou imensamente grata a meus pais Orides Groff e Ivete Groff e minhas irmãs Daniela Groff e Michele Groff, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos em toda a minha vida. Por serem grandes exemplos de pessoas e sempre acreditarem no meu potencial.

À minha professora orientadora Sabrina Endo Takahashi, por todos os ensinamentos, aprendizados, conselhos, ajudas, pela amizade, pela orientação e por ter paciência, principalmente nessa etapa final, jamais conseguirei expressar toda minha gratidão.

Ao meu marido Daniel H. Urayama, pelo amor, incentivo e por me fazer acreditar que sou capaz quando eu nem acreditava que era. Em todos os momentos está ao meu lado e não mede esforços para me ajudar, nas horas difíceis dando seu apoio e nas conquistas comemorando comigo.

A todos meus familiares e amigos, que me apoiaram e me deram forças pra lutar pelos meus objetivos.

Aos integrantes do grupo de pesquisa em avicultura da professora Sabrina, que sempre ajudaram sem medir esforços nas etapas do experimento.

As amigas que o mestrado me deu de presente, Angelita Muzzolon, Joselaine Padilha, Suelen Einsfeld e Zilmara Czekoski. Que nossa amizade perdure sempre.

A pós-doutoranda Simone e ao professor Elias, pela ajuda nas análises estatísticas do trabalho e também pela amizade que criamos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da UTFPR, pela dedicação no ensino e por fazer nós alunos ir à busca de conhecimento e correr atrás dos nossos sonhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade do mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Avícola Carminatti em especial ao José Rodolfo dos Santos, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento da pesquisa.

Sou eternamente grata a todos vocês.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes"

(Martin Luther King)

GROFF, Priscila. M. **Avaliação do desempenho, morfometria intestinal e parâmetros de incubação de frangos de corte submetidos a nutrição *in ovo***. 2018. 71 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar duas técnicas e 3 dias distintos de incubação para realização na nutrição *in ovo* e avaliar o efeito da inoculação de aminoácidos *in ovo* sobre os parâmetros de incubação, desempenho produtivo e desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal de frangos de corte. Para isso, o experimento foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu em testar duas técnicas distintas em três dias diferentes de incubação. Nesse primeiro experimento foram selecionados 240 ovos embrionados da linhagem COBB®. Os ovos foram distribuídos em um arranjo fatorial 2 x 3 (duas técnicas e 3 dias) com 4 classes de peso dos ovos. As variáveis analisadas foram taxa de eclosão, peso do pinto ao nascimento, peso dos órgãos do trato gastrointestinal, avaliação da qualidade do pinto e classificação da mortalidade embrionária através do embriodiagnóstico. Na etapa 2 a melhor técnica e o melhor dia observados foram selecionados para a execução da etapa 2. Diante disso, foram selecionados 720 ovos embrionados e incubados em três tempos, com 240 ovos por vez. No total foram cinco tratamentos com 144 ovos por tratamento e 3 classes de ovos. Os tratamentos consistiram em grupo controle, metionina 20mg, metionina 30mg, lisina 20mg e lisina 30mg. Após a eclosão, esses animais foram alojados para realização das avaliações durante 14 dias. A campo, os animais permaneceram com os mesmos 5 tratamentos da incubação com 9 repetições mais o sexo com 4 a 12 animais por repetição (devido as diferentes taxas de eclosão por tratamento). Foi avaliado a taxa de eclosão, peso ao nascimento e qualidade dos pintinhos e mensurado a conversão alimentar, o consumo de ração, o ganho de peso ao 7º e 14º dia de vida. Também foram realizados cortes histológicos do intestino de um animal por repetição ao 14º dia, além de pesagens dos órgãos do trato digestivo na mesma data de dois animais por repetição. Os resultados da etapa 1 indicam que a técnica com eixo da agulha de 45º transpassando pela câmara de ar prejudica a eclodibilidade ($P < 0,05$). Enquanto isso, os dias de incubação (16, 17 e 18) não tiveram influência nas análises avaliadas. As demais variáveis nessa etapa não sofreram alterações para os tratamentos, porém, foi observado que os ovos maiores proporcionaram pintos maiores com moela maior ao nascimento ($P < 0,05$). Para a etapa dois, a inoculação de lisina (20 e 30 mg) prejudicou o taxa de eclosão ($P < 0,05$) e na dose 30mg os animais tiveram menor pontuação de qualidade. Para o desempenho, verificou-se que os machos consomem mais ração ao 7º e 14º dia ($P < 0,05$) e na segunda semana os animais que receberam metionina 20mg consumiram mais ração ($P < 0,05$) que o tratamento 30mg da lisina. Na pesagem dos órgãos não houve diferença entre os fatores avaliados. Para a morfometria intestinal, somente ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$) entre o fator dose para a relação cripta vilo e diâmetro de cripta. Dessa forma, a técnica como ângulo de 90º sem transpassar a câmara de ar é a mais indicada e os dias testados não tiveram nenhuma influência para os parâmetros avaliados. Além disso, a inoculação de metionina (20 e 30mg) obteve dados semelhantes ao

grupo controle. Já as doses de lisina utilizadas foram inviáveis aos embriões, por piorar grande parte dos parâmetros analisados.

Palavras chave: Avicultura. Desenvolvimento intestinal. Desempenho produtivo. Inoculação *in ovo*. Lisina. Metionina.

GROFF, Priscila. M. **Performance evaluation, intestinal morphometry and incubation parameters of broilers chickens submitted to in ovo nutrition.** 2018. 71 f. Dissertation. (Master of Animal Science) - Graduate Program in Animal Science, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate two different techniques and 3 days of incubation for in ovo nutrition and to evaluate the effect of in ovo amino acid inoculation on the parameters of incubation, productive performance and development of organs of the gastrointestinal tract of broilers. For this, the experiment was divided into two stages. The first step consisted of testing two distinct techniques on three different incubation days. In this first experiment, 240 embryonated eggs of the COBB® lineage were selected. The eggs were distributed in a 2 × 3 factorial arrangement (two techniques and 3 days) with 4 egg weight classes. The variables analyzed were hatch rate, chick weight at birth, weight of organs of the gastrointestinal tract, evaluation of chick quality and classification of embryonic mortality through embryonic diagnosis. In step 2, the best technique and the best observed day were selected for the execution of step 2. In this way, 720 embryonated eggs were incubated and incubated in three times, with 240 eggs at a time. There were five treatments with 144 eggs per treatment and 3 classes of eggs. The treatments consisted of control group, methionine 20mg, methionine 30mg, lysine 20mg and lysine 30mg. After hatching, these animals were housed for evaluation for 14 days. In the field, the animals remained with the same 5 incubation treatments with 9 replicates plus sex with 4 to 12 animals per replicate (due to different hatch rates per treatment). The hatch rate, birth weight and quality of the chicks were evaluated and feed conversion was measured, feed intake, weight gain at 7 and 14 days of life. Histological sections of the intestine of an animal were also performed by repetition on the 14th day, in addition to weighing the organs of the digestive tract on the same date of two animals per repetition. The results of step 1 indicate that the technique with 45 ° needle axis passing through the air chamber hinders hatchability (P <0.05). Meanwhile, incubation days (16, 17 and 18) had no influence on the analyzes evaluated. The other variables in this stage did not change for the treatments, however, it was observed that the larger eggs provided larger chicks with greater gizzard at birth (P <0.05). For stage two, the inoculation of lysine (20 and 30 mg) impaired the hatching rate (P <0.05) and at the dose 30mg the animals had lower quality score. For performance, males consumed more ration on days 7 and 14 (P <0.05) and in the second week, animals receiving methionine 20 mg consumed more ration (P <0.05) than the 30 mg treatment lysine. In the organ weighing, there was no difference between the evaluated factors. For intestinal morphometry, there was only a significant difference (P <0.05) between the dose factor for the crypt villi and crypt diameter. Thus, the technique as a 90° angle without passing through the air chamber is the most indicated and the days tested had no influence on the parameters evaluated. In addition, the inoculation of methionine (20 and 30mg) obtained data similar to the control group. However, the lysine doses used were not feasible for the embryos, because they worsened most of the analyzed parameters.

Keywords: Poultry farming. Inoculation in ovo. Lysine. Methionine. Productive performance. Intestinal development.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variáveis, definições e escores para avaliar a qualidade de pintos pós-eclosão 32
- Tabela 2.** Distribuição dos ovos nos tratamentos e nas classes de peso 34
- Tabela 3.** Composição centesimal e níveis nutricionais da ração experimental para frangos de 1-14 dias 37
- Tabela 4.** Peso vivo ao nascimento, taxa de eclosão e peso absoluto dos órgãos do trato gastrointestinal de pintos de corte com um dia que foram submetidos à inoculação in ovo com duas técnicas e 3 dias distintas de incubação 40
- Tabela 5.** Avaliação do peso vivo ao nascimento e peso absoluto da moela de pintos de corte com 1 dia de vida provenientes de 4 tamanhos distintos de ovos 41
- Tabela 6.** Taxa de eclosão e peso ao nascimento de frangos de corte submetidos à inoculação de aminoácidos in ovo. 46
- Tabela 7.** Ganho de peso de peso, consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte com 7 e 14 dias de idade submetidos a inoculação de aminoácidos in ovo..... 51
- Tabela 8.** Peso absoluto do intestino com o pâncreas, proventrículo e moela de frangos de corte, com 14 dias, submetidos a inoculação de aminoácidos in ovo. 53
- Tabela 9.** Altura de vilo, largura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do jejuno de frangos de corte, com 14 dias, que foram submetidos a inoculação de aminoácidos in ovo..... 54
- Tabela 10.** Avaliação do peso vivo ao nascimento de pintos de corte provenientes de 3 tamanhos distintos de ovos..... 56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Incubadora utilizada para realização dos experimentos (A). Ovoscopia, seta azul indicando a câmara de ar, seta vermelha indicando o embrião (B). Fonte: Groff, 2016..... 28
- Figura 2.** Pintinhos que nasceram nos sacos de “filó” 29
- Figura 3.** A: Técnica 1: inserção da agulha com ângulo de aproximadamente 45° em relação à câmara de ar, transpassando-a. B: Técnica 2: inserção da agulha com ângulo de aproximadamente 90° em relação à câmara de ar transpassando sua borda lateral sem perfura-la. Fonte: adaptado de Tali e Diego (2010). 30
- Figura 4.** Estrutura da unidade experimental. Fonte: Groff, 2016..... 36
- Figura 5.** Classificação da mortalidade embrionária de frangos de corte submetidos a inoculação in ovo em diferentes dias de incubação e técnicas. . 42
- Figura 6.** Avaliação da qualidade dos pintinhos ao nascimento que foram submetidos a distintas técnicas e dias de incubação para realização da nutrição *in ovo*..... 45
- Figura 7.** Classificação da mortalidade embrionária de frangos submetidos à inoculação in ovo de metionina e lisina. 48
- Figura 8.** Avaliação da qualidade dos pintinhos ao nascimento que foram submetidos à inoculação in ovo de metionina e lisina..... 49

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Comitê de ética	68
Anexo B: Ementa do comitê de ética	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Fisiologia do desenvolvimento embrionário	16
2.2 Nutrição <i>in ovo</i>	20
2.2.1 Técnicas para realização da nutrição <i>in ovo</i>	21
2.2.2 Período embrionário	22
2.3 Aminoácidos <i>in ovo</i>	23
2.3.1 Aminoácidos <i>in ovo</i> : Desempenho produtivo	24
2.3.2 Aminoácidos <i>in ovo</i> : desenvolvimento do trato gastrointestinal.....	25
2.4 Peso do ovo e parâmetros de incubação	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Descrição geral	27
3.2 Etapa 1: Influência de diferentes técnicas e períodos da incubação para realização da nutrição <i>in ovo</i>	28
3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos	28
3.2.2 Descrição das técnicas	29
3.2.3 Avaliações	30
3.2.4 Análise estatística	33
3.3 Etapa 2: Avaliação do desempenho, desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal e parâmetros de incubação de frangos submetidos a inoculação <i>in ovo</i> de lisina e metionina	33
3.3.1 Delineamento experimental e tratamentos	34
3.3.2 Avaliação dos parâmetros de incubação	35
3.3.3 Fase à campo	35
3.3.4 Fase à campo: Instalações e manejo	36
3.3.5 Avaliações dos parâmetros a campo	37

3.3.6 Análise estatística	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Etapa 1: avaliação de técnicas e períodos distintos para realização da nutrição <i>in ovo</i>	39
4.2 Etapa 2: Avaliação do desempenho, desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal e parâmetros de incubação de frangos submetidos a inoculação <i>in ovo</i> de lisina e metionina	45
5. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), estima-se que no ano de 2050 a população mundial chegará a 9,6 bilhões de habitantes. Para poder suprir essa demanda global por alimentos, levando em conta o ritmo de crescimento, é necessária uma expansão altíssima na produção e na oferta de alimentos (FAO, 2017).

Dessa forma, o Brasil ocupa hoje, um lugar de destaque no setor avícola de produção de carne, sendo o segundo maior produtor mundial desde dezembro de 2015, quando ultrapassou a China, com 13.546,5 milhões de toneladas (AVISITE, 2017).

No entanto, apesar desses bons índices do setor avícola ainda há diversas oportunidades para melhorar o desempenho produtivo dos animais. Concomitante a isso, alternativas nutritivas são desenvolvidas para otimizar cada vez mais a reposta produtivas dos frangos.

Nesse sentido, diferentemente dos mamíferos, as aves possuem seu desenvolvimento embrionário limitado pelos nutrientes presentes no ovo. Como as linhagens atuais possuem taxa de crescimento acelerado, conseqüentemente têm uma maior exigência metabólica, tornando o período pós-eclosão um fator limitante na eficiência produtiva (GONÇALVES et al., 2013).

Na fase de embrião, toda energia e nutrientes são fornecidos pelo ovo, que tem elevado teor de lipídios, aproximadamente 27g, mas relativamente baixa concentração de proteína (16g) (SANTOS et al., 2010). Além disso, baixas concentrações de carboidratos são encontradas no ovo, menos de 1% do total, e somente 0,3% deste total é glicose livre. Assim, para suprir à demanda de glicose e proteínas no final da incubação, o embrião lança mão do mecanismo de gliconeogênese, de origem proteica, que degrada as proteínas musculares (CAMPOS et al., 2011).

Associado a isso, o período pós-eclosão é um momento de grande estresse ao animal. Isso acontece como resultado das grandes mudanças de ambiente, transporte, jejum prolongado e pela excessiva manipulação. Assim, favorece a degradação de proteínas musculares para obter energia, através da gliconeogênese (GONÇALVES et al., 2013).

Essa perda de proteína muscular pode ser reduzida com o oferecimento de nutrientes *in ovo*, como, por exemplo, aminoácidos e carboidratos, assim, as aves conseguiriam maiores ganhos produtivos sem prejudicar a sua musculatura (PEDROSO et al., 2006). A nutrição *in ovo* é uma forma de minimizar as perdas decorrentes do período pós-eclosão que é bastante estressante para esses animais (GONÇALVES et al., 2013).

Ao injetar aminoácidos e proteínas no ovo, eles podem ser utilizados pelo embrião durante a fase de incubação para suportar o alto gasto energético da fase. Então, a nutrição *in ovo* é uma forma de “combustível” para eclosão, crescimento e desenvolvimento dos frangos (FOYE; UNI; FERKET, 2006).

A alimentação precoce, outra forma de se referir à nutrição *in ovo*, consiste na inoculação de nutrientes dentro do ovo embrionado, para que esse animal tenha acesso precocemente à alimentação. Essa técnica, estimula o desenvolvimento do trato digestório, peso vivo e estado nutricional nos primeiros dias de vida. O acesso ao alimento o mais rápido possível é de suma importância para os pintos recém-eclodidos conseguirem expressar seu máximo potencial (UNI et al., 2005).

Dessa forma, justificou-se a elaboração dessa pesquisa, para determinar qual técnica e em qual período embrionário é o correto para se administrar nutrientes *in ovo*. Além disso, avaliar a taxa de eclosão, desempenho zootécnico inicial e o desenvolvimento dos órgãos do trato digestório de frangos de corte, submetidos à nutrição *in ovo*, com soluções nutrientes a base dos aminoácidos lisina e metionina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiologia do desenvolvimento embrionário

O período embrionário é uma fase de grande impacto para os frangos de corte, pois representa grande parte da vida desses animais. A exemplo disso, um frango vive em média 42 dias de idade e o tempo de incubação é de 21 dias. Nesse sentido, essa fase representa cerca de 30% da vida de um frango (GONÇALVES et al., 2013).

O desenvolvimento embrionário inicia-se no oviduto esquerdo da galinha, logo após a fertilização do oócito (FASENKO; ROBINSON; ARMSTRONG, 1991). O local exato do início do desenvolvimento é no infundíbulo, local da fecundação, e continua dentro do trato reprodutivo da galinha, de 24-26 horas, com temperatura aproximada de 41,5°C.

A primeira clivagem ocorre no istmo, 6 a 8 horas após a fertilização, esse desenvolvimento inicial é chamado de filogênese e após isso, o oócito é transportado para o útero (CHRISTENSEN, 2001). Nesse momento, é possível verificar um disco, plano germinal na superfície da gema e esse disco será conhecido como blastodisco. Essa estrutura separa-se da gema por uma cavidade cheia de líquido denominada de cavidade subgermal (WATT; PETITTE; ETCHESS, 1993).

Nas últimas 8 horas antes da postura do ovo, o blastodisco é diferenciado em duas regiões, a zona pelúcida e a área opaca na periferia, sua estrutura aumenta, passando a se chamar de blastoderme (CHRISTENSEN, 2001). Segundo Gupta e Bakst, (1993) na postura o embrião já tem de 300.000 a 600.000 células.

Após a postura ocorre a coleta dos ovos nas granjas, os ovos são mantidos refrigerados até o início da incubação. Esse momento é denominado como fase de estocagem. A necessidade de manter os ovos em temperatura inferior a 21°C, nesse período, é para atingir o zero fisiológico e paralisar o desenvolvimento do embrião (NAZARENO et al., 2014). Isso acontece pois, após o fornecimento de calor ao ovo e umidade controlada, esses devem ser constante para não ocorrer mortalidade embrionária precoce por instabilidade de temperatura.

Antes de levar os ovos para as máquinas incubadoras e iniciar a incubação, eles precisam ser pré-aquecidos, já que é indicado que a temperatura do ovo no momento de entrar na incubadora seja de 26 a 28°C. Isso evita possíveis choques térmicos e mortalidade inicial dos embriões.

No início da incubação, a temperatura e umidade são importantes variáveis para um bom desenvolvimento embrionário, sendo que elas impulsionam o crescimento do embrião (CHRISTENSEN; DONALDSON; NESTOR, 1999). Normalmente os incubatórios regulam a temperatura e umidade das incubadoras de acordo com os melhores índices de eclosão

obtidos. De forma geral, a temperatura é programada para 37,5 a 37,8°C enquanto que a umidade gira em torno de 55 a 65%.

Com o início da incubação completa-se o processo de gastrulação (VAKAET, 1984). Após as primeiras 24 horas de incubação, o embrião é caracterizado pelo blastoderme e na periferia há um anel transparente de área opaca (CHRISTENSEN, 2001). Esse mesmo autor relata que na porção opaca há formação de ilhas sanguíneas ou até mesmo, vasos sanguíneos precoces (vasculogênese).

A partir de 48 horas de incubação, há presença de 4 somitos e a região das vesículas ópticas começam a aumentar de pressão e as três maiores divisões do cérebro estão presentes (CHRISTENSEN, 2001).

Com 72 horas de incubação, a quantidade de somitos presentes passa para 10, há formação dos corpos ópticos e separação das dobras neurais na região do coração. Com isso, a região da cabeça e do coração são cobertas pelo âmnio. É importante ressaltar que o sistema circulatório extraembrionário está completo, entretanto, ainda não há bombeamento pelo coração e só é possível visualizar ilhas de sangue (CHRISTENSEN, 2001).

No quarto dia de incubação, o embrião passa a ter 38 pares de somitos e o âmnio cobre quase que na totalidade o embrião. O telencéfalo é visível e abaulado para formar os dois hemisférios cerebrais e aparece fissuras no mesencéfalo e no rombencéfalo (CHRISTENSEN, 2001). Dessa forma, nesse momento é evidente a presença das flexuras e a formação do sistema nervoso central (LE DOUARIN; GRAPIN-BOTTON; CATALA, 1996). Além disso, o coração começa a bombear o sangue, e o alantoide torna-se visível (CHRISTENSEN, 2001).

Do quinto até o 18º dia de incubação, é um período de intenso crescimento embrionário. Embora o embrião esteja estruturalmente completo ao 14º dia de incubação, fornecer os meios para suportar a transição para um pintinho independente nos 7 dias restantes é muito importante (MORAN JR, 2007).

Próximo ao momento da eclosão, o embrião expande dentro do saco amniótico e a albumina livre entra para dentro do âmnio e assim, o consumo e absorção de nutrientes do fluido albumina-amniótica são contínuos até que esgote essa fonte (MORAN JR, 2007).

A nutrição dos embriões, durante a fase de incubação, se dá totalmente pela gema. Por volta do 19º ao 20º dia de incubação, ela é direcionada para dentro da cavidade abdominal e continua fornecendo energia durante alguns dias pós eclosão (RUTZ et al., 2005).

No entanto, nos últimos dias da incubação o embrião torna-se capaz de ingerir o líquido amniótico (que recebeu o restante do albúmen) e isso faz com que ocorra um grande desenvolvimento das vilosidades intestinais (UNI et al., 2003). Segundo esses autores, esse rápido desenvolvimento do intestino faz com que ele seja um dos órgãos que mais cresce no final da incubação, passando de 1% do peso vivo do animal, ao 18º dia, para 3,5% no momento do nascimento.

Desse modo, a nutrição *in ovo* é possível, pois após o 15º dia de incubação, o embrião possui capacidade de ingerir o líquido amniótico e ingerir os nutrientes que foram inoculados na cavidade alantoide (KLASING, 1998) uma vez que nesse local os nutrientes irão se misturar ao líquido amniótico (UNI e FERKET, 2003). Além disso, a partir desse dia, o embrião já tem enzimas digestivas, tornando viável à inoculação de nutrientes *in ovo*, pois assim esses embriões vão conseguir digerir e absorver os nutrientes inoculados (SKLAN et al., 2003).

Após a eclosão, o trato gastrointestinal dos pintos está pronto anatomicamente, mas funcionalmente ainda está imaturo. Dessa forma, o intestino continua crescendo rapidamente, com taxa de crescimento superior aos demais tecidos (NOY; UNI; SKLAN, 1996).

Os enterócitos provenientes do embrião são funcionais para transferência de imunoglobulinas e, após o nascimento, inicia-se formação de enterócitos especializados na absorção e digestão (UNI et al., 2003). Somente com aproximadamente duas semanas de vida, a transição dos enterócitos especializados é completa, por isso, nesse momento ocorre o desaparecimento das células embrionárias remanescentes (MORAN Jr., 2007).

2.2 Nutrição *in ovo*

A inoculação de materiais biológicos “*in ovo*” já é uma realidade nas empresas do setor avícola. Essa prática iniciou-se com Sharma e Burmester (1982), com a vacinação embrionária contra o Herpes Vírus de Perus (HVT) em ovos de matrizes de frango de corte.

O método de “alimentação *in ovo*” ou também chamado de “alimentação precoce”, além de suplementar para disponibilizar mais nutrientes na eclosão e ou armazenamento dos mesmos, caso necessitem mobilização em alguma fase, pode ajudar a suprir algumas deficiências nutricionais dos embriões para alcançarem ao seu total potencial de crescimento (TAKO; FERKET; UNI, 2004). Isso irá gerar possíveis ganhos produtivos, principalmente nos primeiros dias de idade do animal, em que ocorre um maior crescimento das aves (LEITÃO et al., 2014).

Para isso, visando cada vez mais o aumento da produção, a inoculação de nutrientes *in ovo* pode ser uma ferramenta às empresas do setor avícola, para obtenção de melhores resultados. Conseguindo aumentar a taxa de eclosão, por menor que seja, já representaria grande acréscimo econômico e produtivo para as empresas (IPEK; SAHAN; YILMAZ, 2004).

A técnica consiste em fornecer nutrientes para os pintinhos ainda na fase de desenvolvimento embrionário, com nutrientes específicos (CAMPOS; GOMES; ROSTAGNO, 2010). Para isso, perfura-se a casca do ovo embrionado e inocula-se o nutriente por meio de uma seringa e agulha no líquido amniótico (LEITÃO et al., 2014). Entretanto, pode-se realizar a inoculação em outros locais do ovo como a gema, o albúmen e o próprio embrião (OHTA; KIDD; ISHIBASHI, 2001).

Outra importância da nutrição *in ovo* é o estímulo do desenvolvimento da mucosa do intestino delgado dos animais, de forma precoce. Isso melhora a absorção de nutrientes. Esse desenvolvimento intestinal acontece devido à presença e ingestão de nutrientes que foram inoculados no ovo (LEITÃO et al., 2014).

Dessa forma, todo processo de digestão dos nutrientes e absorção dos mesmos, necessita da boa funcionalidade do intestino. Por isso, melhorias no desenvolvimento da mucosa intestinal, por menor que seja já é um grande

avanço para o melhor aproveitamento da dieta e, conseqüentemente, maiores ganhos produtivos (CHELED-SHOVAL et al., 2011).

Os grandes ganhos produtivos que ocorrem na inoculação de nutrientes *in ovo*, são visíveis nos parâmetros de incubação e no desempenho produtivo nas primeiras semanas de vida. Esses acréscimos iniciais repercutirão positivamente por toda vida produtiva do animal.

Por isso, Pedroso et al. (2006) avaliaram o efeito de diversos nutrientes inoculados no ovo sobre o desempenho dos frangos até 10 dias de vida. Já que nesse período será possível verificar possíveis resultados positivos de desempenho desses animais.

A nutrição *in ovo* também é importante para melhorar o *status* imunológico do animal, sendo que o recebimento de nutrientes por esses animais aumenta a sobrevivência embrionária. Assim, irão conseguir expandir seu potencial genético, sendo que conseguirão ficar menos susceptíveis a possíveis infecções, que levariam a queda no desempenho ou até mesmo, a morte (BHANJA et al., 2012).

2.2.1 Técnicas para realização da nutrição *in ovo*

Os possíveis locais “alvo” da inoculação *in ovo* podem ser, segundo Ohta; Kidd; Ishibashi (2001), na gema, no próprio embrião na cavidade amniótica (presença do líquido amniótico) ou no alantoide. Entretanto, esses autores verificaram que no líquido amniótico os melhores resultados de peso do embrião são encontrados. Esses autores explicam que o motivo para os melhores resultados inoculando nesse local é devido ao fato de que o embrião consome o líquido amniótico quando esse animal está ainda no ovo. Enquanto que a gema, ou outros locais, não são ainda ingeridos pelo embrião. Segundo eles, a inoculação na gema, demonstra resultados de ganhos produtivos por volta dos 12 dias de vida, pela absorção tardia, quando comparado com a inoculação na cavidade amniótica, que é imediata.

Lotfi, Aghdam Shahryar e Kaya (2013) realizaram a inoculação *in ovo* no albúmen no 5º e no 10º dia de incubação. Esses autores encontraram piora na taxa de eclosão, entretanto o peso ao nascimento os ovos que foram submetidos

ao nutriente *in ovo* foram melhores. Para essa técnica os autores utilizaram ângulo de 45° em relação a câmara de ar, com agulha 22 G, para chegar no albúmen.

Leitão et al. (2010) testaram a inoculação *in ovo* com soluções de maltose, sacarose e glicose utilizando duas formas de aplicação. Esses autores encontraram piora da taxa de eclosão quando a inoculação era feita na cavidade alantoide transpassando a agulha pela câmara de ar. Nesse sentido, esses autores verificaram que quando a inoculação era realizada na cavidade alantoide sem ter contato com a câmara de ar a eclodibilidade era maior.

No entanto, pouco se sabe sobre a eficiência dessas duas técnicas, principalmente o risco de perfurar o embrião no momento da inoculação. A agulha utilizada para realizar esse procedimento, em ambos eixos de aplicação é de 21G (0,8x25mm) (UNI et al., 2005) até 24G (0,5x20mm) (CAMPOS et al., 2011). Segundo Mohammadrezaei; Nazem; Mohammadrezaei (2015) há poucos estudos para determinar o tempo e técnica ideal da inoculação de nutrientes *in ovo*.

2.2.2 Período embrionário

Com relação ao período embrionário para realização da técnica, segundo Klasing (1998) pode ser feita a partir do 15º dia, quando o embrião já possui a capacidade de ingerir o líquido amniótico. Dessa forma, ao inocular substâncias na cavidade alantoide, é necessário considerar essa informação.

Entretanto, há estudo que realizaram a inoculação *in ovo*, em fases anteriores a esse período. Nesse sentido, Vieira et al. (2006) realizaram a inoculação *in ovo* com glutamina e lisina (1g/100 mL) ao 11º dia de incubação. Esses autores não encontraram diferença para o peso vivo dos pintos e para as características morfológicas do intestino nos primeiros dias de vida. Assim, a fase de inoculação pode ser um fator limitante para um bom aproveitamento dos nutrientes inoculados pelo embrião, podendo ser um importante fator no sucesso da técnica.

Enquanto isso, Uni et al. (2005) realizaram um estudo inoculando nutrientes *in ovo* a base de proteínas e carboidratos ao 17,5º dia de incubação.

Apesar dos resultados para a taxa de eclosão não terem sido convincentes, os autores observaram aumento das reservas energéticas nos animais que receberam as soluções proteicas e a base de açúcares.

Dessa forma, no trabalho de Damasceno et al. (2017), inoculando proteína isolada de soja no 17º dia de incubação, esses autores encontraram efeitos positivos na relação do tamanho do pinto com o ovo. Enquanto isso, os rendimentos de incubação, o desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal e o desempenho de pintos na fase pré-inicial não foram melhorados.

Ao 16º dia também foi realizado a inoculação de nutrientes *in ovo*. Concomitante a isso, Leitão et al. (2014), nesse período, inocularam *in ovo* soluções a base de maltose e sacarose. Todavia, esses autores não encontraram diferença para o desempenho produtivo inicial e para a eclodibilidade houve piora do parâmetro em relação ao grupo controle.

Portanto, é possível observar uma diversidade de datas de incubação para a realização da nutrição *in ovo*. Contudo, após o 15º dia de incubação há um predomínio das pesquisas na escolha do dia quando o local alvo da inoculação é na cavidade alantoide. Mesmo assim, é importante testar esses dias para realizar a inoculação, a fim de saber se o dia pode ter interferência no resultado final.

Dessa forma, por ser uma técnica ainda pouco explorada, a nutrição *in ovo* necessita de padrões para que seja possível saber realmente sua eficiência. Com base nisso, é importante testar os dias ideais, técnicas distintas e doses dos nutrientes a serem administrados.

2.3 Aminoácidos *in ovo*

Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo animal não consegue produzir ou sintetizar em quantidades suficientes e são extremamente importantes para o bom funcionamento do organismo.

A metionina é o primeiro aminoácido essencial limitante nas rações para frangos. Logo em seguida está a lisina, como o segundo aminoácido essencial limitante. Ambos são fisiologicamente importantes na manutenção, crescimento e

na produção das aves, principalmente pela síntese de proteínas musculares (COSTA et al., 2014). Dessa forma, esses aminoácidos fazem parte do metabolismo das proteínas, que são importantes para o produto final que é a carne.

Por esses motivos é que se busca o fornecimento desses dois aminoácidos dentro do ovo embrionado (CAMPOS; GOMES; ROSTAGNO, 2010). Além disso, um dos principais intuitos da inoculação da metionina e lisina, são para diminuir a perda de proteína muscular, devido ao catabolismo proteico, que ocorre para suprir toda demanda de energia que acontece na fase pós-eclosão (PEDROSO et al., 2006). Assim, a suplementação *in ovo* pode diminuir a perda de proteínas musculares ocasionada para suprir o alto gasto de energia da fase.

Em especial, a lisina é um aminoácido de referência, já que tem funções metabólicas exclusivamente na deposição de proteínas musculares (Pack, 1995). Diferentemente da lisina, a metionina é um aminoácido que além de participar da síntese proteica, tem funções no sistema imune da ave e na exigência de manutenção (OLIVEIRA NETO E OLIVEIRA, 2009).

2.3.1 Aminoácidos *in ovo*: Desempenho produtivo

Para que o pintinho recém eclodido consiga atingir seu crescimento ideal, ele necessita que a dieta contenha aminoácidos em equilíbrio. Nesse sentido, é importante que os aminoácidos essenciais estejam presentes, nas proporções ideais, pois eles são importantes para o crescimento (OHTA e KIDD, 2001).

Como já comprovado nos estudos de Ohta, Kidd e Ishibashi (2001) e Johri et al. (2004) a inoculação de aminoácidos durante a fase embrionária (*in ovo*) é viável, pelo aumento de desempenho produtivo, principalmente do peso vivo da ave por suplementar a quantidade de aminoácidos do embrião.

Ohta, Kidd e Ishibashi (2001) inocularam soluções a base de aminoácidos *in ovo*, entretanto, o local de inoculação foi na gema do ovo. Quando comparado ao grupo controle, no qual foi injetado apenas água destilada estéril, a solução com aminoácidos gerou maiores valores de eclodibilidade e de peso inicial do

pintinho. Dessa forma, a injeção de aminoácidos demonstra ser promissora à esses animais, já que tiveram impacto positivo no peso inicial.

No estudo de Johri et al. (2004), analisando a inoculação de soluções contendo vários aminoácidos *in ovo*, verificaram que a solução de aminoácidos utilizada, gerou maior peso inicial do pintinho. Além disso, encontraram melhor desenvolvimento do sistema imunológico nesses animais.

Os autores Foye, Uni e Ferket (2006) fazem uma comparação entre o gasto energético que ocorre na incubação, pelos embriões, ao processo de um exercício de alta intensidade e longa duração de um atleta. Durante o processo de incubação, os embriões possuem alto gasto energético para seu crescimento e, principalmente para a eclosão. Mas esses animais têm sua nutrição limitada pelos nutrientes do ovo. Por isso, esses autores verificaram em sua pesquisa que a alimentação *in ovo* com proteínas e também hidratos de carbono pode ajudar a aliviar a depleção de glicose pelo carregamento de glicogênio antes da eclosão.

Al Murrani (1982) foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar que a injeção de aminoácidos *in ovo* aumenta o peso ao nascimento dos pintos e, conseqüentemente, aos 56 dias há também aumento de peso. Dessa forma, esse autor confirmou sua teoria, que o conteúdo proteico presente no ovo pode restringir a expressão de todo potencial genético da ave para ganho de peso.

2.3.2 Aminoácidos *in ovo*: desenvolvimento do trato gastrointestinal

Existem diversos nutrientes que podem ser inoculados *in ovo* e isso irá depender do objetivo esperado. Os mais utilizados são os carboidratos, que em geral fornecem energia. A vitamina E, o cobre e os probióticos, que são importantes para o sistema imunológico. E por fim, os aminoácidos, para o anabolismo de proteínas (CAMPOS; GOMES; ROSTAGNO, 2010).

A mucosa intestinal (jejuno) dos frangos normalmente é avaliada para obter resultados referentes ao efeito da inoculação *in ovo*. Isso acontece, devido a sua sensibilidade às mudanças das dietas impostas, pois é a primeira área de absorção dos nutrientes nos frangos (MOHAMMADREZAEI; NAZEM; MOHAMMADREZAEI, 2015).

Mohammadrezaei, Nazem e Mohammadrezaei (2015) avaliaram o efeito da injeção *in ovo* do aminoácido metionina, em diferentes níveis, sobre o desenvolvimento da mucosa do intestino delgado, na porção do jejuno, em frangos de corte. Eles verificaram que a inoculação do aminoácido metionina aumentou a altura e a largura das vilosidades intestinais. Dessa forma, esse aumento da superfície das vilosidades intestinais, causada pela inoculação da metionina, vai melhorar a absorção dos nutrientes, por aumento do desenvolvimento da mucosa intestinal.

No estudo de Salmanzadeh et al. (2016), ao inocular glutamina *in ovo* (aminoácido não essencial) verificaram que nas doses de 40 e 50 mg/0,5ml foi possível obter melhor desenvolvimento do intestino delgado, na porção do jejuno quando comparado com doses inferiores (10, 20 e 30 mg/0,5ml) e com o grupo controle. Isso foi observado através da avaliação da altura e largura das vilosidades e profundidade de cripta.

2.4 Peso do ovo e parâmetros de incubação

O tamanho do ovo pode ter interferência nos resultados dos parâmetros de incubação. Isso pode afetar tanto o peso do pintinho ao nascimento, como a taxa de eclosão ou peso absoluto dos órgãos. A idade da matriz influencia o tamanho do ovo, mas dentro do próprio lote há variações no tamanho.

Diante disso, Nascimento et al. (2015) avaliaram a influência do peso do ovo para a taxa de eclosão e para o peso dos pintos ao nascimento. Esses autores encontraram que ovos pesados, com peso entre 70-73g, obtêm pintos com maior peso vivo inicial quando comparados com ovos pequenos e médios. Ao contrário disso, para a taxa de eclosão, ovos pequenos (62-65g) tiveram os maiores valores do que ovos pesados e médios.

Essa diferença acontece devido a diferença na quantidade e composição dos nutrientes em cada classe de ovos (MAIORKA, 2003; TEIXEIRA et al., 2012). Dessa forma, a classificação dos ovos por tamanho/peso é importante para homogeneizar o nascimento.

Segundo Furtado et al. (2011) ovos pesados necessitam de mais horas de incubação. Por esse motivo, quando incubados juntos com ovos menores,

pode prejudicar a taxa de eclosão, já que a janela de nascimento não irá atender a necessidade de cada tamanho de ovo.

No trabalho de Riccardi, Malheiros e Boleli et al. (2009) verificaram que pintos de ovos pesados (73,6g) em relação aos ovos menores, apresentam maior peso corporal, peso fígado, índice hepatossomático, peso do coração, peso do saco vitelínico e secos. Possivelmente isso acontece, pois os ovos maiores possuem maior proporção de água, gordura e proteínas (BURNHAM et al., 2001; CARDOZO et al., 2002). Dessa forma, contribui para que o pinto recém eclodido tenha peso vivo e peso de certos órgãos, maiores que ovos leves.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição geral

Essa pesquisa foi elaborada em duas etapas distintas. A primeira delas (etapa 1) foi para testar duas técnicas distintas na realização da inoculação *in ovo*, bem como testar três dias diferentes para execução do procedimento. Na próxima etapa, a melhor técnica e dia encontrados na etapa 1 foi selecionado para a realização da etapa 2, que foi para testar os efeitos da inoculação *in ovo* de aminoácidos (lisina e metionina).

A incubação dos ovos em ambas etapas foi realizada no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Para as avaliação “a campo” o experimento foi conduzido na UNEPE de Pequenos Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR, no Campus de Dois Vizinhos.

A incubação dos ovos foi realizada em uma incubadora automática da marca *Brood* Chocadeira modelo GOLD MASTER 1, com capacidade para 240 ovos (Figura 1a). Com controle da temperatura ($37,5^{\circ}\text{C} \pm 1,32$) e da umidade ($65\% \pm 2,46$) e viragem automática dos ovos a cada hora.

Tanto para a etapa 1 como para a etapa 2, ao 7º dia de incubação foi realizada ovoscopia para descartar os ovos inférteis, os quais, são identificados pela ausência da formação do blastoderme. Ao 15º dia a ovoscopia foi novamente realizada para descartar embriões mortos, por ausência de

movimentos à exposição da luz e também para delimitar a região da câmara de ar (figura 1b).

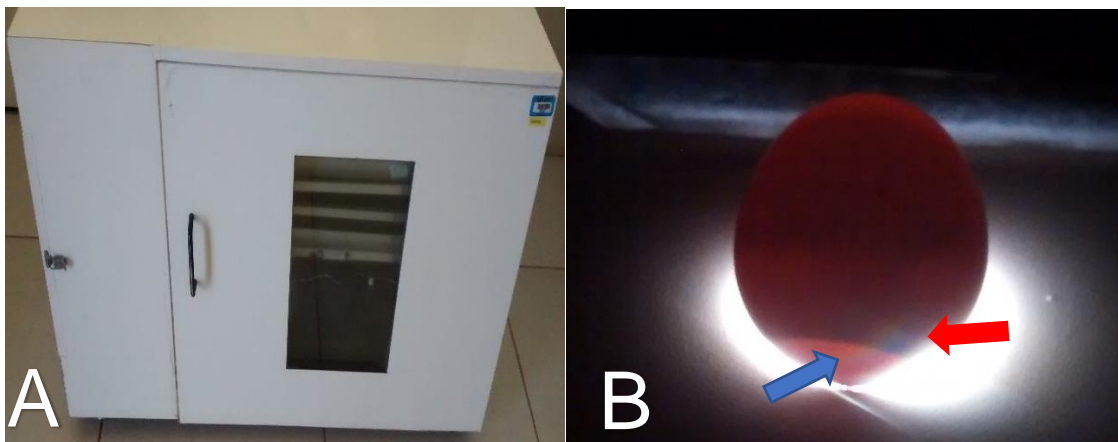


Figura 1. Incubadora utilizada para realização dos experimentos (A). Ovoscofia, seta azul indicando a câmara de ar, seta vermelha indicando o embrião (B). Fonte: Groff, 2016.

3.2 Etapa 1: Influência de diferentes técnicas e períodos da incubação para realização da nutrição *in ovo*

3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos

Foram selecionados 240 ovos embrionados com peso médio $60\text{g} \pm 3,47$ provenientes de linhagem Cobb 500®, de matrizes do mesmo lote, com 40 semanas de idade, mantidas sob mesma dieta e condições ambientais.

Esses ovos foram pesados, separados por tamanho, gerando 4 grupos com 60 ovos cada. Considerou-se essa distribuição como uma variável classificatória de efeito fixo. Após isso, os ovos foram incubados, sendo que em cada classe, todos os tratamentos estavam distribuídos com a mesma quantidade de ovos. As classes dos ovos foram: pesados ($65\text{g} \pm 1,41$), médios ($62\text{g} \pm 0,74$), leves ($59\text{g} \pm 0,81$) e superleves ($56\text{g} \pm 1,32$).

A estrutura dos tratamentos consistiu em um arranjo fatorial 2×3 , ou seja, duas técnicas distintas (descritas a seguir no item 3.2.2) e três datas diferentes de incubação para realização da inoculação *in ovo* (16, 17 e 18º dia). No total

foram 6 tratamentos, 4 repetições (classes de ovos) e 10 ovos por cada repetição.

Todos os 6 tratamentos receberam 0,5 ml da solução nutriente de glicose, para isso foi diluído 0,2 ml de glicose 50% em 0,5 mL tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*), totalizando 0,7 ml. Desse total, 0,5 ml eram utilizados para realização na inoculação. Após o término da inoculação os ovos foram colocados em sacos de “filó” para que ao nascer os animais não se misturassem e, após isso, foram recolocados no nascedouro na mesma incubadora (Figura 2).



Figura 2. Pintinhos que nasceram nos sacos de “filó”

3.2.2 Descrição das técnicas

Foram usadas duas técnicas. Em ambas previamente a inoculação os ovos foram higienizados com álcool iodado a 2% e a casca perfurada com auxílio de agulhas estéreis de 2,00 mm de diâmetro. Lembrando que se deve evitar perfurar a membrana interna da casca do ovo com essa agulha.

As duas metodologias foram desenvolvidas em testes prévios e o local da inoculação dos nutrientes, em ambas, foi no alantoide, a fim de assegurar a ingestão da solução pelo embrião, já que a solução se difunde ao líquido amniótico (UNI e FERKET, 2003). Ao término de ambas técnicas, o orifício foi lacrado com solução de parafina (GONZÁLES et al., 2013; CAMPOS et al., 2011).

A inoculação da substância nutricional foi realizada por meio de seringa de 1 ml com agulha 0,55x20mm com auxílio de um campo luminoso para delimitação da câmara de ar (UNI et al., 2005). Para a técnica 1 a agulha foi inserida em ângulo de aproximadamente 45° em relação a câmara de ar, no centro, transpassando a agulha pela câmara até chegar no alantoide (Figura 3A). Na técnica 3 (Figura 3B), a inserção da agulha no ovo foi com ângulo de aproximadamente 90° em relação a câmara de ar, porém não a transpassando, mas sim transpassando a borda lateral da mesma, até atingir o alantoide.

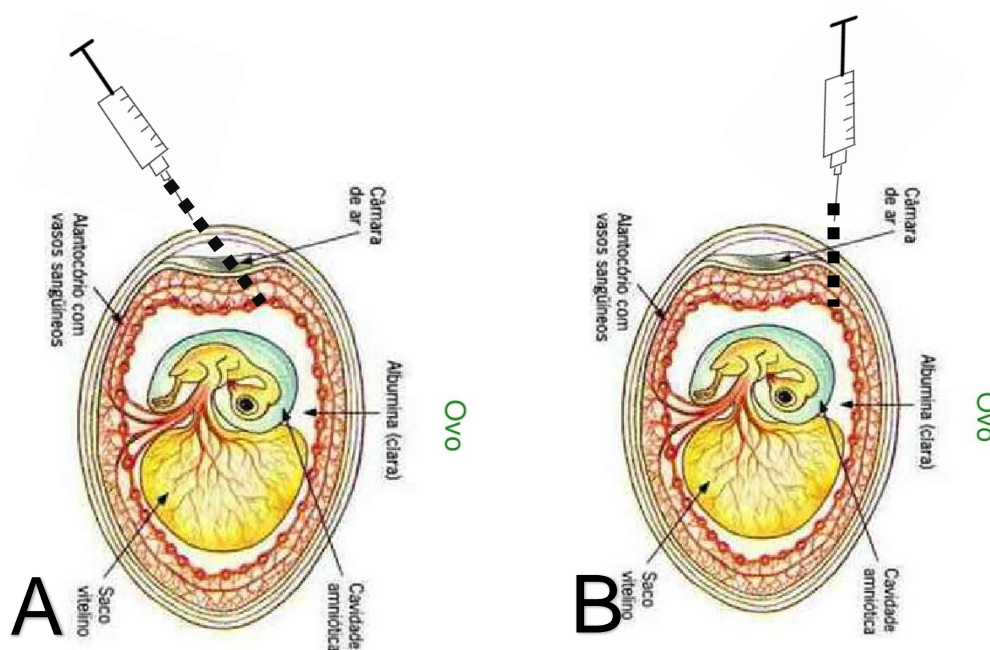


Figura 3. A: Técnica 1: inserção da agulha com ângulo de aproximadamente 45° em relação à câmara de ar, transpassando-a. B: Técnica 2: inserção da agulha com ângulo de aproximadamente 90° em relação à câmara de ar transpassando sua borda lateral sem perfurá-la. Fonte: adaptado de Tali e Diego (2010).

3.2.3 Avaliações

Após o nascimento dos animais, com 21 dias, foi avaliada a taxa de eclosão. Para obtenção desse valor, foi considerado o número de ovos eclodidos

com relação número de ovos incubados. Para os ovos não eclodidos foi realizada embriodiagnóstico para classificar a mortalidade embrionária.

O embriodiagnóstico, foi conduzido segundo guia de manejo de incubação da Cobb-Vantress. Nesse sentido foi classificado a mortalidade embrionária em precoce (1 a 17 dias), pós inoculação (18 a 21 dias), pós-bicagem da casca (ovos bicados e não nascidos) e ovos inférteis.

Também foi avaliada a qualidade dos pintos pós-eclosão. Para essa avaliação, os animais foram observados macroscopicamente, para classificá-los em boa, média ou má qualidade, segundo os critérios de Tona et al. (2003).

As estimativas da qualidade do pintinho incluem avaliar as condições físicas, tais como, olhos, conformação das pernas, aspecto do umbigo. Estas características foram pontuadas de acordo com a sua importância dentro de uma escala. O nível da pontuação para cada característica está relacionada com a sua importância na sobrevivência do animal e da gravidade de qualquer anomalia.

A soma das pontuações para todas as características citadas forneceu o resultado da qualidade das aves, conforme a tabela 1. Pintinhos que somaram o escore de 100 pontos foram considerados ótimos, os que somaram entre 80 a 99 pontos foram considerados bons, aqueles com escore entre 50 a 79 pontos foram considerados de médias qualidade e os que somaram 49 pontos, ou menos, foram classificados como fracos.

Tabela 1. Variáveis, definições e escores para avaliar a qualidade de pintos pós-eclosão

Variável	Definição	Características	Escore
Atividade	Verificada quando se coloca o pintinho de costas. Um rápido retorno a posição em pé é definido como boa. Quando permanecer deitado, é definido como fraco.	Bom	16
		Médio	8
		Fraco	0
Penugem	A aparência deve ser limpa e seca. Quando estiver úmida e suja, ou ambos são cotados como ruins.	Limpa e seca	12
		Limpa e úmida	6
		Suja e úmida	0
Olhos	Coloca-se o pintinho em pé e observam-se seus olhos, o brilho e a extensão que ocupa a pálpebra sobre o olho.	Abertos e brilhantes	10
		Abertos e sem brilho	5
		Fechados	0
Umbigo	Examina-se a área do umbigo e ao redor dele, verificando-se o seu fechamento e sua cor. Quando a cor for diferente da corda pele, registra-se como de má qualidade.	Fechado e limpo	12
		Não completamente fechado, coloração normal	6
		Não fechado e coloração normal	0
Membrana remanescente	Na área do umbigo, avalia-se o tamanho de uma possível membrana remanescente. O tamanho será classificado como: muito grande, grande ou pequeno.	Sem membrana	12
		Pequena	6
		Grande	0
Abdome	Examina-se o abdome do pintinho visualmente. Quando estiver grande (balófo) é classificado como ruim.	Normal	12
		Médio	6
		Distendido	0
Pernas	O pintinho é colocado em pé para determinar se permanece firme nessa posição. A conformação dos dedos e articulação do joelho são examinadas.	Pernas/dedos e articulações normais	10
		Uma perna/dedos e articulações afetadas	5
		Duas pernas/dedos e articulações afetadas	0
Canelas	Observa-se o brilho e a cor da canela. A normal deve ser avermelhada e brilhante.	Brilhante, avermelhada	16
		Brilhante, pálida	8
		Opaca, pálida	0

Adaptado de Tona et al. (2003).

Ao término da avaliação da qualidade, os animais foram pesados individualmente e após isso, foram selecionados dois animais ao acaso por repetição, os quais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical, para coleta e pesagem do saco vitelínico, moela, proventrículo e intestino com o pâncreas utilizando balança analítica com capacidade: 220g e leitura mínima: 0,0001g.

3.2.4 Análise estatística

Avaliou-se a interação entre os tratamentos e a classe do ovo, utilizando o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \rho_k + \epsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é valor da variável dependente na técnica i , no dia j , na classe de ovo k , μ é uma constante comum (média geral); α_i corresponde ao efeito da técnica i (1,2), β_j é o efeito do dia de incubação j (1,2,3), $(\alpha\beta)_{ij}$ é a interação entre a técnica e o tempo, ρ_k corresponde a classe de ovo k (1,2,3,4) e ϵ_{ijk} é resíduo.

Os dados obtidos inicialmente foram testados quanto a normalidade utilizando teste Shapiro-Wilk, e para homogeneidade utilizando o teste Hartley (F máximo). Após isso, os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o procedimento Proc GLM (*General linear models*) do programa estatístico SAS University Edition. Quando os tratamentos e as interações foram significativos a 5% de probabilidade no teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey também a 5% de probabilidade. Apenas para a avaliação da qualidade do pintinho e da classificação da mortalidade, foi realizada uma análise descritiva.

3.3 Etapa 2: Avaliação do desempenho, desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal e parâmetros de incubação de frangos submetidos a inoculação *in ovo* de lisina e metionina

Os melhores dias e técnica encontrados na etapa 1 foram utilizados para realização da inoculação *in ovo* de lisina e metionina em duas doses cada. Nesse sentido, essa etapa foi realizada para testar os efeitos da inoculação desses aminoácidos *in ovo*.

3.3.1 Delineamento experimental e tratamentos

Foram selecionados 720 ovos com peso médio 60,23g \pm 3,93 provenientes de matrizes da linhagem Cobb 500® com 40 semanas. Esses ovos foram incubados em três tempos, sendo 240 ovos por vez, totalizando 3 nascimentos, sempre nas mesmas condições.

Esses ovos foram divididos em 3 faixas de peso (repetições), com 240 ovos cada. As classes dos ovos foram: pesados (65,67g \pm 1,89), médios (61,43 g \pm 0,94) e leves (57,64g \pm 1,83)

Da mesma forma, a classe de ovo foi considerada como uma variável classificatória de efeito fixo. No total, foram 5 tratamentos, 9 repetições (devido os 3 nascimentos e as 3 classes) e 16 ovos por repetição, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos ovos nos tratamentos e nas classes de peso

Total 720 ovos						
	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Total ovos
N 1	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	80
	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	80
	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	80
						240
N 2	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	80
	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	80
	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	80
						240
N 3	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	16 ovos P	80
	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	16 ovos M	80
	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	16 ovos L	80
						240

*N - nascimento; P - Pesados; M - Médio; L - Leve

A inoculação das soluções nutrientes *in ovo* foi realizada com a técnica 2 (90º em relação à câmara de ar) e no 18º dia de incubação. Os tratamentos foram: T1: Grupo controle (ovo íntegro); T2: inoculação de metionina 20 mg/0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril; T3: inoculação de metionina 30 mg/0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril; T4:

inoculação de lisina 20 mg/0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril; T5: inoculação de lisina 30 mg/0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril.

Após o término da inoculação os ovos foram colocados em sacos de “filó” e transferidos para o nascedouro na mesma incubadora com o princípio que quando os animais nascerem, eles não venham misturar.

3.3.2 Avaliação dos parâmetros de incubação

Ao término dos nascimentos, no 21^o dia de incubação, totalizando 504 horas de incubação, foi avaliada a taxa de eclosão, classificação da mortalidade embrionária em precoce (1 a 17 dias), pós inoculação (18 a 21 dias), pós-bicagem da casca (ovos bicados e não nascidos) e ovos inférteis. Além disso, foram avaliadas a qualidade dos pintos pós-eclosão e o peso vivo dos animais pós-eclosão.

Para essas avaliações as análises foram semelhantes as descritas no experimento 1 (etapa 1) no item 3.2.3.

3.3.3 Fase à campo

Ao término das avaliações anteriores, os animais viáveis foram sexados pela técnica da diferenciação morfológica das penas da asa para serem alojados no aviário experimental na UNEPE de pequenos animais da UTFPR campus de Dois Vizinhos, durante 14 dias.

No campo, os pintos foram separados de acordo com os mesmos tratamentos da inoculação de diferentes níveis de aminoácidos, com uma variável a mais, ou seja, a condição sexual, totalizando 9 repetições. A quantidade de animais por unidade experimental variou entre 4 a 12 animais (devido as diferentes taxas de eclosão de cada tratamento).

3.3.4 Fase à campo: Instalações e manejo

O aviário experimental utilizado possui 24x10 metros (comprimento x largura) com boxes de 1 m² cada. Além disso, o aviário possui muretas de concreto com telas antipássaros e cortinas laterais, piso de terra batida que será coberto com maravalha, bebedouro do tipo *nipple* e comedouro tubular (Figura 4). O aquecimento inicial foi realizado com forno a lenha. Tanto o programa de luz como a faixa de temperatura e umidade foram de acordo com a idade das aves, seguindo recomendações da linhagem, conforme o manual de manejo de frangos de corte para frangos COBB 500®.



Figura 4. Estrutura da unidade experimental. Fonte: Groff, 2016.

Os animais receberam a mesma ração, na forma farelada, a base de farelo de soja e milho (tabela 2), conforme as exigências nutricionais de cada idade para frangos de corte, seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011). O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*.

Tabela 3. Composição centesimal e níveis nutricionais da ração experimental para frangos de 1-14 dias

Impedientes	Frango de corte 1-14 dias (kg)
Milho grão (7,5%)	52,44
Soja farelo (46%)	40,90
Óleo soja	4,00
Sal comum	0,20
Fosfato Bicálcico 18	0,80
Calcário calcítico	0,70
Suplemento vitamínico e mineral*	0,40
DL-metionina	0,30
L-Lisina 78	0,15
L-treonina 98	0,11
Total	100,00
Composição calculada	
Proteína Bruta	21,62%
Cálcio	1,12%
Fósforo total	0,69%
Fósforo disponível	0,45%
Sódio	0,21%
Energia metabolizável	3003,19 kcal/KP
Lisina	1,29%
Lisina digestível	1,17%
Metionina	0,65%
Metionina digestível	0,64%
Treonina digestível	0,83%
Triptofano digestível	0,25%
Metionina + cisteína digestível	0,91%

*Níveis de garantia do suplemento vitamínico e mineral por KP do produto: Ácido Fólico (mín) 7,5 mg, Ácido Pantotênico (mín) 100 mg, Bacitracina de Zinco 1.375 mg, Biotina (mín) 0,5 mg, Cálcio (mín) 200 P, Cálcio (máx) 300 P/kg; Cobre (mín) 165 mg, Colina (mín) 3.750 mg, Ferro (mín) 1.375 mg, Fósforo (mín) 58 P, Flúor (máx) 580 mg/kg; Iodo (mín) 33 mg Manganês (mín) 1.650 mg, Metionina (mín) 18,2 g, Niacina (mín) 300 mg Selênio (mín) 5 mg, Sódio (mín) 37,1 g, Vitamina A (mín) 97.500 UI, Vitamina B1 (mín) 10 mg, Vitamina B12 (mín) 125 mcg, Vitamina B2 (mín) 50 mg, Vitamina B6 (mín) 15 mg, Vitamina D3 (mín) 30.000 UI, Vitamina E (mín) 162,5 UI, Vitamina K3 (mín) 25 mg, Zinco (mín) 1.650 mg.

3.3.5 Avaliações dos parâmetros a campo

As aves foram avaliadas em relação ao desempenho zootécnico: ganho de peso (GP), consumo de ração total (CR) e conversão alimentar (CA) ao 7º e ao 14º dia vida. A mortalidade foi registrada diariamente para poder fazer a correção das taxas de desempenho citadas anteriormente.

Foi avaliado o peso absoluto dos órgãos ao final dos 14 dias de vida. Para isso duas aves por unidade experimental foram selecionadas e eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical (CONCEA, 2013). Foi

realizada a coleta e pesagem do proventrículo, moela, intestinos e pâncreas conforme descrição de Longo (2004) em balança com capacidade: 220g e leitura mínima: 0,0001g.

Ao 14º dia de idade, uma ave das duas eutanasiadas para pesagem dos órgãos foi selecionada para coleta de um fragmento de 2 cm do intestino delgado, na porção do jejuno, para realização de análises morfométricas. Para isso, adotou-se como padrão coletar o fragmento do jejuno, 4cm antes do divertículo de Meckel. Cada fragmento foi aberto longitudinalmente, lavados com solução salina e fixados em solução de formalina tamponada (10%). Após o período de fixação (16 horas) as amostras foram submetidas a desidratação, através da imersão em diversas concentrações crescentes de álcoois e diafanizados em xilol. A próxima etapa foi a inclusão do tecido na parafina.. Na microtomia foi adotado cortes de sete µm sempre em duplicata. Ao término os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Para as análises morfométricas foi utilizado o programa AxioVision SE64 Rel. 4.9.1, na qual adotou-se como padrão a leitura de 30 vilos e 30 criptas por tecido. As leituras realizadas foram: altura e largura das vilosidades, profundidade de cripta, diâmetro de cripta e a relação de altura de vilo:profundidade de cripta. Todas essas etapas seguiram os princípios de Caputo; Gitirana; Manso (2010).

3.3.6 Análise estatística

Com exceção da mortalidade embrionária e da avaliação da qualidade dos pintinhos, em que foi realizado análise descritiva, as demais avaliações da fase de incubação, seguiram o modelo estatístico a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \rho_k + \epsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é valor da variável dependente do tratamento i no nascimento j , na classe de ovo k , μ é uma constante comum (média geral); α_i corresponde ao efeito do tratamento i (1,2,3,4,5), β_j é o efeito do nascimento j (1,2,3), ρ_k corresponde a classe de ovo k (1,2,3) e ϵ_{ijk} é o resíduo.

Para a fase de avaliação a campo foi realizado em esquema fatorial 5x2 (5 soluções e dois sexos) conforme o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \eta_k + \rho_l + \epsilon_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} é valor da variável dependente do tratamento i na condição sexual j , no nascimento k e na classe de ovo l , μ é uma constante comum (média Peral); α_i corresponde ao efeito do tratamento i (1,2,3,4,5), β_j é o efeito da condição sexual j (1,2), $(\alpha\beta)_{ij}$ é a interação entre tratamento e condição sexual, η_k é o efeito do nascimento k (1,2,3), ρ_k corresponde a classe de ovo k (1,2,3,4) e ϵ_{ijkl} é o resíduo.

Os dados obtidos inicialmente foram testados quanto a normalidade utilizando teste Shapiro-Wilk, e para homogeneidade utilizando o teste Hartley (F máximo). Após isso, os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o procedimento Proc GLM (*General linear models*) do programa estatístico SAS University Edition. Quando os tratamentos e as interações foram significativos a 5% de probabilidade no teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1: avaliação de técnicas e períodos distintos para realização da nutrição *in ovo*

Não foi observado interação ($P > 0,05$) entre as técnicas e os períodos de inoculação. No entanto, independentemente do período de inoculação, as aves que tiveram a glicose 50% inoculada a um ângulo de 90° apresentaram maior porcentagem de eclosão. Enquanto isso, para o dia de incubação, não houve diferença estatística significativa para nenhuma das variáveis dependentes. Na avaliação das classes dos ovos, tanto para o peso do pinto ao nascimento como para o peso da moela, houve diferença entre as classes (tabela 4).

Tabela 4. Peso vivo ao nascimento, taxa de eclosão e peso absoluto dos órgãos do trato gastrointestinal de pintos de corte com um dia que foram submetidos à inoculação *in ovo* com duas técnicas e 3 dias distintas de incubação

Avaliações	Técnica		Dia			CV (%)	Valor p			Classe do ovo
	Técnic a 1	Técnic a 2	16º	17º	18º		Técnica	Dia	Técnica x Dia	
PV ¹ com 1 dia (g)	44,26	43,82	44,24	44,22	43,66	6,27	0,3192	0,4821	0,8111	<.0001*
Eclosão (%)	45,83 ^b	67,2 ^a	56,25	48,75	64,57	22,27	0,0014*	0,0938	0,6149	0,1736
Moela (g)	2,05	2,18	2,09	2,21	2,06	8,15	0,0558	0,0899	0,3522	0,0499*
Proventrículo (g)	0,37	0,39	0,38	0,37	0,39	11,95	0,5041	0,6681	0,1314	0,0833
Intestino + pâncreas (g)	2,06	2,17	2,10	2,32	2,09	10,63	0,21	0,7934	0,2702	0,1723
Saco Vitelínico (g)	5,51	4,91	5,33	5,38	4,92	18,46	0,1354	0,5605	0,5107	0,2082

*diferença significativa $P < 0,05$. Letras distintas e minúsculas na mesma linha diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹Peso vivo.

Na análise de variância para a classe dos ovos verificou-se que o tamanho do ovo tem influência ($P < 0,05$) no peso ao nascimento e no peso da moela. Dessa forma, tanto para o peso do pinto ao nascimento como para a moela, houve diferença entre as classes. Assim, pintos provenientes de ovos pesados nasceram maiores que pintos oriundos de ovos leves e superleves. Enquanto isso, os ovos médios geraram pintos menores que os provenientes dos ovos pesados e pintos maiores que ovos leves e superleves. Para a moela, somente diferiu os ovos pesados dos ovos superleves, sendo que ovos pesados tiveram as maiores médias (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação do peso vivo ao nascimento e peso absoluto da moela de pintos de corte com 1 dia de vida provenientes de 4 tamanhos distintos de ovos

Classe do ovo	PV¹ ao nascimento (g)	Moela (g)
Pesados	47,61 ^a	2,26 ^a
Médios	45,07 ^b	2,06 ^{ab}
Leves	42,57 ^c	2,11 ^{ab}
Superleves	40,89 ^c	2,03 ^b

Letras distintas e minúsculas, na mesma coluna, diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.¹PV- Peso vivo.

Como relatado por Klasing (1998) e Sklan et al. (2003) a partir do 15º dia de desenvolvimento embrionário o embrião já possui capacidade de ingerir o líquido amniótico e também já é dotado de enzimas digestivas. Dessa maneira, ao inocular glicose *in ovo* ao 16º, 17º e 18º dia de incubação, o resultado para o peso do pinto ao nascimento não demonstrou diferença. Provavelmente isso aconteceu, pois, os embriões já são de certa forma, aptos para ingerir e absorver nutrientes em qualquer um desses dias. Por esse motivo, em qualquer um desses dias testados os resultados para o peso ao nascimento serão semelhantes.

A técnica tem maior influência para a eclodibilidade, já que ela pode ser invasiva ou não aos embriões. No mais, o local alvo de aplicação dos nutrientes era o mesmo em ambas técnicas (cavidade alantoide) e por esse motivo é que provavelmente não houve diferenças significativas para o peso ao nascimento.

A técnica 2 obteve-se as maiores médias (67,2%) em relação a técnica 1 (45,83%). Nesse sentido, o ângulo de 45º pode ser invasivo ao embrião.

Concomitante a isso, a quantidade de embriões que morreram após a técnica 1 foi bem maior do que em relação a técnica 2 (figura 5). No embriodiagnóstico alguns desses embriões foram perfurados pela agulha de inoculação. Enquanto que não ocorreu para a técnica 2.

Leitão et al. (2010) realizaram inoculação *in ovo* com soluções de maltose, sacarose e glicose utilizando técnicas que transpassava ou não a câmara de ar. Eles encontraram piora da taxa de eclosão quando a inoculação foi realizada na cavidade alantoide transpassando a agulha pela câmara. Esses autores relatam que quando é inoculado por meio da câmara de ar, a agulha

pode atingir corioalantoide, prejudicando as trocas de oxigênio/gás carbônico levando os animais a morte.

Para as demais avaliações dos parâmetros de mortalidade embrionária não houveram diferenças numéricas entre os tratamentos como aconteceu com a mortalidade pós inoculação (Figura 5).

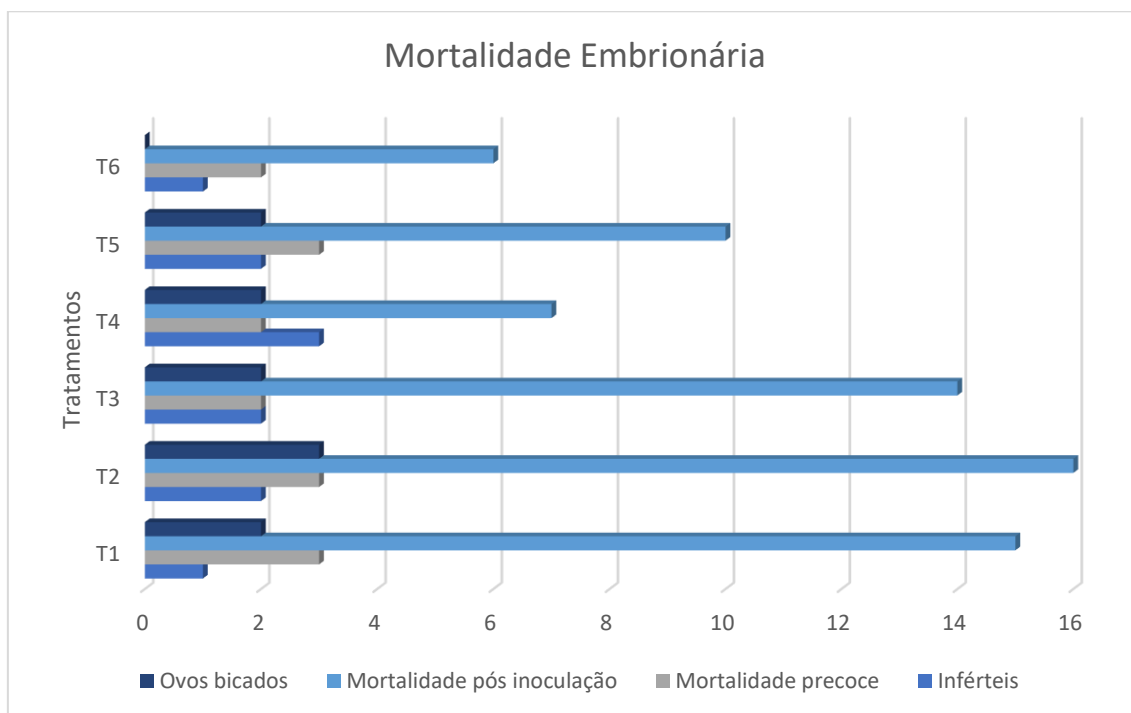


Figura 5. Classificação da mortalidade embrionária de frangos de corte submetidos a inoculação *in ovo* em diferentes dias de incubação e técnicas.

*T1: Técnica 45° ao 16º dia; T2: Técnica 45° ao 17º dia; T3: Técnica 45° ao 18º dia; T4: Técnica 90° ao 16º dia; T5: Técnica 90° ao 17º dia e T6: Técnica 90° ao 18º dia.

Leitão et al. (2008) e Campos et al. (2011) ao inocular soluções de glicose (0,6ml) e glicose e sacarose (0,5ml) *in ovo*, respectivamente, encontraram piora da taxa de eclosão. Esses autores atribuíram esse fato devido a alteração da umidade do ovo, ou seja, ao volume do líquido injetado que pode comprometer a integridade do embrião e as trocas gasosas com o meio. Em adição, a concentração dos nutrientes inoculados podem afetar os embriões também.

Da mesma forma, Lotfi; Aghdam Shahryar; Kaya (2013) ao injetar grelina (hormônio da "fome") *in ovo* encontraram piora da taxa de eclosão para

todos os tratamentos submetidos a essa técnica em relação aos ovos íntegros. Esses autores concluem, que determinadas soluções ao serem injetadas *in ovo*, podem alterar o equilíbrio osmótico, levando os embriões a morte.

Em contrapartida, Santos et al. (2010) ao injetarem soluções nutritivas (maltose, vitaminas, zinco e glutamina) não encontraram diferenças para a taxa de eclosão nos tratamentos que receberam a solução. Esses autores realizaram no 18º dia de incubação e a quantidade de líquido injetado foi de 0,5 ml. Por esse motivo, é necessário estudar quais os melhores nutrientes e respectivas doses, que não prejudiquem os embriões e, conseqüentemente, a taxa de eclosão.

Com relação aos dias de incubação, não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre esses períodos para a taxa de eclosão. Assim, do 16º até o 18º dia de incubação a inoculação *in ovo* não prejudica a eclodibilidade, podendo ser realizada em qualquer um desses dias.

Como já citado, o embrião a partir do 15º possui o trato gastrointestinal apto para ingerir e absorver nutrientes, sendo assim, após o 16º dia até o 18º a eficiência da nutrição *in ovo* é semelhante para todas variáveis analisadas nessa etapa.

Lotfi; Aghdam Shahryar; Kaya (2013), testando o dia 5 e o dia 10 de incubação para inoculação de grelina *in ovo* no albúmen encontraram menor taxa de eclosão com 5 dias do que com 10 dias. Por esse motivo é importante testar o dia para saber se há diferenças da resposta dos embriões submetidos a inoculação *in ovo*.

Para o peso absoluto dos órgãos do trato gastrointestinal (TGI) dos pintinhos ao nascimento, não houve diferença estatística ($P>0,05$) em nenhum dos tratamentos estudados. Possivelmente isso acontece, devido ao fato dos tratamentos serem sempre com a mesma solução nutriente e no mesmo local (alantoide). Assim, o dia de incubação e a técnica testada não interferiam na absorção dos nutrientes inoculados. Por esse motivo, não foi encontrada diferença no desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal.

De maneira semelhante, Salmanzadeh et al. (2016) ao injetarem níveis de glutamina *in ovo* não encontraram diferenças ($P>0,05$) para o peso dos órgãos ao 42º dia de vida. Como esses autores relatam, os nutrientes inoculados, as doses, o dia de incubação escolhido e o local alvo de aplicação não foram suficientes para aumentar o peso dos órgãos.

Para a classe dos ovos, os dados obtidos corroboram com Nascimento et al. (2015) e Riccardi et al. (2009), a incubação de ovos pesados, irão gerar pintos maiores do que ovos leves.

Uma possível explicação para isso é que em cada tamanho de ovo (classes), há uma determinada quantidade e composição dos nutrientes ali presentes (MAIORKA, 2003; TEIXEIRA et al., 2012). Ovos maiores por apresentarem maiores quantidade, obtêm pintos maiores e assim por diante.

Enquanto isso o peso médio da moela foi influenciado pelo tamanho do ovo. Dessa forma, como os pintos oriundos de ovos pesados foram maiores que os ovos leves, conseqüentemente, o peso de alguns órgãos também se comportam semelhantemente. Por esse motivo, a moela apresentou-se maior nos animais provenientes de ovos pesados do que superleves. Nesse caso, os ovos leves e médios não diferem das demais classes. Luquetti et al. (2004) encontraram maior peso do coração e dos pulmões em pintos com um dia oriundos de ovos pesados do que de ovos leves. Esses autores também atribuem esse fato ao tamanho ovo.

De acordo com as variáveis para determinar a qualidade dos pintos pós-eclosão, nenhum tratamento obteve a pontuação máxima (100) mas também não tiveram pontuações consideradas ruins (abaixo de 80) (Tabela 6).

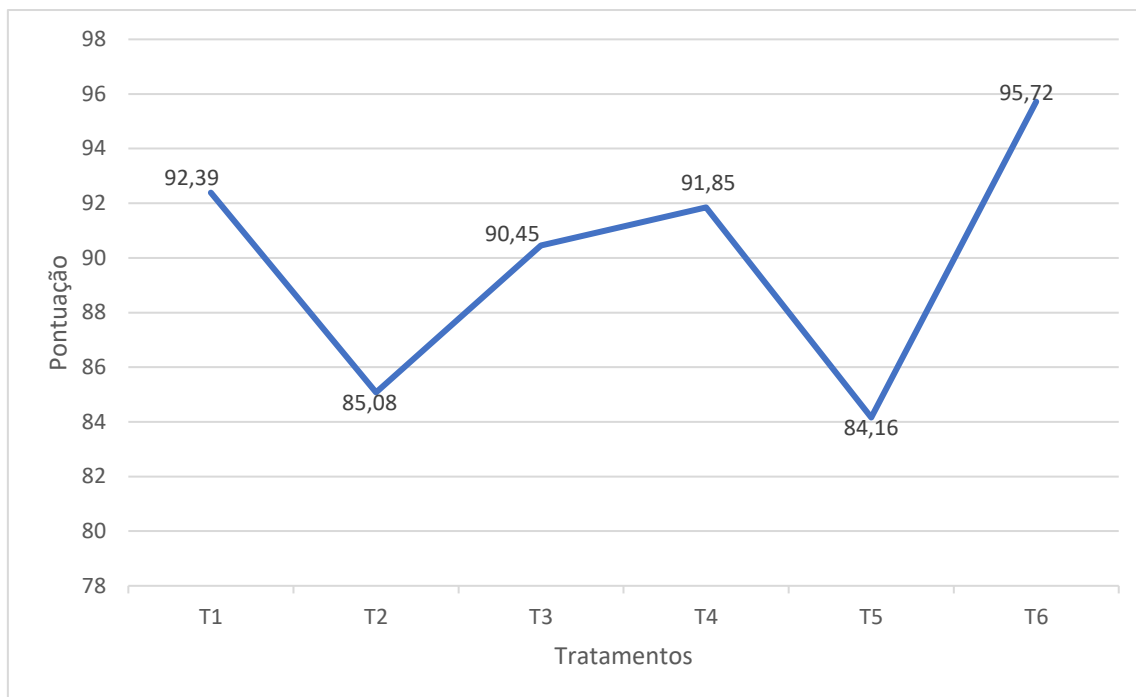


Figura 6. Avaliação da qualidade dos pintinhos ao nascimento que foram submetidos a distintas técnicas e dias de incubação para realização da nutrição *in ovo*.

*T1: Técnica 45° ao 16º dia; T2: Técnica 45° ao 17º dia; T3: Técnica 45° ao 18º dia; T4: Técnica 90° ao 16º dia; T5: Técnica 90° ao 17º dia e T6: Técnica 90° ao 18º dia.

Valores mais altos indicam que os animais apresentam melhores condições de desenvolverem e de sobreviverem. Isso acontece, pois atendem aos critérios propostos por Tona et al. (2003) em quantidades superiores. Esses mesmos autores relataram que a qualidade dos pintos de um dia tem relação com a incubação. Assim, esse é um bom parâmetro para avaliar a qualidade da incubação, bem como o resultado da administração *in ovo* de nutrientes que podem ou não ser nocivos aos embriões.

4.2 Etapa 2: Avaliação do desempenho, desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal e parâmetros de incubação de frangos submetidos a inoculação *in ovo* de lisina e metionina

De acordo com os dados obtidos para a taxa de eclosão observou-se que independentemente da dose, a inoculação da solução contendo metionina proporcionou taxa semelhante ao controle, não diferindo da dose de 20mg de lisina. No entanto, ao inocular 30mP de lisina, observou-se a menor taxa. Para o

peso ao nascimento não houve diferença estatística entre as doses inoculadas e nem para a condição sexual (Tabela 6).

Tabela 6. Taxa de eclosão e peso ao nascimento de frangos de corte submetidos à inoculação de aminoácidos *in ovo*.

Tratamentos	Parâmetros de incubação	
	Taxa de eclosão (%)	Peso ao nascimento (g)
Dose		
Controle	72,9a	44,57
Metionina 20mg	61,11ab	44,36
Metionina 30mg	71,52ab	44,4
Lisina 20mg	52,08b	44,18
Lisina 30mg	37,50c	44,96
Sexo		
Macho	na ¹	44,48
Fêmea	na	44,5
CV (%)	23,97	6,87
Valor p		
Dose	<.0001*	0,2505
Sexo	na	0,9259
Dose x Sexo	na	0,1299

*diferença significativa $P < 0,05$. Letras distintas e minúsculas na mesma coluna diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.¹ não se aplica.

A taxa de eclosão é um importante parâmetro utilizado nas empresas do setor avícola para mensurar a qualidade da incubação. Ela representa a quantidade de pintos viáveis nascidos em relação aos ovos incubados.

Na quantificação da mortalidade embrionária (Figura 7) foi observado que a grande parte da mortalidade para as doses de lisina foi após a inoculação. Isso indica que o motivo provável da morte foi decorrente ao tratamento.

Segundo Pedroso et al. (2006), quando ocorre uma baixa eclodibilidade na inoculação de substâncias nutrientes *in ovo* pode ser devido a uma alteração do equilíbrio osmótico do ovo, ocasionando a morte do embrião.

Dessa forma, essa concentração de lisina pode ter gerado um desequilíbrio entre os demais aminoácidos o que pode comprometer o animal, já que ela ficará acima dos valores normais na corrente sanguínea. Até por que, quando em excesso, exigem gasto a mais de energia, que é direcionada para a realização da retirada do nitrogênio na forma de ácido úrico (desaminação) (ALETOR;

HAMID; NIESS, 2000). Enquanto isso, as demais doses testadas não foram suficientes para acontecer tantas prejuízos na taxa de eclosão como a lisina 30 mg, já que a metionina atua em outras funções no organismo.

Diferentemente da lisina, a metionina é um aminoácido que além de participar da síntese de proteínas, tem funções no sistema imune da ave e na exigência de manutenção (OLIVEIRA NETO E OLIVEIRA, 2009). Por esse motivo, como esse aminoácido tem outras funções no organismo, além da síntese proteica, as doses administradas não foram prejudiciais aos embriões por serem direcionadas para outras funções do corpo. Enquanto isso, a lisina que não possui outras funcionalidades como a metionina, acaba sendo prejudicial ao animal quando em excesso na circulação, já que irá demandar mais energia para ser eliminada por não participar de outros processos.

Além disso, a metionina é direcionada para a produção das proteínas das penas das aves (PACK et al., 2002). Ela também pode converter-se em cistina metabolicamente, por isso, segundo Rostagno et al. (2005) no mínimo 55% dos aminoácidos sulfurados presentes na dieta devem ser de metionina. Sendo assim, comprovando que por mais rotas metabólicas, o excesso de metionina na circulação não causa tantos danos às aves como a lisina, que exclusivamente é utilizada para síntese de proteínas musculares.

Chen et al. (2009) em seu estudo verificaram que a diminuição da eclodibilidade em ovos inoculados com alanina, glutamina, sacarose e maltose, foi devido a alterações na osmolaridade.

As osmolaridades das soluções não podem passar de 650 mOsm, como proposto por Ferket et al. (2005), se não tornam-se inviáveis aos embriões. Infelizmente, essa análise não foi realizada no nosso experimento.

Desequilíbrios no controle osmótico faz com que ocorra alterações na membrana citoplasmática juntamente com os mecanismos de absorção e liberação de água levando as células a degeneração hídrica, ou seja, edema celular (MAIR e HERNANDEZ, 2006). Em casos graves esse mecanismo leva as células a morte.

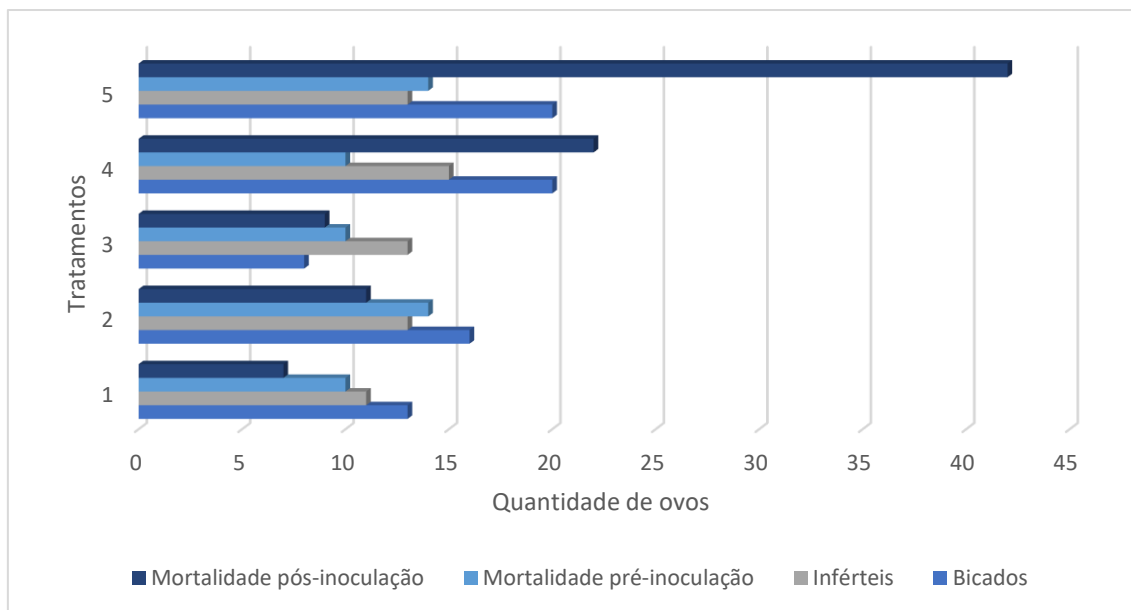


Figura 7. Classificação da mortalidade embrionária de frangos submetidos à inoculação *in ovo* de metionina e lisina.

*T1: grupo controle; T2: metionina 20mg ; T3: metionina 30mg ; T4: lisina 20mg ; T5: lisina 30mg

Enquanto isso, a metionina em ambas as doses não diferiram do grupo controle ($P > 0,06$) e observou-se pouca mortalidade pós inoculação para as doses desse aminoácido. Na figura 7 é possível observar que o tratamento controle obteve a menor taxa de mortalidade pós-inoculação, entretanto, nas duas doses de metionina a mortalidade foi inferior as doses de lisina. A quantidade de ovos bicados utilizando a lisina foi numericamente maior que os demais tratamentos, podendo indicar que as doses utilizadas no experimento, desse aminoácido, trouxeram prejuízos aos embriões. Enquanto isso, os ovos inférteis e mortalidade pré-inoculação teve pouca diferença numérica entre os tratamentos (figura 7).

A inoculação *in ovo* com as doses testadas de lisina e metionina não prejudicaram o peso ao nascimento, quando comparado com o grupo controle ($P > 0,05$).

No estudo de Ohta, Kidd e Ishibashi (2001), eles encontraram uma maior taxa de eclosão e do peso vivo ao nascimento, quando inocularam soluções a base de aminoácidos *in ovo*. Contudo, diferentemente da nossa pesquisa, as soluções utilizadas por eles continham uma mistura com 18 aminoácidos.

Johri et al. (2004), analisando a inoculação de soluções contendo vários aminoácidos *in ovo*, também verificaram que a solução de aminoácidos utilizada, gerou maior peso inicial do pintinho. Dessa forma, a diversidade de aminoácidos ao invés de apenas um na solução a ser inoculada pode ter influenciado na obtenção desse resultado favorável.

Em contrapartida, Bhanja et al. (2012), inocularam aminoácidos *in ovo*, sendo 7 soluções (grupo controle, lisina (lys), metionina (met), treonina (thr), arginina (arg), glicina (gly) e isoleucina (ile)). Verificaram que os ovos injetados com treonina (thr) e metionina (met) obtiveram maior peso de pintainho e proporção de pintinho em relação ao ovo. Entretanto, diferentemente desse trabalho, eles injetaram a solução na gema no 14^o dia de incubação

Segundo Foye, Uni e Ferket (2006), a nutrição *in ovo* com aminoácidos pode ser útil ao animal durante a fase embrionária, para suportar o alto gasto energético da eclosão. Mesmo assim, é importante realizar avaliações de como esses nutrientes se comportam na taxa de eclosão e no peso inicial, para saber se esse procedimento é viável aos embriões.

Para a avaliação da qualidade do pintinho, os aminoácidos utilizados com suas respectivas doses, nesse estudo foram semelhantes ao grupo controle (figura 8). Nas doses de lisina houve decréscimo da pontuação em relação a metionina e aos ovos do grupo controle.

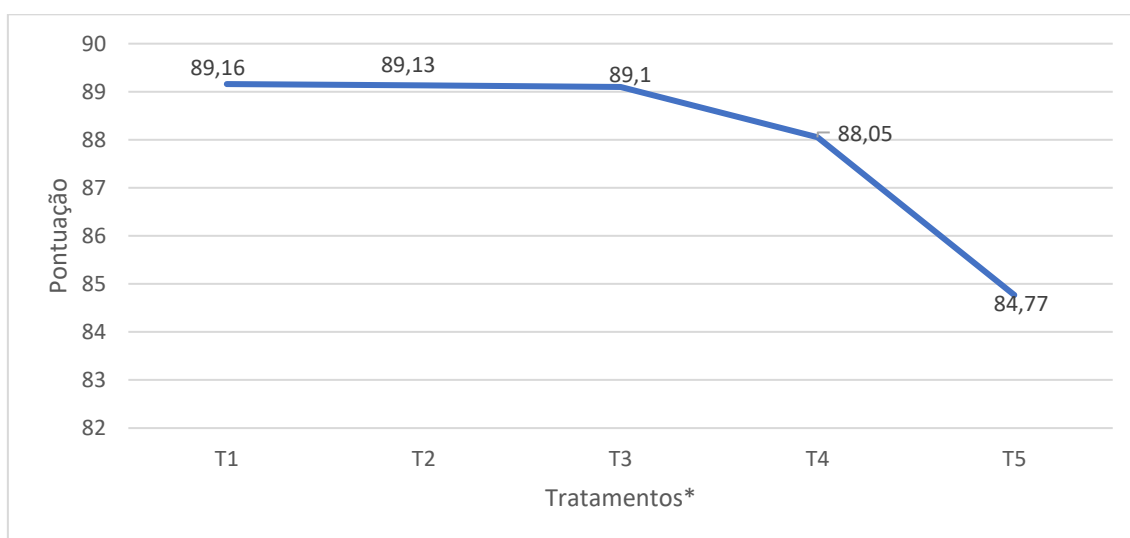


Figura 8. Avaliação da qualidade dos pintinhos ao nascimento que foram submetidos à inoculação *in ovo* de metionina e lisina.

*T1: Grupo controle; T2: metionina 20mg ; T3: metionina 30mg ; T4: lisina 20mg ; T5: lisina 30mg

Tona et al. (2003) relataram que a qualidade dos pintos de um dia tem relação com a qualidade da incubação. Nesse sentido, na figura acima é possível verificar que houve mínima diferença numérica na pontuação da qualidade dos animais entre os diferentes tratamentos. O tratamento com 30 mg de lisina, foi o que obteve a menor pontuação média (84,77) em relação ao grupo controle (89,16), metionina 20 mg (89,13), metionina 30 mg (89,10) e lisina 20 mg (88,05) que tiveram as médias superiores.

No tratamento lisina (30 mg), como já descrito nas outras avaliações, prejudicou os animais (aumento da mortalidade pós-inoculação, aumento dos ovos bicados e diminuição da eclodibilidade). Portanto, esse aminoácido nessa dose é inviável aos embriões devido a uma provável alteração na concentração osmótica do ovo (FERKET et al., 2005; PEDROSO et al., 2006) e isso prejudica o bom desenvolvimento embrionário levando os animais a qualidade inferior ou até a morte.

Segundo a análise de variância para o desempenho zootécnico não foi observada interação entre os fatores, dose e sexo, em nenhuma das variáveis dependentes. Entretanto avaliando os fatores isoladamente foi possível observar que para o consumo de ração, aos 14 dias, houve diferença ($P < 0,05$) para as diferentes doses testadas. No 7º e 14º dia o consumo diferiu para o fator sexo (Tabela 7). As demais variáveis de desempenho não mostraram diferença estatística, mesmo quando os fatores foram analisados sozinhos.

Tabela 7. Ganho de peso de peso, consumo de ração e conversão alimentar de frangos de corte com 7 e 14 dias de idade submetidos a inoculação de aminoácidos *in ovo*.

Tratamentos	7º dia			14º dia		
	GP(g)	CR(g)	CA(g/g)	GP(g)	CR(g)	CA(g/g)
Dose						
Controle	80,26	112,339	1,399	273,45	351,59 ^{ab}	1,285
Metionina 20mg	82,28	110,528	1,343	280,14	375,21 ^a	1,339
Metionina 30mg	82,13	109,856	1,337	280,87	351,78 ^{ab}	1,252
Lisina 20mg	77,38	108,410	1,401	271,67	362,19 ^{ab}	1,333
Lisina 30mg	75,15	104,779	1,394	256,03	334,91 ^b	1,308
Sexo						
Macho	80,77	112,389 ^a	1,39	275,08	363,18 ^a	1,32
Fêmea	72,12	105,986 ^b	1,35	269,78	347,09 ^b	1,29
CV (%)	11,32	13,82	9,21	10,01	11,39	10,27
Valor p						
Dose	0,056	0,629	0,118	0,0586	0,0272*	0,1986
Sexo	1,1384	0,0432*	0,167	0,3601	0,0418*	0,242
Dose x Sexo	0,8959	0,6708	0,2892	0,8291	0,5564	0,491

*diferença significativa $P < 0,05$. Letras distintas e minúsculas na mesma coluna diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. GP-Ganho de peso; CR-Consumo de ração; CA-Conversão alimentar.

Para o consumo de ração ao 14º dia, no teste de comparação de médias, somente houve diferença entre os tratamentos metionina 20 mg e lisina 30 mg, sendo que a lisina teve as menores médias. A queda no consumo de ração pode ser explicada pois esses animais apresentaram qualidade inferior aos demais tratamentos no nascimento, sendo até 5% inferior aos demais na avaliação proposta por Tona et al., (2003). Isso pode ter afetado esse parâmetro de desempenho.

Continuando na avaliação do consumo de ração, tanto no 7º como no 14º dia, verificou-se que os machos apresentaram maior consumo do que as fêmeas ($P < 0,05$). Esse resultado era encontrando devido que os machos possuem taxa de crescimento superior que as fêmeas.

No trabalho de Api et al., (2017), encontraram diferença no consumo de ração de acordo com a condição sexual a partir da 4ª semana de vida. Da mesma forma, Schmdit et al. (2005) encontraram diferença no consumo de ração entre

machos e fêmeas, sendo que os machos apresentaram maior consumo com 8,18%.

Diferentemente do nosso estudo, Ohta, Kidd e Ishibashi (2001), verificaram que a inoculação *in ovo* de soluções a base de diversos aminoácidos (essenciais e não essenciais), totalizando 18, de uma só vez, melhora o ganho de peso dos animais na fase inicial.

No trabalho realizado por Bhanja e Mandal (2005), esses autores também inocularam soluções a base de mais de um aminoácidos (Lisina+Arginina; Lisina+Metionina+Cisteína; Treonina+Glicina+Serina; Isoleucina+Leucina+Valina e Glicina+Prolina). Eles encontraram que quando diferentes combinações de aminoácidos são administradas, ocorre melhora no crescimento inicial para melhor, principalmente nos grupos Isoleucina+Leucina+Valina e glicina+Prolina.

Em contrapartida, Lopes et al. (2006), inocularam soluções *in ovo* a base de apenas um aminoácido. Esses autores não encontraram melhoras significativas ($P>0,05$) nos parâmetros de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar dos animais.

Pedroso et al. (2006) e Vieira et al. (2006) também não encontraram melhoras nos parâmetros de desempenho inicial quando inocularam somente um aminoácido *in ovo*, sendo eles glutamina (0, 10, 20 ou 30 mg) e glutamina ou lisina (1g/100 ml), respectivamente.

Dessa forma, na presente pesquisa, foi administrado somente um aminoácido isolado em cada tratamento (ou a lisina, ou a metionina em duas doses distintas). Sendo assim, conforme os dados da literatura, é bem possível que a inoculação *in ovo* de uma mistura com diversos aminoácidos seja benéfica do que a inoculação de um aminoácido isolado, como verificado em outros estudos.

Uma possível hipótese para essa afirmação, é que quando se administra somente um aminoácido ele fica disponível em excesso e isso pode acarretar um desequilíbrio nos níveis dos demais aminoácidos. Dessa forma, esse aminoácido segundo Aletor; Hamid; Niess (2000) fica acima dos limites normais na circulação sanguínea e para serem metabolizados, exigem um gasto de energia extra. Dessa forma, as aves não conseguem otimizar seu desempenho devido a isso.

Para o peso absoluto dos órgãos do trato gastrointestinal em nenhum deles houve interação entre os fatores e mesmo avaliando isoladamente não houve diferença estatística entre si ($P < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Peso absoluto do intestino com o pâncreas, proventrículo e moela de frangos de corte, com 14 dias, submetidos a inoculação de aminoácidos *in ovo*.

Biometria dos órgãos do TGI			
Tratamentos	Intestino + pâncreas (g)	Proventrículo (g)	Moela (g)
Dose			
Controle	26,71	2,23	18,217
Metionina 20mg	25,94	2,15	17,286
Metionina 30mg	26,49	2,06	17,421
Lisina 20mg	25,06	2,02	17,583
Lisina 30mg	24,72	2,01	16,157
Sexo			
Macho	25,76	2,09	17,34
Fêmea	25,81	2,10	17,32
CV (%)	12,97	17,01	13,78
Valor p			
Dose	0,2847	0,3304	0,0930
Sexo	0,9441	0,8825	0,9553
Dose x Sexo	0,3857	0,9548	0,0761

Dessa forma, as administrações de lisina e metionina (20 e 30 mg) *in ovo*, não estimularam o desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal avaliados.

Semelhante ao nosso estudo, Damasceno et al. (2017) não encontraram diferenças para o peso absoluto dos órgãos do trato gastrointestinal. Esses autores inocularam *in ovo* proteína isolada de soja na cavidade alantoide. Pedroso et al., (2006) e Leitão et al., (2014) também não encontraram aumento de peso dos órgãos do trato gastrointestinal de frangos com 10 dias que foram submetidos a inoculação de carboidratos *in ovo*.

Bhanja et al. (2012), inocularam aminoácidos *in ovo*, sendo 7 tratamentos (grupo controle, lisina (lys), metionina (met), treonina (thr), arginina (arg), glicina (gly) e isoleuciona (ile). Para o peso dos órgãos, o fígado, moela e proventrículo, intestino delgado, intestino grosso e saco vitelínico não observaram diferença significativas entre os tratamentos.

Possivelmente a nutrição *in ovo* com esses nutrientes possui reduzida capacidade em aumentar o peso absoluto, entretanto, avaliações microscópicas podem refletir melhor o *status* do desenvolvimento desses órgãos. Comprovando isso, Salmanzadeh et al. (2016) não encontraram diferença no peso absoluto do intestino delgado, contudo, ao analisar a morfometria desse órgão encontraram diferenças de acordo com os tratamentos realizados.

Para morfometria do jejuno não houve interação entre os fatores (dose e sexo). Somente houve diferença para o fator dose na relação altura vilo:cripta quando foi avaliado os fatores isoladamente (Tabela 9).

Tabela 9. Altura de vilo, largura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do jejuno de frangos de corte, com 14 dias, que foram submetidos a inoculação de aminoácidos *in ovo*.

Tratamentos	Altura de vilo (µm)	Largura de vilo (µm)	Profundidade de cripta (µm)	Relação vilo:cripta
Dose				
Controle	462,25	103,33	116,61	4,03 ^b
Metionina 20mg	499,26	111,30	111,43	4,69 ^{ab}
Metionina 30mg	514,01	114,93	126,36	4,34 ^{ab}
Lisina 20mg	513,22	110,90	114,55	4,59 ^{ab}
Lisina 30mg	524,54	106,97	106,57	4,89 ^a
Sexo				
Macho	505,34	111,63	115,91	4,59
Fêmea	499,97	107,24	114,30	4,43
CV (%)	23,67	14,60	22,34	17,68
Valor p				
Dose	0,5408	0,1816	0,2394	0,0077*
Sexo	0,8279	0,1697	0,7671	0,3068
Dose x Sexo	0,5817	0,1362	0,7952	0,9543

*diferença significativa $P < 0,05$. Letras distintas e minúsculas na mesma coluna diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com a dose lisina 30 mg diferiu ($P < 0,05$) com o grupo controle para a relação vilosidade:cripta, sendo que a dose de lisina obteve as maiores médias. O resultado das análises morfométricas nas doses restantes administradas não diferiram em relação as demais.

A relação vilosidade:cripta pode indicar uma possível falta de integridade das vilosidades (lesão). Também pode ser um indicador da capacidade digestiva do intestino delgado (SILVA et al., 2011).

Segundo Montagne, Pluske e Hampson (2003) quando aumenta-se a relação vilosidade:cripta, aumenta-se a taxa de digestão e absorção dos nutrientes. Contudo, mesmo com o aumento da relação vilosidade:cripta no tratamento lisina 30 mg em relação ao tratamento controle, isso não foi suficiente para melhorar o desempenho dos animais, levando em consideração os dados de desempenho apresentados anteriormente.

Esses resultados corroboram com os resultados de desempenho, que demonstrou pouca diferença entre os tratamentos, já que melhorando a superfície absorptiva, conseqüentemente melhora-se a produtividade.

Semelhante ao resultado do presente trabalho, Vieira et al. (2006) ao inocular lisina 1% e glutamina 1%, não encontraram melhora nos parâmetros morfométricos da mucosa intestinal de frangos de corte em fase inicial. Segundo Williams (2004), a passagem de moléculas do para o embrião (via circulação sanguínea) é restrita. Assim, é necessário saber a relação ideal do aminoácido inoculado *in ovo* para que esse possa assumir benefícios aos animais.

Já no estudo de Salmanzadeh et al. (2016), ao inocular glutamina *in ovo* (aminoácido não essencial) verificaram que nas doses de 40 e 50 mg/0,5ml foi possível obter melhor desenvolvimento do intestino delgado, na porção do jejuno quando comparado com doses inferiores (10, 20 e 30 mg/0,5ml) e com o grupo controle. Isso foi observado através da avaliação da altura e largura das vilosidades e profundidade de cripta. No entanto, a glutamina é o principal combustível metabólico para o desenvolvimento do trato gastrointestinal já que estimula a proliferação de células intestinais, levando a um aumento da absorção das proteínas, principalmente (ANDREW e PRIFFITHS, 2002).

Mohammadrezaei, Nazem e Mohammadrezaei (2015) avaliaram a injeção *in ovo* do aminoácido metionina, em diferentes níveis (20, 30, 40 e 50 mg), sob o desenvolvimento da mucosa do intestino delgado (jejuno) em frangos

de corte. Eles verificaram que a inoculação do aminoácido metionina aumentou a altura e a largura das vilosidades nas doses até 40 mg. Dessa forma, esse aumento da superfície das vilosidades intestinais, causado pela inoculação da metionina, pode melhorar a absorção dos nutrientes. Entretanto, esses autores inocularam as soluções *in ovo* com 4 dias de incubação na cavidade alantoide e realizaram a coleta do jejuno quando os embriões estavam com 18 dias de incubação.

Dessa forma, os procedimentos realizados nesse trabalho foram diferentes do estudo de Mohammadrezaei, Nazem e Mohammadrezaei (2015), por esse motivo, é que possivelmente não foram encontradas diferenças. Além disso, algumas pesquisas relatam apenas melhoria do desenvolvimento das vilosidades nos primeiros dias de vida. Logo após a primeira semana, esse fato não se torna mais evidente (VIEIRA et al., 2006; LEITÃO et al., 2014).

O efeito da inoculação *in ovo* tem seu ápice na morfometria intestinal até 48 horas pós inoculação (TAKO ; FERKET, UNI, 2004). Logo, após 7 dias a taxa de crescimento do intestino é inferior aos dias anteriores, podendo diluir os efeitos da nutrição *in ovo* no desenvolvimento intestinal (LEITÃO et al., 2014). Diante disso, como só foram realizadas essas análises no 14º dia, poucas diferenças foram encontradas para a morfometria intestinal.

Para o peso ao nascimento de pintos oriundos de três tamanhos de ovos verificou-se diferença entre as classes ($P < 0,05$), sendo que os ovos pesados, geraram pintos com peso superior aos ovos médios e leves. Ovos médios também geraram pintos maiores do que pintos provenientes dos ovos leves (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação do peso vivo ao nascimento de pintos de corte provenientes de 3 tamanhos distintos de ovos.

Classe do ovo	Peso Vivo ao nascimento (g)
Pesados	47,71 ^a
Médios	44,22 ^b
Leves	41,56 ^c

Letras distintas e minúsculas, na mesma coluna, diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.¹

Como já relatado nesse trabalho, segundo a literatura, na incubação de ovos pesados irão gerar pintos maiores do que ovos menores (RICCARDI et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2015). Dessa forma, nosso estudo corrobora com a literatura, já que os ovos maiores geraram pintos maiores.

Essa diferença de peso vivo acontece devido as variações na quantidade e composição dos nutrientes em cada classe de ovos (MAIORKA, 2003; TEIXEIRA et al., 2012). Os ovos maiores possuem maior proporção de água, gordura e proteínas (BURNHAM et al., 2001; CARDOZO et al., 2002). Assim, o tamanho do pinto de um dia será dependente do tamanho do ovo incubado.

5. CONCLUSÃO

A inoculação *in ovo* pode ser realizada no 16º, 17º ou no 18º dia de desenvolvimento embrionário, já que não há diferenças das variáveis de incubação entre esses dias.

Enquanto isso, a melhor técnica para a realização da inoculação *in ovo* no alantoide é sem transpassar a agulha pela câmara de ar e com ângulo de 90º em relação câmara.

A inoculação *in ovo* de metionina (20 e 30 mg) teve resultados semelhantes ao grupo controle para desempenho zootécnico inicial, aos parâmetros de incubação de e desenvolvimento do trato digestório de frangos de corte. Entretanto, as doses de lisina utilizadas foram inviáveis aos embriões, por piorar grande parte dos parâmetros analisados, principalmente na concentração mais alta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALETOR, V.A.; HAMID, I.I.; NIESS, E. Low-protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: Effect on performance, carcass characteristics, whole body composition and efficiencies nutrient utilization. **Journal Science Food Agriculture**, New York, v.80, p.547-554, abr. 2000.

AL-MURRANI, W. K. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent Growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, London, v.23, p.171-174, abr. 1982.

ANDREWS, F.J. e ANDPRIFITHS, R.D. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. **British Journal of Nutrition.**, Cambridge, v.1, p.3-8, 2002.

API, I.; TAKAHASHI, S.E.; MENDES, A.S.; PAIXÃO, S.J.; REFATI, R.; RESTELATTO, R. Efeito da sexagem e linhagens sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.18, 1-10, e-32691, abr. 2017.

AVISITE. **Produção animal avicultura**. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/flip3d.com.br/web/pub/avisite/index2/>>. Acesso em: 26 de setembro de 2017.

BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B. Effect of In ovo Injection of Critical Amino Acids on Pre- and Post-hatch growth, Immunocompetence and Development of Digestive Organs in Broiler Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.**, Izatnagar , v. 18, n. 4, p. 524-531, nov. 2005.

BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B.; AGARWAL, S.K; MAJUMDAR, S. Modulation of post hatch-growth and immunocompetence through in ovo injection of limiting amino acids in broiler chickens. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v.82, n. 9, p.993–998, set., 2012.

BURNHAM, M. R.; PEEBLES, E. D.; GARDNER, C. W.; BRAKE, J.; BRUZUAL, J. J.; GERARD, P. D. Effects of incubator humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1444-1450, out. 2001.

CAMPOS, A.M.A.; GOMES, P.C.; ROSTAGNO, H.S. nutrição in ovo de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 7, n. 4, p.1304-1313, jun/ago, 2010.

CAMPOS, A.M.A., ROSTAGNO, H.S., GOMES, P.C.; SILVA E.A.; ALBINO, L.F.T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, n.8, p.1712-1717, nov., 2011.

CAPUTO, L. F.G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P.P.A. Técnicas histológicas. IN: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, R., org(s). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010. p 89-188.

CARDOZO, J. P.; NAKAPE, E. S.; PEREIRA, G. T.; BOLELI, I. C. Efeito da idade da matriz e peso dos ovos, sobre os componentes do ovo em frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, 2002. p. 16.

CHELED-SHOVAL, S L.; AMIT-ROMACH, E.; BARBAKOV, M.; UNI, Z . The effect of in ovo administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre- and posthatch periods in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.90, p. 2301–2310, jun., 2011.

CHEN, W.; WANP, R.; WAN, H. F.; XIONG, X. L.; PENG, P.; PENG, J. Influence of in ovo injection of glutamine and carbohydrates on digestive organs and pectoralis muscle mass in the duck. **British Poultry Science**, London, v.50, p.436–442, jul. 2009.

CHRISTENSEN, V. L.; DONALDSON, W.E.; NESTOR, K. E.. Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. **Poultry Science**, Champaign, n.40, p.297–303, jun. 1999.

CHRISTENSEN, V.L. Factors associated with early embryonic mortality. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.57, p.359-372, dez. 2001.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Disponível em: <www.cobea.org.br/download/download?ID_DOWNLOAD=14>. Acesso em: 05 de abril de 2016.

COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.; GOULART, C.C.; NOGUEIRA, E.T.; SÁ, L.M. Exigências de aminoácidos para aves. In: SAKOMURA, N.K.; da SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2014, p240-261.

DAMASCENO, J.L.; CRUZ, F.G.G.; MELO, R.D.; FEIJÓ, J.C.; RUFINO, J.P.F.; VALENTIM, F.M.; OLIVEIRA, J.P.C. Inoculação de proteína isolada de soja em ovos embrionados oriundos de matrizes semipesadas com diferentes idades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, Belo Horizonte, v.69, n.5, p.1259-1266, jan. 2017.

FASENKO, G.M., ROBINSON, F.E.; ARMSTRONG, J.P. Variability in preincubation embryo development in domestic fowl. 1. Effects of nest holding time and method of egg storage. **Poultry Science**, Champaign, v.70, p.1876-1881, out. 1991.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**. Disponível em: <<https://www.fao.org/apdsa.asp>>. Acesso em: 29 de setembro de 2017.

FERKET, P.R.; OLIVEIRA, J.; PHANE, A.; UNI, Z. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 118, 2005.

FOYE, O T.; UNI, Z.; FERKET P.R. Effect of In Ovo Feeding Egg White Protein, β -Hydroxy- β -Methylbutyrate, and Carbohydrates on Glycogen Status and

Neonatal growth of Turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v.85, p.1185–1192, jan, 2006.

FURTADO, D. A.; MOTA, J. K. M.; NASCIMENTO, J. W. B.; SILVA, V. R.; OTA, L. C. A. Produção de ovos de matrizes pesadas criadas sob estresse térmico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas, v. 15, n. 7, p. 748–753, mai. 2011.

PONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L.; FARINA, G.; KREUZ, B.S.; PENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F.. Nutrição in ovo: Estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 62, n 1, p. 45-55, set., 2013.

GONZALES, E.; CRUZ, C.P.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; BRITO, A B. *In ovo* supplementation of 25(OH)D3 to broiler embryos. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Viçosa, v.15, n.3, p.199-202, set. 2013.

GUPTA, S.; BAKST, M.K. Turkey embryo development from cleavage through hypoblast formation. **Journal of Morphology**, Voorhees, v.217, p. 313-325, set. 1993.

IPEK, A.; SAHAN, U.; YILMAZ, B. The effect of in ovo ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. **Archiv für Gerflügelkunde**, Stuttgart, v. 68, n. 3, p 132-135, jul. 2004.

JOHRI, T.S. Feasibility of in ovo amino acid injection for embryonic growth and optimizing total and digestible amino acid requirements for meat production and immunocompetence of broiler chickens. **Poultry nutrition in India**, 2004. Disponível em: < http://www.fao.org/docrep/article/aPriippa/659_en-08.html> acesso em: 17 de jun de 2017.

KLASINP, K.C. **Comparative avian nutrition**. Wallingford: Cab International, 1998. 136p.

LE DOUARIN, N.M.; PRAPIN-BOTTON, A.; CATALA, M. Patterning of the neural primordium in the avian embryo. **Cell and Developmental Biology**, v.7, p.157-67, abr. 1996.

LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H.; PEDROSO, A.A.; CHAVES, L.S. Inoculação de glicose em ovos embrionados de frango de corte: parâmetros de incubação e desempenho inicial. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia v. 9, n. 4, p. 847-855, out/dez. 2008.

LEITÃO, A.R.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, H.J.; CAFÉ, M.B.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose, sacarose ou glicose em ovos embrionados de baixo peso. **Acta Scient Animal Science**, Maringá, v.32, p. 93-100, 2010.

LEITÃO, A.R.; LEANDRO, M.N.; STRINPHINI, H.J.; CAFÉ, M.B.; MATOS, M.S.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.15, n.1, p. 55-63, jan./mar. 2014.

LONPO, F.A. **Avaliação de fontes de carboidrato e proteína e sua utilização na dieta pré-inicial de frangos de corte**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2004. 110p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, 2004.

LOPES, K. L. A. M.; PEDROSO, A.A.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H.; BARBOSA, C. E.; MACIEL, I. B. Efeito da inoculação de glutamina *in ovo* sobre o desempenho inicial de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, n. 8, p. 103, 2006.

LOTFI, A.; AGHDAM SHAHRYAR, H.; KAYA, H. Effect of in ovo ghrelin administration on hatching results and post-hatching performance of broiler chickens. **Livestock Science**, Foulum, v.154, p.158-164, mar. 2013.

LUQUETTI, B. C.; GONZALES, E.; BRUNO, L.D. P.; FURLAN, R. L.; MACARI, M. Eg traits and physiological neonatal chick parameters from broiler breeder at different ages. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Jaboticabal, v. 6, n. 1, p. 13-17, jan-mar 2004.

MAIORKA, A. Fatores que afetam a eclodibilidade dos pintos. In: MACARI, M.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, T. P. S. *Biologia das aves*. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.) **Manejo da incubação**. 2.ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003, p. 163-179.

MAIR, J. O.; HERNANDEZ, L. A. **Anatomia patológica general**. Barcelona :Univers, 2006.

MOHAMMADREZAEI, H.; NAZEM, M.; MOHAMMADREZAEI, M. Effect of in ovo injection of Methionine on the histomorphometry of Jejunum of chicken embryo. **Biological Forum – An International Journal**, New Delhi, v.7, n.2,. p. 23-26, 2015.

MONTAPNE, L.; PLUSKEB, J.R.; HAMPSON, D.J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**, Madrid, v.108, n.1, p.95-117, ago. 2003.

MORAN Jr., E. T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 1043-1049, mai. 2007.

NASCIMENTO, J.S.; BELO, B.S.; FREITAS, H.J.; CORDEIRO, M.B.; GOMES, F.A. Influência do peso do ovo sobre a eclodibilidade e o peso do pinto ao nascimento. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.11, n.2, p. 1210-1216, jun. 2015.

NAZARENO, A.C.; SILVA, I.J.O.; VIEIRA, A.M.C.; VIEIRA, F.M.C. Microclima, idade das matrizes e tempo de estocagem influenciando nas respostas

produtivas de ovos férteis. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.18, n.11, p.1172–1178, mai. 2014.

NOY, Y; UNI, Z.; SKLAN, D. Routes of yolk utilization in the newly hatched chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, p. 13, nov. 1996.

OHTA, Y.; KIDD, M.T.; ISHIBASHI, T. Embryos growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos and chicks after in ovo administration of amino acids. **Poultry Science**, Champaign, v.80, n.10, p.1430-1436, jan. 2001.

OHTA, Y.; KIDD, M.T. Optimum site for in ovo amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, Champaign, v.80, n.10, p.1425-1429, mai, 2001.

OLIVEIRA NETO, A.R. e OLIVEIRA, W.P. Aminoácidos para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, p. 205-208, jul., 2009.

PACK, M. Proteína ideal para frangos de corte. Conceitos e posição atual. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1995. p.95-110.

PACK, M., FICKLER, J., RADEMACHER, M., LEMME, A., MACK, S., HÖHLER, D., FONTAINE, J., PETRI, A. Aminoacids on animal nutrition, 2002, 558, p.

PEDROSO, A.A.; CHAVES, L.S.; LOPES, K.L.A.M.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H. Inoculação de nutrientes de matrizes pesadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.5, mar., p.2018-2026, 2006.

RICCARDI, R. R.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. C. Efeito do jejum pós-eclosão sobre pintos de corte provenientes de ovos leves e pesados. **Revista de Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, p.1013-1020, ago. 2009.

ROSTAGNO, H.S., et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa, MG, 2005. 186p.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., DONZELE, J. L.; GOMES, P.Z.; de OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos**. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011. 186p.

RUTZ, F.; RECH, J.L.; XAVIER, E.G.; ANCIUT, M.A.; ROSSI, P. Cuidados críticos na nutrição inicial de aves: alternativas para melhorar o desempenho e o papel essencial dos nucleotídeos . In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Alltech Biotechnology, 2005, p.19-39.

SALMANZADEH, M.; EBRAHIMNEZHAD, Y.; SHAHRYAR, H.A; KANDI, J.G.G. The effects of in ovo feeding of glutamine in broiler breeder eggs on hatchability, development of the gastrointestinal tract, growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. **Archives Animal Breeding.**, v.59, p.235–242, mai. 2016.

SANTOS, T.T.; CORZO, A.; KIDD, M.T.; MCDANIEL, C.D.; TORRES FILHO, R.A.; ARAÚJO, L.F. Influence of in ovo inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, n.12, p. 1–12, 2010.

SCHMIDT, M.; POMES, P.C.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAPNO, H.S.; CECON, P.R.; CUPERTINO, E.S. Níveis nutricionais de cobre para frangos de corte machos e fêmeas nas fases de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 890-899, 2005.

SHARMA, J.M.; BURMESTER, B.R. Resistance to Marek's Disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Disease**, Jacksonville, v.26, n.1, p.134-149, jan/mar. 1982.

SILVA, M.A.; PESSOTTI, B.M.S.; ZANINI, S.F.; COLNAPO, P.L.; NUNES, L.C.; RODRIPUES, M.R.A.; FERREIA, L. Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.4, p.676-681, mar. 2011.

SKLAN, D. Fat and carbohydrate use in posthatch chicks. **Poultry Science**, ChampaiPn. v.82, n.1, p.117-122, dez., 2003.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of in ovo feedinP of carbohydrates and β -hidroxy- β -methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, ChampaiPn, v. 83, n.12, p. 2023-2028, dez, 2004.

TEIXEIRA, B. B.; TEIXEIRA, R. B.; SILVA, L. P. da; TORRES, R. A.; CAETANO, P. C.; EUCLYDES, R.F. Estimação dos componentes de variância para as características de produção e de qualidade de ovos em matrizes de codorna de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 713-717, abr. 2012.

TONA, K.; BAMELIS, F.; KETELAERE, de B., et al. Effects of EPP StoraPe Time on Spread of Hatch, Chick Quality, and Chick Juvenile Prowth. **Poultry Science**, ChampaiPn, v.82, p.736–741, jan., 2003.

UNI, Z. e FERKET, P.R. 2003. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feedinP. US Patent nº 6592878. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2002012436> (30/07/2012).

UNI, Z.; TAKO, E.; PAL-PARBER, O., SKLAN, D. MorpholoPical, molecular, and functional chanPes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, ChampaiPn, v.82, p. 1747-1754, 2003.

UNI, Z.; FERKET, P.R.; TAKO, E., KEDAR, O. In ovo feedinP improves enerPy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, ChampaiPn, v. 84, n. 5, p. 764-770, jun. 2005.

VAKAET, L. The initiation of Pastrular inPression in the chick blastoderm. **American ZooloPy**, v.24, p.555-62, aPo. 1984.

VIEIRA, B.S.; FARIA FILHO, D.E.; TORRES, K.A.A.; BORPES, D.M.; ROSA, P.S.; FURLAN, R.L. Administração in ovo de Plutamina e de lisina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal de franPos na primeira semana pós-eclosão. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 22, n.3, p. 242-247, nov. 2006.

WATT, M.; PETITTE, J.N.; ETCHEs, R.J. Early development of the chick embryo. **Journal of MorpholoPy**, v. 215, p. 165-182, fev. 1993.

WILLIAMS, C. J. Princípios fundamentais e fatores fisiolóPicos da injeção in ovo. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOPIA AVÍCOLAS, 1, 2004, São Paulo. **Anais...**São Paulo. 2004, p.171-177.

ANEXOS



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
 Câmpus Dois Vizinhos
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	Avaliação da inoculação de nutrientes <i>in ovo</i> sob a taxa de eclosão, desenvolvimento da mucosa intestinal e desempenho zootécnico em frangos de corte
Área Temática:	Produção Animal
Pesquisador / Professor:	Profa. Dr ^a . Sabrina Endô Takahashi
Instituição:	UTFPR/ câmpus Dois Vizinhos
Financiamento:	não há
Versão:	2

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2016-010
<p>Apresentação do Projeto: O projeto visa analisar os efeitos da suplementação nutritiva de frangos de corte ainda na fase embrionária, por meio de uma técnica denominada inoculação <i>in ovo</i>. Para isso, serão utilizados ovos de frango de corte da linhagem Cobb. Esses ovos serão inoculados com soluções nutritivas contendo aminoácidos e, em seguida, serão avaliados parâmetros tais como taxa de eclosão, taxa de mortalidade embrionária e qualidade dos pintainhos após a eclosão. Partes do sistema digestório de alguns dos animais sob experimentação serão submetidos a análises histopatológicas para avaliar a biometria e a densidade dos órgãos, com o intuito de verificar a relação dos tratamentos realizados por meio da técnica <i>in ovo</i> com o desenvolvimento desses órgãos. O projeto tem relevância e se justifica pelo fato de o Brasil ser o principal produtor mundial de frango de corte. Contudo, há grande perda da produção devido à alta taxa de mortalidade pós-eclosão dos pintainhos. Essa mortalidade elevada é consequência do crescimento acelerado dos embriões que, para suprir as altas taxa metabólicas decorrentes desse crescimento acelerado, realizam a gliconeogênese proteica, levando à perda de musculatura dos pintainhos recém-eclosidos. Essa perda de proteína muscular pode ser reduzida, segundo os autores do projeto, pelo oferecimento de nutrientes <i>in ovo</i>, aumentando a taxa produtiva dos frangos de corte. Isso porque a alimentação precoce ainda no período embrionário afeta positivamente a eclosibilidade, estimula o desenvolvimento do trato digestório, o peso vivo e o estado nutricional nos primeiros dias de vida. Soma-se a esses benefícios o fato da inoculação <i>in ovo</i> já ser utilizada na indústria para a inoculação de vacinas, o que facilita a introdução da técnica de nutrição <i>in ovo</i> na cadeia produtiva de frangos de corte.</p>	
<p>Objetivo: O objetivo geral do projeto é definir qual dose de aminoácido, técnica e dia da inoculação <i>in ovo</i>, trarão melhores resultados para o desempenho zootécnico dos frangos de corte, melhor taxa de eclosão e o desenvolvimento mais rápido da mucosa intestinal.</p>	
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto apresenta baixo risco para o bem-estar animal (G1), visto que a técnica de inoculação <i>in ovo</i> é realizada por meio da perfuração da casca do ovo previamente higienizado com agulha de 0,55mm. A inoculação dos nutrientes é feita na câmara de ar, tomando o cuidado de não perfurar a membrana do ovo. Após o procedimento, o furo é vedado com solução de parafina. Dessa forma, não há dano e nem indução de sofrimento fetal. Após o nascimento, as manipulações realizadas são rápidas, com objetivo apenas de pesar os animais e realizar a sexagem. A eutanásia dos animais será realizada por meio de deslocamento cervical. Essa técnica é aceita para aves segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.</p>	
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Serão realizados dois experimentos no projeto. O experimento 1 tem por objetivo avaliar o dia do desenvolvimento embrionário mais adequado para a inoculação (16º dia, 17º dia e 18º dia), bem como a eficiência de dois diferentes ângulos (45º e 90º) de introdução da agulha no ovo para a inoculação dos nutrientes (0,5ml de solução de glicose a 72g/L). Assim, nesse experimento serão utilizados 240 ovos divididos em 6 grupos de 40 ovos cada. A avaliação do melhor dia de inoculação, bem como da melhor inclinação da agulha será realizada por meio da determinação das taxa de eclosão, taxa de mortalidade embrionária e qualidade dos pintainhos pós-eclosão. Ao término do experimento, os animais serão eutanasiados por deslocamento cervical. Logo após a eclosão, serão selecionados dois animais para a retirada de órgãos do sistema digestório para a realização de análises histopatológicas. Adicionalmente, seis animais de cada tratamento para a realização de biometria e densidade dos órgãos do sistema digestório. No</p>	



<p>experimento 2 serão utilizados 720 ovos (240 ovos por vez), os quais serão inoculados em triplicata no melhor tempo escolhido experimento 1. Em cada replicata serão realizados cinco diferentes tratamentos (T1: controle - 0,5mL de solução salina; T2: metionina 1,54mg/0,4mL; T3: metionina 2,29mg/0,6mL; T4: lisina 3,04/0,4mL; T5: lisina 4,53mg/0,6mL). Ao 7º e ao 17º dias será realizado o descarte de ovos inférteis ou com embriões mortos. Após a eclosão, os pintinhos serão avaliados para verificar as alterações no desenvolvimento, ou para detectar a presença de outros problemas, tal como umbigo não curado. Os animais viáveis serão pesados (no nascimento e após 7 e 14 dias), sexados e alojados no aviário experimental do campus por 14 dias. As taxas de mortalidade serão registradas diariamente. Para o alojamento, os animais serão separados de acordo com tratamento recebido e de acordo com o sexo. Para isso serão realizadas 5 repetições, totalizando 50 parcelas. O aviário para o alojamento possui 24 x 10 metros com boxes de 1m². Serão alojadas quatro aves por box. Logo após o nascimento e também no 14º dia após o nascimento, dois animais por tratamento serão eutanasiados por deslocamento cervical para a retirada do intestino para análises histopatológicas. Da mesma forma, logo após o nascimento e no 14º dia serão eutanasiados seis animais por grupo para a realização de biometria e densidade dos órgãos. Em ambos os experimentos, a incubação dos ovos será realizada em uma incubadora automática para o controle da temperatura (37,5 °C) e da umidade (85%) e viragem de ovos automática a cada hora, com capacidade para 240 ovos.</p>
<p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados os seguintes documentos, todos em conformidade com o solicitado: Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto/aula prática; formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; declaração de não início do projeto (com assinatura e data); registro de projeto junto à DIRPPG.</p>
<p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não Há</p>
<p>Situação do Parecer: APROVADO</p>
<p>Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.</p>

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da inoculação de nutrientes in ovo sob a taxa de eclosão, desenvolvimento da mucosa intestinal e desempenho zootécnico em frangos de corte", protocolo nº 2016/010, sob a responsabilidade de Sabrina Endo Takahashi - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 14/10/2016.

Vigência do projeto:	01/09/2016 - 20/12/2016
Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	Aves da linhagem Cobb
Número de animais:	960
Peso/idade:	Fase embrionária até o 14º dia após o nascimento
Sexo:	Machos e fêmeas
Origem:	Aquisição de ovos no comércio local

Dois Vizinhos, 14 de junho de 2016.

Nédia de Castilhos Ghisi
Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Nédia de Castilhos Ghisi
Presidente do CEUA - UTFPR
Comissão de Ética no
uso de Animais

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	Avaliação da inoculação de nutrientes <i>in ovo</i> sob a taxa de eclosão, desenvolvimento da mucosa intestinal e desempenho zootécnico em frangos de corte
Área Temática:	Produção Animal
Pesquisador / Professor:	Prof. Dr. Sabrina Endo Takahashi
Instituição:	UTFPR/ campus Dois Vizinhos
Financiamento:	não há
Versão:	3 (emenda)

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2015-010 - emenda
<p>Apresentação do Projeto: Segue o parecer aprovado do protocolo nº 2015-010. Esta emenda requer:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alterações na dose dos aminoácidos a serem inoculados; - Mudança na solução de diluição dos aminoácidos e da glicose, para a solução tampão PBS (phosphate buffered saline); - E mudança da dose da glicose. 	
<p>Objetivo: O objetivo geral do projeto é definir qual dose de aminoácido, técnica e dia da inoculação <i>in ovo</i>, trarão melhores resultados para o desempenho zootécnico dos frangos de corte, melhor taxa de eclosão e o desenvolvimento mais rápido da mucosa intestinal.</p>	
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto apresenta baixo risco para o bem-estar animal (BIA), visto que a técnica de inoculação <i>in ovo</i> é realizada por meio da perfuração da casca de ovo previamente higienizado com agulha de 0,55mm. A inoculação dos nutrientes é feita na câmara de ar, tomando o cuidado de não perfurar a membrana do ovo. Após o procedimento, o furo é vedado com solução de parafina. Dessa forma, não há dano e nem indução de sofrimento fetal. Após o nascimento, as manipulações realizadas são rápidas, com objetivo apenas de pesar os animais e realizar a sexagem. A eutanásia dos animais será realizada por meio de destacamento cervical. Esta técnica é aceita para aves segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.</p>	
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Modificar a dose dos aminoácidos, pois após revisar mais trabalhos sobre a inoculação de aminoácidos e glicose, foi visto que aquelas doses propostas no projeto são muito baixas, e não irão causar o efeito desejável. A dose de aminoácidos colocada no projeto foi baseada no trabalho de Ohta et al. (2004). Levando em conta que a avicultura de 2004 até agora teve grande avanço no melhoramento genético e, consequentemente, as exigências nutricionais dos animais também aumentaram.</p> <p>Doses que estão no projeto originalmente aprovado (para facilitar a visualização das modificações sugeridas):</p> <p>T1: 0,5 ml inoculação de solução salina de Cloreto de Sódio à 0,9% (grupo controle); T2: inoculação de metionina 1,54 mg/0,6ml; T3: inoculação de metionina 2,29 mg/0,6ml; T4: inoculação de lisina 3,04mg/0,6 ml; T5: inoculação de lisina 4,53 mg/0,6ml. Os nutrientes serão diluídos em solução salina de Cloreto de Sódio à 0,9%.</p> <p>Sendo assim as novas doses requeridas, conforme o trabalho de Mohammadsaei; Nazam e Mohammadsaei (2013) serão:</p> <p>T1: 0,5 ml de solução tampão PBS (phosphate buffered saline) (grupo controle); T2: inoculação de metionina 20 mg/0,5ml de solução PBS; T3: inoculação de metionina 30 mg/0,5ml de solução PBS; T4: inoculação de lisina 20 mg/0,5 ml de solução PBS; T5: inoculação de lisina 30 mg/0,5ml de solução PBS.</p> <p>A solução tampão PBS (phosphate buffered saline), possui melhor capacidade de manter o pH do que a solução salina</p>	



de cloreto de sódio 0,9%, por esse motivo realizaremos a troca do diluente.
A alteração da glicose 72g/L para glicose 50%, foi feita baseada no trabalho de Leitão et al. (2008) que obtiveram resultados
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados os seguintes documentos, todos em conformidade com o solicitado: Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto/aula prática; formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; declaração de não início do projeto (com assinatura e data); registro de projeto junto à DIRPPG.
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não Há
Situação do Parecer: APROVADO
Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da inoculação de nutrientes in ovo sob a taxa de eclosão, desenvolvimento da mucosa intestinal e desempenho zootécnico em frangos de corte (EMENDA)", protocolo nº 2016/010, sob a responsabilidade de Sabrina Endo Takahashi - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 05/07/2016, na forma de emenda ao projeto pré-aprovado.

Vigência do projeto:	01/09/2016 - 20/12/2016
Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	Aves da linhagem Cobb
Número de animais:	960
Peso/Idade:	Fase embrionária até o 14º dia após o nascimento
Sexo:	Machos e fêmeas
Origem:	Aquisição de ovos no comércio local

Dois Vizinhos, 6 de julho de 2016.

Nédia de Castilhos Ghisi

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Nédia de Castilhos Ghisi
Presidente do CEUA - UTFPR
Comissão de Ética no
uso de Animais

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

ANEXO B: Ementa do comitê de ética