

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO, DESEMPENHO E
QUALIDADE DO ESQUELETO DE FRANGOS OBTIDOS
DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS *IN OVO* COM 25-
HIDROXI-COLECALCIFEROL**

Michele Laboissière
Orientador: Prof. Dr. José Henrique Stringhini

GOIÂNIA
2013



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFPG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFPG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFPG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Michele Laboissière** E-mail: **michele.ufg@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: **PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO, DESEMPENHO E QUALIDADE DO ESQUELETO DE FRANGOS OBTIDOS DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS IN OVO COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL** Palavras-chave: **embrião, frango de corte, suplementação in ovo, vitamina D**

Título em outra língua: **PARAMETERS OF INCUBATION, QUALITY AND PERFORMANCE OF THE SKELETON OF CHICKEN EMBRYO SUPPLEMENTED OBTAINED IN EGG WITH 25-HYDROXY-COLECALCIFEROL**

Palavras-chave em outra língua: **broiler, embryo, in ovo supplementation, vitamin D**

Área de concentração: **Produção Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **05/07/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Prof. Dr. José Henrique Stringhini** E-mail: **jhstring@uol.com.br**

Co-orientador(1): **Profa. Dra. Elisabeth Gonzáles** E-mail: **elisa.gonzales@uol.com.br**

Co-orientador(2): **Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

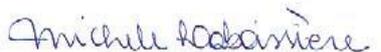
[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 28 de julho de 2013


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MICHELE LABOISSIÈRE

**PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO, DESEMPENHO E
QUALIDADE DO ESQUELETO DE FRANGOS OBTIDOS
DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS *IN OVO* COM 25-
HIDROXI-COLECALCIFEROL**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. José Henrique Stringhini - UFG

Comitê de Orientação:
Prof^a. Dr^a. Elisabeth Gonzales - UNESP
Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade - UFG

GOIÂNIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

L122p Laboissière, Michele.
Parâmetros de incubação, desempenho e qualidade do esqueleto de frangos obtidos de embriões suplementados *in ovo* com 25 - hidroxicoлекаliferol [manuscrito] / Michele Laboissière. – 2013.
xii, 131f. : il. ; figs., tabs., qds.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Stringhini; Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a Elisabeth Gonzáles, Prof.^a Dr.^a Maria Auxiliadora Andrade.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.
Bibliografia.

1. Frango de corte - Suplementação *in ovo* - Vitamina D. 2. Frango de corte - Embrião - Desempenho zootécnico. Título

CDU: 636.5.082.474

MICHELE LABOISSIÈRE

Tese defendida e aprovada em **05/07/2013** pela Banca Examinadora
constituída pelos professores:



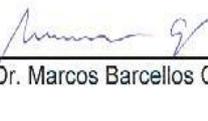
Prof. Dr. José Henrique Stringhini
(ORIENTADOR (A))



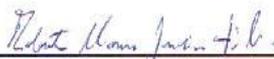
Profa. Dra. Sandra Lara Furtado Costa Rodrigues – Kemin do Brasil



Prof. Dr. José Roberto Sartori – UNESP/FMVZ



Prof. Dr. Marcos Barcellos Café



Prof. Dr. Roberto de Moraes Jardim Filho

DEDICO

Aos meus familiares, em especial,
à minha querida filha Giovanna
por me descontraír com seus carinhos;
ao meu filho Gabriel, que me enche de alegria;
aos meus pais Arnaldo e Maria Luiza
que me ensinaram o valor do conhecimento;
à minha adorável sobrinha, Maria Carolina;
e aos meus irmãos, René e Philipe,
que muito estimo.

*“Cumpri vossa tarefa antes que o tempo passe
e, no devido tempo, ele vos dará a recompensa.”*

Eclesiástico 51, v 38.

AGRADECIMENTOS

Graças a Deus termino esta Tese. Não poderia deixar de reconhecer as suas bênçãos em minha vida. Nas mãos de Deus coloquei cada pessoa que participou comigo nesta caminhada acadêmica:

Meus pais Arnaldo e Maria Luiza que me proporcionaram educação, aconchego e afeto, ensinando-me a respeitar o próximo e a cuidar da família com carinho e gratidão.

Minha filha Giovanna, que brilha como uma luz em minha vida, me confortando e me descontraindo com teu bom humor e bondade em teu coração.

Meu filho Gabriel, que trouxe mais alegria no lar e preencheu minha vida. Luciano, pelo tempo que esteve comigo.

Meus irmãos, René e Philipe, pelo cultivo da convivência mais preciosa que os meus pais me deram.

Minha sobrinha Maria Carolina, “Marol” que me encorajou na realização de uma missão familiar importante.

Minha comadre prima Vivian Ferreira, que tenho como uma irmã. Madrinha de meus filhos.

Meus familiares que me estimularam para concluir este trabalho com garra e perseverança, em especial minha avó materna Maria Londe.

Amigos especiais, Maria Inês, Maria Teresa, Mônica, Juraci, Sandra, Andréa, Núvea e Maristela pelo enorme carinho. Aos demais colegas, muito obrigada pela ajuda, companheirismo e momentos de descontração, Luzia, Mariana, Mihayr, Fabyola, Natali, Candice, Fernanda, Aracele, Rafael, Diogo, Eliane, Alessandra e Heloisa.

José Henrique Stringhini, meu orientador, cauteloso, compreensivo e de excelente caráter. Confiou em mim e sem essa credibilidade seria difícil concluir este trabalho. Obrigada pelas orientações para eu terminar a Tese.

Ao Diretor Marcos Barcellos Café que me atribuiu uma função gratificante, auxiliá-lo na implantação do Aviário Escola-UFG junto à empresa São Salvador Alimentos S/A. Como sou grata a essa confiança. Valeu a pena, obrigada.

Nadja Mogyca Leandro e Maria Auxiliadora Andrade, professoras que sempre tiveram paciência e me descontraíam nos momentos de preocupações,

trazendo otimismo e tranquilidade. Banca examinadora, Elizabeth Gonzáles, Maria Auxiliadora, Emmanuel Arnhold, Marcos Barcellos Café, José Henrique Stringhini, Sandra Iara Furtado Costa Rodrigues, José Roberto Sartori e Roberto de Moraes Jardim Filho que dedicaram parte de seu tempo avaliando e enriquecendo meu trabalho. Cíntia Silva Minafra e Rezende, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Colegas e amigos do programa de pós-graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás que contribuíram para realização dos experimentos e dos trabalhos conduzidos em sala de aula, trazendo sugestões e colaboração nas escalas de manejo. Aos granjeiros da UFG: Charles, Kelly e Felipe por acompanhar a criação dos frangos, principalmente, nos manejos noturnos na fase inicial dos pintos. Demais professores e funcionários do programa de pós-graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, que me acolheram e me proporcionaram conhecimento e oportunidade para participar da vida acadêmica.

Super Frango que viabilizou a execução dos experimentos, em gratidão ao empresário José Carlos de Souza. Agradeço aos funcionários da fábrica de ração e do incubatório, em especial Roberto, João Lopes, Claudionor, Roberta, Hugo Galvão que me auxiliaram e caminharam ao meu lado, atendendo às solicitações experimentais.

DSM Nutritional Products, FAPEG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás; PUC-Goiás pela colaboração da utilização dos laboratórios de análises; UEG - São Luis dos Montes Belos pela liberação parcial das minhas atividades como professora para eu conseguir finalizar as análises laboratoriais e estatísticas do meu trabalho.

Não poderia esquecer o meu Avô materno Lázaro Ferreira que faleceu no período do meu experimento. Homem digno! Sabia dar valor na leitura de um bom livro e sempre gostava de saber sobre os meus estudos.

Pessoas que trago guardado em meu coração com respeito, gratidão e generosidade que por algum momento participaram do desenvolvimento deste trabalho gratificante.

Obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

José Henrique Stringhini

pela imprescindível orientação, desde os primeiros seminários do curso de pós-graduação até o presente momento, acompanhando de perto todas as minhas atividades durante o doutorado e que comigo esteve até o fim dessa pesquisa.

Elisabeth Gonzales

pela idealização do projeto e acompanhamento das atividades no incubatório, principalmente, nas escalas noturnas das janelas de nascimentos que fizemos juntas, sempre dispostas, alegres e atentas no horário de coleta dos dados. Obrigada pela instrução e gerenciamento das planilhas experimentais.

Maria Auxiliadora Andrade

pelo acompanhamento nas necropsias, ensinamento das análises laboratoriais e pelas avaliações que realizamos juntas com bastante entusiasmo.

Emmanuel Arnhold

pelo aprendizado que adquiri com a utilização das ferramentas de estatística, que com muita satisfação me atendia sempre que eu precisava.
Obrigada, sua contribuição foi fundamental!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
Vitamina D ₃ e metabólitos	3
Transferência maternal de vitamina D ₃ e metabólitos via ovo	5
Influência da nutrição “ <i>in ovo</i> ” no desenvolvimento do embrião	8
Suplementação <i>in ovo</i> com metabólitos vitamina D ₃	9
Problemas locomotores	10
Discondroplasia Tibial (DT) em frango de corte.....	12
Técnicas de mensuração dos problemas locomotores.....	15
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL <i>IN OVO</i> PARA FRANGOS DE CORTE	29
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
Local de realização.....	33
Instalações, equipamentos e manejo experimental	33
Programa alimentar	35
Delineamento experimental.....	37
Variáveis analisadas.....	37
Avaliação da eclodibilidade e mortalidade embrionária dos ovos férteis	37
Avaliação da qualidade dos pintainhos.....	39
Análises estatísticas	40
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

CAPÍTULO 3 - QUALIDADE DE PINTAINHOS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE ATÉ 21 DIAS PROVENIENTES DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL <i>IN OVO</i>	51
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
Local de realização	55
Instalações, equipamentos e manejo experimental	55
Programa alimentar	57
Delineamento experimental.....	59
Variáveis analisadas.....	59
Avaliação da eclodibilidade e mortalidade embrionária dos ovos férteis	59
Avaliação da qualidade dos pintainhos.....	60
Avaliação do desempenho zootécnico	61
Análises estatísticas	62
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 4 - QUALIDADE DE PINTAINHOS NEONATOS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE ATÉ 35 DIAS OBTIDOS DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL <i>IN OVO</i>	73
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
Local de realização	77
Instalações, equipamentos e manejo experimental.....	77
Programa alimentar	79
Delineamento experimental.....	81
Variáveis analisadas.....	82
Avaliação da eclodibilidade e mortalidade embrionária dos ovos férteis	82
Avaliação da qualidade dos pintainhos.....	84
Avaliação do desempenho zootécnico	85
Análises estatísticas	86
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4. CONCLUSÃO	95

REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO 5 - EFEITO DA QUALIDADE DO ESQUELETO DE FRANGO DE CORTE, OBTIDOS DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS IN OVO COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL	98
1. INTRODUÇÃO.....	100
2. MATERIAL E MÉTODOS	101
Local de realização.....	101
Instalações, equipamentos e manejo experimental.....	101
Programa alimentar	102
Delineamento experimental.....	105
Variáveis analisadas.....	105
Avaliação da marcha das aves “ <i>Gait Score</i> ”.....	105
Avaliação de deformidades <i>Valgus</i> e <i>Varus</i>	106
Avaliação macroscópica da placa de crescimento	106
Avaliação microscópica da placa de crescimento.....	107
Avaliação da Densidade mineral óssea.....	107
Avaliação da Resistência óssea	108
Análises estatísticas	108
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
4. CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS	126
CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130

RESUMO GERAL

Foram desenvolvidos três experimentos com objetivos de avaliar os efeitos na eclodibilidade dos ovos férteis, mortalidade embrionária, qualidade do neonato, desempenho e a qualidade do esqueleto de frangos originados de embriões aos 18-19 dias de desenvolvimento embrionário, suplementados *in ovo* com 25-D-hidroxi-colecalciferol, 25(OH)D₃. As incubações foram conduzidas no incubatório São Salvador Alimentos S/A. Na transferência e vacinação, para os três experimentos, os ovos com embriões viáveis foram inoculados com a solução controle e com 25(OH)D₃ incorporados na vacina. A compatibilidade do produto foi avaliada anteriormente e as dosagens utilizadas foram zero e 1,250µg de 25(OH)D₃ equivalentes a 50 UI de vitamina D₃. Os ovos foram acondicionados em sacos de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato. Nos experimentos, avaliou-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade dos ovos férteis (%), a mortalidade embrionária (%), os pesos (g) e comprimentos dos neonatos (mm) e a qualidade do pintainho (escore). Os pintainhos foram enviados para o aviário experimental da Universidade Federal de Goiás para avaliação do desempenho. Os dados foram analisados pelo programa estatístico do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). O nível de significância adotado foi de 5%.

Experimento 1: Não houve diferença significativa na eclodibilidade e na mortalidade embrionária entre os tratamentos. A qualidade dos pintainhos e o peso aos sete dias foram piores para o grupo inoculado com 25(OH)D₃. Concluiu-se que o metabólito 25(OH)D₃ não foi efetivo na melhoria da qualidade dos pintainhos incubados em máquina de estágio múltiplo.

Experimento 2: Os resultados de eclodibilidade dos ovos férteis entre os tratamentos apresentaram diferença ($p < 0,05$), obtendo-se maior eclodibilidade as aves inoculadas com 25(OH)D₃. A utilização do aditivo 25(OH)D₃ *in ovo* foi efetiva ($p < 0,05$) na melhoria da eclodibilidade dos ovos férteis. O metabólico 25(OH)D₃ melhorou a viabilidade dos frangos de corte até 21 dias de idade. Entretanto, não houve influência ($p > 0,05$) para peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar de um aos 21 dias de idade. Concluiu-se que o metabólito 25(OH)D₃ foi efetivo na melhoria da eclodibilidade e qualidade dos pintainhos incubados em máquina de estágio único.

Experimento 3: Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos para os resultados de eclodibilidade dos ovos férteis, mortalidade embrionária e qualidade do neonato, peso médio, ganho de peso, consumo de ração, mortalidade e conversão alimentar de um a 35 dias de idade. Também, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos para as avaliações de *gait score*, deformidade *vagus-varus*, discondroplasia tibial, resistência e densidade mineral óssea. Portanto, a utilização do aditivo 25(OH)D₃ *in ovo* aos 19 dias de desenvolvimento embrionário não foi efetivo na melhoria do desempenho e do esqueleto de frangos de corte.

Palavras-chaves: embrião, frango de corte, suplementação *in ovo*, vitamina D

GENERAL ABSTRACT

Three experiments were carried out to evaluate the effect of *in ovo* supplementation of 25(OH)D₃ at 18-19 days of incubation in the fertile egg hatchability, embryonic mortality, chick hatched quality, performance and bone quality of broilers. Egg incubation was performed in São Salvador Alimentos S/A hatchery. In the removal to hatch machine and vaccination, for all experiments, eggs with viable embryos were inoculated one with placebo and other with 25(OH)D₃ added to the vaccine solution. The compatibility of the vaccine and 25(OH)D₃ was verified for the dosis tested, zero and 1.250µg of 25(OH)D₃ which is equivalent to 50 UI of vitamin D₃. Eggs were wrapped in air-permeable bags in order to separate and identify all the egg components and chick after birth. In the experiments, the incubation period (hours), the fertile eggs hatchability, the embryo mortality, the weight, length and quality of the newborn chicks were evaluated. Newborn chicks were allotted in the experimental facilities of the UFG to measure performance variables. Data were analysed using the R statistical package, version 2.14.2 at 5% probability level. In Experiment 1, no significant difference was observed in hatchability and embryo mortality between treatments. Chick quality and weight at seven days of age were worst for the group inoculated with 25(OH)D₃. In Experiment 2, fertile egg hatchability and livability until 21 days of age were increased ($p < 0,05$) for broilers obtained from 25(OH)D₃ inoculated eggs. But, chick weight, weight gain, feed-intake and feed conversion until 21 days of age. In Experiment 3, no difference ($p > 0,05$) was observed between treatments for fertile egg hatchability, embryo mortality, newly-hatched chick quality, average hatch weight, weight gain, feed intake, mortality and feed conversion from one to 35 days of age. No difference ($p > 0,05$) occurred for leg problems evaluations like *gait score*, vagus-varus deformities, tibial discondroplasia, bone resistance and mineral density. Then, the use of 25(OH)D₃ *in ovo* at 19 days of embryo development was not effective to increase performance and bone quality in broilers.

key words: broiler, embryo, *in ovo* supplementation, vitamin D

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a busca por melhor desempenho e rendimento de carnes na indústria avícola aumentou a pesquisa nos setores de incubação, principalmente, quando se refere à nutrição do embrião. A tecnologia de aplicação e administração *in ovo* permite a inoculação de substâncias nutritivas sem causar prejuízo ao desenvolvimento embrionário, sendo possível suplementar via exógena os embriões de frangos de corte utilizando a mesma técnica de vacinação.

É interessante conhecer os fatores que influenciam a aplicação para definir melhor o sucesso ou o fracasso da aplicação *in ovo*. As interações da idade do embrião no momento da injeção, eclodibilidade, compartimentalização da inoculação e as respostas fisiológicas devem ser levadas em consideração ao estudar as técnicas de injeção para identificar o momento ideal e atingir a localização desejada dentro do ovo embrionado (WILLIANS, 2004).

Considerando que o acesso à alimentação pelo neonato é crítico para o desenvolvimento da capacidade digestiva, a inoculação *in ovo* permite a introdução de nutrientes específicos em contato com o enterócito, direcionando sua diferenciação, aumentando, assim, a capacidade de digerir alimentos pelo pinto após eclosão (TAKO et al., 2004; VIEIRA & POPHAL, 2005).

Em geral, o momento preferido para a injeção segura da vacina *in ovo* é a partir do dia 17 e 12-14 horas de incubação ao dia 19 e 2-4 horas de incubação, sendo o tempo “zero” o início da incubação. Em termos de desenvolvimento embrionário, o momento ideal de injeção, inicia no momento em que o pedículo da gema está começando sua ascensão para o abdômen e a cabeça está para baixo da asa direita, até ser iniciada a bicagem externa. A eclodibilidade dos ovos embrionados é afetada negativamente se transferidos para o nascedouro mais cedo, sejam injetados ou não. A maioria da injeção *in ovo* realizada comercialmente entre 18 dias e 10-12 horas de incubação é inoculada no líquido amniótico e a maior proporção das inoculações realizadas a partir de 19 dias, ocorre no próprio embrião (WILLIANS, 2004).

A nutrição *in ovo* é prática recente e consiste na inoculação de nutrientes no líquido amniótico, com a finalidade de aumentar o estado nutricional do embrião (LEITÃO et al., 2005), o que reflete a maior eficiência digestiva, a redução da mortalidade e da morbidez pós-eclosão e melhor desenvolvimento do sistema imunológico (UNI & FERKET, 2004). Entretanto, estas respostas positivas não dependem da composição da solução, mas também do volume e da osmolaridade da solução injetada no âmnio, pois em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar desequilíbrio osmótico resultando no óbito do embrião (FERKET et al., 2005).

O embrião de frango de corte tem quantidade limitada de nutrientes para seu desenvolvimento. O fornecimento de nutrientes *in ovo* no desenvolvimento embrionário pode funcionar como fonte extra de nutrientes para esse desenvolvimento, resultando em maior peso ao nascimento, maior viabilidade, maior vigor, entre outros. Para tanto, é necessário definir quais nutrientes utilizar, o período e local da administração, a forma de fazer esta administração entre outros fatores (SANTOS, 2007).

A suplementação *in ovo* pode fornecer um elemento essencial para a diminuição da mortalidade embrionária tardia e o desenvolvimento normal do tecido ósseo no período neonatal do pintainho, cujo crescimento ósseo é prioritário nessa fase de desenvolvimento (GONZALES et al., 2009).

Diante da complexidade e da ampla variação das condições da avicultura, torna-se necessária a realização de pesquisas nessa área, visando esclarecer possíveis efeitos do aumento ou da redução da suplementação de vitamina D₃ e seus metabólitos nas dietas pré-eclosão *in ovo* ou nas dietas de frangos de corte.

Portanto, objetivou-se, com este trabalho, estudar a influência da utilização do metabólito 25(OH)D₃ *in ovo* na nutrição de frangos de corte e principalmente, os efeitos no desenvolvimento embrionário e as possibilidades de utilizar a técnica de aplicação automática de vacinação industrial *in ovo* com o metabólito 25(OH)D₃ visando reduzir os problemas de pernas que causam grandes perdas na produção avícola mundial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Vitamina D₃ e metabólitos

Na ave, o colecalciferol passa para a corrente sanguínea na forma de portomícrons e são levadas aos órgãos específicos (KLASING, 1998) para originar os três maiores metabólitos: 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, e 24,25(OH)₂D₃ (NORMAN & HURWITZ, 1993). Com os estudos de BAR et al. (1980), observou-se que a absorção de 25(OH)D₃ é mais eficiente quando comparada com vitamina D₃ especialmente na porção inicial do jejuno.

A administração dietética de 25(OH)D₃, provavelmente minimiza a dependência da formação de micelas para que a absorção ocorra (WARD, 2004). Visto que a adição de uma hidroxila no carbono 25 da estrutura da vitamina D torna esta molécula mais polar, portanto mais hidrofílica, em relação à vitamina D₃ (NELSON & COX, 2005).

A forma hidroxilada 25(OH)D₃ também está associada com a maior absorção de cálcio intestinal (HEANEY et al., 1997) provavelmente devido à presença de proteínas transportadoras de vitamina D nas células intestinais as quais possuem maior afinidade para 25(OH)D₃ apresentando, conseqüentemente, maior platô de absorção em relação ao colecalciferol.

A redução de danos esqueléticos, resultantes de lesões entéricas, pode ser adquirida pela inclusão do metabólito da vitamina D₃, 25-(OH)D₃ nas dietas até 21 dias, cuja finalidade é melhorar a sustentação e o rápido desenvolvimento esquelético, buscando uma rápida absorção deste metabólito durante a época de doenças entéricas (OLIVEIRA, 2008).

Metabolismo da vitamina D₃ e metabólitos

A vitamina D₃ não é biologicamente ativa, mas é convertida *in vivo* à forma ativa da vitamina D por duas reações sequenciais de hidroxilação: a primeira no fígado originando o 25(OH)D₃; segunda nos rins, produzindo o 1,25(OH)₂D₃, que é reconhecidamente a mais ativa e potente forma da vitamina (McDOWELL, 1989). O fígado promove o primeiro passo para a ativação

metabólica da vitamina D₃ por meio da hidroxilação do C25 originando 25 hidroxicolecalciferol 25(OH)D₃ catalisada pela enzima 25(OH)D₃ -1-hidroxilase (NORMAN & HURWITZ, 1993, LESSON & SUMMERS, 2001).

A produção de 25(OH)D₃ no fígado, além de rápida, sofre pouca regulação. O produto da reação, 25-hidroxicolecalciferol: 25(OH)D₃ é a forma predominante da vitamina D no plasma. Deste modo, seus níveis plasmáticos refletem a reserva corporal de vitamina D. O metabólito 25(OH)D₃ é depositado no tecido gorduroso, sendo este, seu principal reservatório (PEDROSA & CASTRO, 2005).

Para se tornar ativa, o 25(OH)D₃ é hidroxilado pelas mitocôndrias das células dos túbulos contorcidos proximais do rim, sob ação da enzima 1- α hidroxilase, transformando-se no 1,25 dihidroxivitamina D 1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol e no 24,25(OH)₂D₃ (NORMAN, 1987; NORMAN, 1990). Estes metabólitos podem sofrer uma terceira hidroxilação originando 1,24,25 trihidroxivitamina D₃ (BELL, 1985).

A produção do metabólito 1,25(OH)₂D₃ - calcitriol atingi concentrações cerca de 500-1000 vezes a do precursor 25(OH)D₃ - calcidiol e é considerada a forma ativa da vitamina D₃ (PEDROSA & CASTRO, 2005).

Atividade biológica da vitamina D₃ e metabólitos

A atividade biológica da vitamina D₃ e metabólitos difere entre as fontes naturais ou sintéticas. Para equiparar tais diferenças, foi desenvolvida a medida padronizada denominada ICU (International Chick Units) como a dose recomendada de 62,5 mg/tonelada de ração de 25(OH)D₃ que corresponde a 2500 ICU/ton de vitamina D₃ de forma que 1mg equivale a 40.000 UI ou 1 μ g de vitamina D₃ corresponde a 40 UI de atividade da vitamina D₃ (SOARES et al., 1995). ATENCIO et al. (2005) concluíram, em experimentos com reprodutoras, que a potência do metabólito 25(OH)D₃ foi maior apenas quando suplementado em baixos níveis de suplementação.

Em situações de carência de vitamina D₃, o sistema renal produz somente 1,25(OH)₂D₃ (NORMAN, 1987; NORMAN, 1990; NORMAN & HURWITZ, 1993). A deficiência de vitamina D está comumente associada com decréscimos

no cálcio sangüíneo, alargamento da epífise cartilaginosa, aumento da matriz óssea não-mineralizada (VAIANO et al., 1994). Os efeitos dessa deficiência podem ser revertidos pelo tratamento com colecalciferol dietético ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A administração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a animais deficientes em vitamina D estimula a reabsorção óssea e promove a mineralização do osso osteoblástico por meio do fornecimento de cálcio e fósforo para a formação da nova matriz óssea (SUDA et al., 1990).

Doses elevadas de vitamina D estão associadas com deposição de pequenas massas brancas de cálcio sobre a superfície da casca (GOODSON-WILLIAMS et al., 1987) e calcificação dos túbulos renais (LEESON & SUMMER, 2001). De acordo com (BAKER et al., 1998), a dose tóxica da vitamina D é 250 vezes maior do que a exigência para colecalciferol e 5-10 vezes para $25(\text{OH})\text{D}_3$. YAGER et al. (1995) concluíram também que a suplementação com $25(\text{OH})\text{D}_3$ é de 5 a 10 vezes mais tóxica quando comparada com vitamina D_3 ao avaliarem o aumento da concentração plasmática do metabólito $25(\text{OH})\text{D}_3$, em detrimento de pele, peito e ossos.

SOARES et al. (1995) relatam que o $25(\text{OH})\text{D}_3$ é o metabólito com maior potencial de uso, em substituição à vitamina D_3 , visto que a forma propriamente ativa produzida artificialmente pelas indústrias, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, apresenta efeito tóxico com pequenas doses de inclusão.

Transferência maternal de vitamina D_3 e metabólitos via ovo

FRASER & EMTRAGE (1976) estudaram a composição de ovos provenientes de matrizes pesadas e encontraram 5% da vitamina D depositada no ovo como $25(\text{OH})\text{D}_3$, sugerindo que o $25(\text{OH})\text{D}_3$ pode não estar em quantidade suficiente para atender o fornecimento de vitamina D no embrião em desenvolvimento.

Segundo ROSTAGNO et al. (2005), nas condições brasileiras as recomendações são de 2500 UI/kg ração para reprodutoras. Em geral, aves suplementadas com as maiores doses de vitamina D_3 apresentam respostas positivas quanto à produção, eclodibilidade, peso e gravidade específica dos ovos e cinzas da progênie (ATENCIO et al. 2006).

O conteúdo de vitamina D₃ no ovo é fundamental para o metabolismo do cálcio que corre no embrião em desenvolvimento (BETHKE et al., 1936). De acordo com NABER (1993), a eficiência da transferência de colecalciferol (vitamina D₃) da dieta das reprodutoras para os ovos é considerada mediana. Segundo MATTILA et al. (1999), existe correlação positiva entre a quantidade de vitamina D₃ suplementada à dieta da matriz e o conteúdo desta e de 25(OH)D₃ encontrados na gema. De acordo com SELL & JERRY (1994), a vitamina D presente na gema do ovo é metabolizada pelo embrião para ser utilizada na formação do esqueleto da ave. A membrana que envolve a gema do ovo, também é afetada pelos níveis de vitamina D, facilitando posteriormente a eclosão da ave. WILSON (1997), avaliando as consequências da deficiência vitamina D₃ no desenvolvimento do embrião, verificou que a deficiência de vitamina D₃ causa mortalidade embrionária tardia, atrofiamento e raquitismo. Outras pesquisas científicas (NARBAITZ & FRAGISKOS, 1984; NARBAITZ et al., 1987; NARBAITZ & TSANG, 1989) demonstraram que o excesso ou deficiência da vitamina está diretamente associada com a menor eclosão dos ovos férteis em consequência da maior mortalidade embrionária observada especialmente em embriões na terceira semana de incubação.

NARBAITZ & TSANG (1989) descreveram as alterações de posicionamento durante o estágio pré-eclosão em embriões provenientes de matrizes suplementadas com deficiência de vitamina D₃. Aos 18 dias, observou-se mortalidade embrionária com embriões mal posicionados. A incapacidade dos embriões de movimentarem corretamente para entrar em contato com a câmara de ar e iniciar a respiração pulmonar foi justificada pelo menor peso ósseo e muscular. Os mesmos autores verificaram que aos 17 dias de incubação embriões deficientes de vitamina D₃ apresentaram fragilidade no bico e alterações histológicas ósseas.

A deposição de colecalciferol na gema é realizada pela proteína específica denominada proteína ligadora de colecalciferol (FRASE & EMTAGE, 1976). De acordo com FREEMAN & VINCE (1974), a gema, o albúmem e a casca possuem, respectivamente, 28,5 mg, 3,5 mg e 5 g de cálcio disponíveis para o desenvolvimento do embrião. A casca está diretamente envolvida no processo de mineralização esquelética e troca de gases que ocorrem durante o

desenvolvimento do embrião (ROMANOFF, 1967; FREEMAN & VINCE, 1974). CARRADINO et al. (1968) verificaram que o metabólito $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induz a deposição de cálcio na casca do ovo por ativação da CaBP intestinal presente na glândula da casca. Segundo COHEN et al. (1978), a suplementação com vitamina D_3 , $25(\text{OH})\text{D}_3$ ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como fonte de vitamina D não alteram a atividade desta proteína na glândula da casca, não modificando, desta forma, o transporte de cálcio.

A mineralização do osso é iniciada no 8º dia de incubação, pela solubilização do cálcio presente na gema (FREEMAN & VINCE, 1974). A ação da vitamina D_3 e seus metabólitos na membrana córionialantóide ocorrem devido à presença de receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (NARBAITZ et al., 1980). Aos 12-14 dias ocorre a formação da membrana córionialantóide e o cálcio da casca passa a ser solubilizado e transportado ao embrião (TUAN et al., 1986). A reprodutora não transfere ao ovo quantidades adequadas de vitamina D, tendo como consequência aumento na mortalidade embrionária tardia (SUNDE et al., 1978). SOARES et al. (1995) observaram que galinhas no final do ciclo de produção apresentam menor eficiência de conversão hepática de vitamina D_3 em seu metabólito $25(\text{OH})\text{D}_3$. Pesquisas demonstram que, quando suplementado como única fonte de vitamina D_3 , o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não é transferido da reprodutora para o ovo (NARBAITZ & TOLNAI, 1978; SUNDE et al., 1978; AMEENUDDIN et al., 1982; NARBAITZ & FRAGISKOS, 1984; HART et al., 1986; NARBAITZ et al., 1987). Desta forma, matrizes recebendo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produziram ovos que não eclodiram (HART et al., 1986) e/ou apresentaram baixa eclosão associada à elevada mortalidade na terceira semana (SUNDE et al., 1978; AMEENUDDIN et al., 1982; HART et al., 1986). Observou-se, também, hipocalcemia, hiperfosfatemia e baixa relação cinza/peso seco na tíbia (NARBAITZ & TOLNAI, 1978; NARBAITZ & FRAGISKOS, 1984; NARBAITZ et al., 1987). Entretanto, a inoculação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aos 14 dias de incubação normalizou a concentração de cálcio e fósforo (NARBAITZ et al., 1987). Segundo AMEENUDDIN et al. (1982) e SOARES et al. (1995), $25(\text{OH})\text{D}_3$ é a forma hidroxilada com maior habilidade de ser transportada para os ovos e, conseqüentemente, capaz de suportar o desenvolvimento embrionário e eclodibilidade dos ovos quando fornecido como única fonte de vitamina D.

Influência da nutrição “*in ovo*” no desenvolvimento do TGI do embrião

A redução da eclodibilidade e o aumento da incidência de doenças metabólicas estão relacionados com limitações nutricionais no período final da incubação e nas primeiras horas de vida do pinto (FERKET & UNI, 2006).

O saco vitelino é a primeira experiência digestiva da ave, sendo importante para a futura diferenciação dos enterócitos e desenvolvimento da mucosa intestinal (FREEMAN & VINCE, 1974). O trato gastrointestinal é um dos órgãos que mais cresce de tamanho nos últimos dias de incubação e passa de 1% do peso do embrião aos 18 dias de incubação para 3,5% no momento da eclosão. O rápido desenvolvimento dos vilos na fase final de incubação se relaciona diretamente com a ingestão do líquido amniótico nos últimos dias (16^o ao 17^o dia) de incubação (ROMANOFF, 1960; UNI et al., 2003; FERKET & UNI, 2006). Além, do líquido amniótico, outras substâncias presentes também são ingeridas. SKLAN (2001) demonstraram que o embrião possui enzimas digestivas o que torna possível a nutrição na fase pré-eclosão. Assim, o embrião pode consumir naturalmente nutrientes por via oral antes de nascer (FERKET & UNI, 2006). Entretanto, os embriões de aves têm limitada capacidade de digestão e de absorção de nutrientes no período final de incubação, visto o baixo nível de enzimas e transportadores de glicose e de sódio na mucosa intestinal (UNI et al., 2003). Embora a capacidade digestiva se desenvolva antes da eclosão, seu maior desenvolvimento ocorre no pinto após o consumo de alimento. Quanto mais cedo o intestino alcançar sua capacidade funcional, mais cedo o pinto pode utilizar os nutrientes da dieta (UNI et al., 2003). A adaptação à ingestão de alimentos depende do rápido desenvolvimento dos mecanismos de digestão e absorção, que por sua vez dependem diretamente do estímulo dado pela passagem de alimento no trato digestivo (VIEIRA & POPHAL, 2000).

A maturidade da mucosa intestinal é representada pelo aumento na produção e atividade das enzimas digestivas, dos transportadores de membrana e pelo desenvolvimento dos enterócitos das criptas (NISTAN et al., 1991). A maturidade intestinal pode ser influenciada por agentes tróficos, que estimulam o processo mitótico das células intestinais e estão relacionados com a ingestão e

digestão dos alimentos, bem como com as propriedades químicas dos nutrientes presentes no lúmen intestinal (UNI et al., 1998).

Conforme ressaltado por SKLAN (2001), para que esse crescimento se dê, é necessário que os precursores metabólicos, os nutrientes, estejam disponíveis. Nos últimos estágios de desenvolvimento embrionário, as origens dos nutrientes para o embrião são os componentes do vitelo e do albúmen, ricos em proteínas e lipídeos. Depois que o albúmen desaparece por completo e o vitelo começa a ser internalizado na cavidade abdominal do embrião, ao redor do 20^o dia de incubação (NOBLE & OGUNNYEMI, 1989), e os nutrientes contidos no saco vitelino são os únicos alimentos do embrião (GONZALEZ et al., 2009).

Algumas pesquisas defendem a teoria de que o crescimento da ave nos primeiros dias após a eclosão é dependente dos elementos nutritivos absorvidos do resíduo vitelino e o atraso no fornecimento de alimento pode prejudicar o desenvolvimento das aves. De acordo com GONZALES et al. (1999; 2000a,b; 2008a,b), o aporte nutritivo, via saco da gema, não é suficiente para suportar o extremo crescimento do pinto de corte. Esses nutrientes caem diretamente na via sanguínea ou no intestino, via divertículo de Meckel (NOY et al., 1996). O conteúdo do vitelo, no período imediato ao nascimento do pintainho, é usado para manutenção e desenvolvimento do trato gastrintestinal (NOY & SKLAN, 1999), preparando a ave para receber a alimentação exógena.

Suplementação *in ovo* com metabólitos vitamina D₃

A inoculação de 1,25(OH)₂D₃, 25(OH)D₃ e 24,25(OH)₂D₃ aos 14 dias em embriões deficientes aumentou a eclosão para valores acima de 80% e reverteu alterações ósseas observadas ao 17^o dia, comprovando a relação entre mineralização óssea e vitamina D (NARBAITZ et al., 1987; NARBAITZ & TSANG, 1989). Entretanto, a injeção de 1,25(OH)₂D₃ no saco da gema de embriões de 15 dias demonstrou que o excesso de vitamina D₃ também está relacionado às alterações embriológicas. A análise da tíbia dos embriões aos 17 dias evidenciou menor conteúdo de cinzas, menor comprimento e peso, e alterações histológicas em relação ao grupo controle (NARBAITZ & TOLNAI, 1978). TURNER et al. (1987) comprovaram *in vivo* a atividade da enzima 25(OH)D₃-1αhidroxilase em

embriões criados sem casca atingindo pico de atividade com 17 dias. Observaram que a concentração plasmática de cálcio coincidiu proporcionalmente com a atividade da enzima. Concluíram que em situações de deficiência de cálcio ocorre aumento da atividade enzimática a partir dos 12 dias e maior circulação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Um dos produtos testados com a finalidade de suplementar os pintainhos antes do nascimento com o intuito de prevenir problemas esqueléticos é o intermediário ativo da vitamina D_3 , 25-hidroxicolecalciferol $25(\text{OH})\text{D}_3$. A finalidade é fornecer uma fonte intermediária exógena *in ovo*, de utilização mais rápida que a vitamina D_3 , preparando o pintainho para o rápido crescimento ósseo. GONZÁLES et al. (2003) relataram que os resultados indicaram alta atividade metabólica do embrião estimulada pela presença do metabólito da vitamina D_3 , que influenciou o tempo do nascimento e o peso do pinto ao nascer. Do ponto de vista fisiológico, uma das funções da vitamina D_3 é a de controlar a absorção de cálcio pelo trato digestivo, induzindo a síntese da proteína carreadora de cálcio, quando necessário. Essa função estaria prejudicada no embrião, mas plenamente atendida no pintainho alimentado após a eclosão. Mas, é necessário ressaltar que a vitamina D_3 atua em cerca de 30 sistemas de células alvos, estimulando a síntese de RNAm e a indução de proteínas que influenciam a função celular (PIZAURO JR. et al., 2002). Por isso, pode-se esperar que a suplementação adequada dessa vitamina estimulasse o crescimento da ave na fase de extrema atividade metabólica, durante o crescimento embrionário e após a eclosão.

Problemas locomotores em frangos de corte

As desordens metabólicas, associadas à rápida taxa de crescimento do tecido muscular, são um dos problemas mais prevalentes na criação de frangos de corte. Somadas a estes fatores, e designadas por doenças de produção, acrescentam-se as fraturas durante a apanha e transporte, e a consequente mortalidade. Neste quadro, incluem-se a síndrome ascítica, a síndrome de morte súbita e as enfermidades do sistema locomotor (LEESON et al., 1995;

MENDONÇA Jr., 1990, 2000; GONZÁLES & MACARI, 2000; MACARI et al., 2002; JULIAN, 2004, 2005; NAGASCHIRO, 2007).

Com o melhoramento genético tem sido obtidas linhagens de rápido crescimento, cada vez mais precoces e com maior desenvolvimento muscular. No entanto, o desenvolvimento do tecido ósseo não tem acompanhado estes processos fisiológicos, aumentando a incidência de problemas de pernas e de fragilidade dos ossos. Estes problemas são preocupantes para a indústria avícola devido, principalmente, ao significativo índice de descarte no abatedouro em função de carcaças mal desenvolvidas, e por também causar perdas relativas ao desempenho das aves. Por isso, torna-se necessária a realização de estudos relacionados com o crescimento ósseo desses animais e, assim, entender o desenvolvimento do tecido ósseo (OLIVEIRA, 2006).

OVIEDO-RONDÓN (2008) explicou que a locomoção adequada significa avançar todo corpo sem dificuldades através do espaço, com o mínimo de gasto de energia mecânica e fisiológica. Ainda que o objetivo do caminhar seja a progressão na direção para frente, o movimento dos membros baseia-se na necessidade de manter um deslocamento simétrico, de baixa amplitude do centro de gravidade da cabeça e do tronco nas direções vertical e lateral. Qualquer claudicação indica alteração no padrão “normal” de marcha e aumentos no gasto energético ou reduções na atividade. E, como resposta, o animal irá adaptar-se, realizando substituições compensatórias na marcha para minimizar o gasto energético adicional. Contudo, nem sempre as adaptações para compensar as cargas de peso maior ou membros não saudáveis conseguem ter sucesso e podem resultar em problemas articulares e, finalmente, em claudicação.

Um dos grandes problemas que a indústria avícola enfrenta é a alta percentagem de deformidades do tecido ósseo, devido principalmente à seleção genética realizada para aumentar a taxa de crescimento dos animais (VELLEMAN, 2000). Dentre as áreas da produção, a avicultura de corte foi aquela em que ocorreram os maiores avanços tecnológicos (BECKER, 2006). Embora essas inovações tecnológicas atinjam o objetivo principal, por outro lado, o aumento da produtividade traz, em sua maior parte, uma grande preocupação ao bem-estar dos animais (MOLENTO & BOND, 2008).

PFEIFER & DALL'AQUA (2002) relataram que, em estudos realizados no Reino Unido, para cada 1% de aves com problemas locomotores evidentes, existe mais 2 a 3% de aves com problemas locomotores subclínicos. A claudicação de aves era anteriormente relatada em até mais de 30%, mas devido às técnicas de manejo e sanidade, os frangos de corte, atualmente, apresentam menos de 3% de claudicação clínica. No entanto, mesmo com uma baixa incidência de claudicação clínica, existe um impacto negativo sobre os parâmetros de desempenho final do lote, relacionado à viabilidade e conversão alimentar (POWELL & BITTAR FILHO, 2008). Outras pesquisas realizadas por KNOWLES et al. (2008) revelaram descarte de 3,3% de aves por problemas locomotores evidentes, e 27,6% com dificuldade de locomoção, relacionados diretamente com a taxa de crescimento.

De acordo com OVIEDO-RONDÓN (2008) nas avaliações da marcha em lotes de frangos de corte, normalmente, encontra-se 30 a 65% da população com padrões de marcha denominados "anormais" sem que haja problemas ósseos. A saúde das pernas nem sempre está ligada a transtornos ósseos. O sistema esquelético é constituído, também, por tendões, articulações e ligamentos. Além destas estruturas, os músculos também podem ser afetados por diversos fatores no início da vida e provocar claudicação e, mais tarde, interferir no desenvolvimento e na resistência dos ossos. Algumas vezes, é difícil diferenciar qual a causa primária: o transtorno ósseo ou a modificação do padrão de marcha. Para MENCH & SIEGEL (2004), a capacidade de andar das aves é considerada como um importante parâmetro de bem-estar.

Discondroplasia Tibial (DT) em frango de corte

As patologias do sistema esquelético se dividem em dois grandes grupos: artropatias e osteopatias. As artropatias se relacionam a processos que afetam a articulações. Algumas apresentam com quadros clínicos de artrite, podendo ser de etiologia infecciosa, tóxica e traumática, assim como degenerativa (artrose) ou neoplásica. As osteopatias se caracterizam por afetar o tecido ósseo laminar compacto e o trabecular esponjoso dos ossos, e têm origem em aspectos do tipo hereditário, metabólico, nutricional e infeccioso (LÓPEZ et al., 2008). As

osteodisplasias caracterizam-se por deformação estrutural do sistema músculo-esquelético, cuja origem é genética ou congênita, podendo ser classificadas como: osteopetrose, mielocitomatose, discondroplasia, *varus-valgus*, espondilolistese e necrose da cabeça do fêmur (CASAUBÓN, 2007). A fraqueza das pernas dos frangos foi identificada por alterações na placa de crescimento (raquitismo, discondroplasia e necrose da cabeça do fêmur) e recomendou-se a denominação de degeneração da cartilagem epifisária do fêmur (MENDONÇA Jr., 2000; GONZÁLES & MACARI, 2006). Dentre as patogenias descritas, a discondroplasia e a degeneração femural são mais prevalentes e atingem de 50 a 80% dos problemas de pernas dos lotes industriais de frangos comerciais (BAINS et al., 1998; MURAKAMI, 2000).

A ave com discondroplasia tibial (DT) apresenta andar cambaleante ou permanece imóvel, sinal de um processo doloroso. Com isso, deixa de se alimentar e beber água, com prejuízo do desenvolvimento corporal. Os primeiros sinais de DT no lote podem ser verificados a partir da segunda semana de criação, atingindo o pico de incidência na quarta semana. As aves que não são afetadas com severidade aparentemente se recuperam, mas o desempenho do lote no final do período de criação é prejudicado. Além do prejuízo no campo, distúrbios do desenvolvimento do esqueleto podem causar aumento de perdas no abate e processamento do frango de corte (GREGORY & WILKINS, 1992).

No caso da discondroplasia tibial (DT), a maturação dos condrócitos não ocorre devido à falta de vascularização. O que se observa é a presença de massa cartilaginosa, amorfa, avascular e de tamanho variado dependendo da severidade da lesão. A cartilagem anormal no disco epifisário é, portanto, a persistência da cartilagem pré-hipertrófica que não foi invadida pelos vasos sangüíneos da metáfise e que não sofre calcificação (GONZÁLES & MACARI, 2006). A DT em frangos pode também ser atribuída a assincronia no processo envolvido na diferenciação dos condrócitos, aumentando a camada de condrócitos pré-hipertróficos na cartilagem na tíbia proximal não calcificada e resistente a invasão vascular, que se estende distalmente na placa de crescimento da metáfise proximal da tíbia e ocasionalmente na metáfise distal e próximo do tarsometarso e proximal do fêmur e úmero. (TAKITA, 1998;

MENDONÇA Jr., 2000; PIZAURO Jr. et al., 2002; ALMEIDA PAZ et al., 2004; GONZÁLES & MACARI, 2006).

A incidência da DT aumentou acentuadamente, paralelamente ao melhoramento genético, à nutrição e ao manejo das linhagens modernas relacionadas ao ritmo de crescimento com maximização da massa muscular em curto tempo. Vários fatores estão envolvidos, mas a etiologia específica e a patogênese não são totalmente esclarecidas (OLIVEIRA, 2008). Inúmeras causas de deformidades no tecido ósseo em aves foram identificadas. Fatores nutricionais relacionados às toxemias, deficiências nutricionais, fatores genéticos; fatores patológicos; micotoxinas e práticas de manejo afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento normal do tecido ósseo (COOK, 2000).

Na tentativa de esclarecer esses mecanismos, alguns autores admitem que o estímulo mecânico, associado ao genótipo e às alterações de constituintes da dieta, podem interromper eventos envolvidos no processo de formação dessa lesão (EDWARDS JR., 2000; FARQUHARSON & JEFEREIS, 2000; PRAUL et al., 2000). A compreensão do mecanismo de ação e o papel das biomoléculas e dos minerais relacionados com a discondroplasia tibial poderão contribuir para o conhecimento de doenças do tecido ósseo e estabelecer estratégias de prevenção e tratamento (PIZAURO JR. et al., 2002). ALMEIDA PAZ et al. (2005), utilizando quatro diferentes técnicas, como: análise macroscópica, análise histológica, lixiscopia e densitometria radiográfica óptica, concluíram que, tanto a análise macroscópica quanto o uso de densidades radiográficas são eficientes para caracterizar o estado da placa de crescimento na epífise proximal da tíbia em frangos de corte. Entretanto, dependendo de seu objetivo, há diferentes indicações de utilização das técnicas. Na avaliação realizada em aviários de produção de frangos, visando a monitoria de índices de incidência, a metodologia mais utilizada é o exame macroscópico, realizando a análise do *Gait score* nas aves vivas e necropsia. No entanto, quando esta avaliação é realizada em reprodutores, visando o melhoramento genético e desenvolvimento de linhagens mais resistentes à incidência de discondroplasia tibial (DT), técnicas mais avançadas e precisas, como o exame radiológico associado ou não ao exame histopatológico da região afetada devem ser empregadas (GONZÁLES & MACARI, 2006; ALMEIDA PAZ, 2008).

Técnicas de mensuração dos problemas locomotores

“*Gait Score*” Avaliação da marcha das aves

O *Gait score* é a medida de avaliação da deficiência locomotora, em que é atribuída uma nota relacionada com a habilidade do frango de caminhar sobre uma superfície. O Sistema *Gait score* de Bristol foi desenvolvido por KESTIN et al. (1992). GARNER et al. (2002) apresentaram o sistema de escore modificado que avalia a ave dentro do aviário em local separado que permite a avaliação individual, devendo essa análise realizada por pelo menos duas pessoas. O escore zero significa ave normal; o escore 1, defeito discreto e indefinido; o escore 2, a ave apresenta defeito unilateral ou pernas assimétricas; o escore 3, a ave consegue, com dificuldade quando é tocada, dar 5 a 10 passos e senta; o escore 4, a ave consegue dar 1 a 2 passos e o escore 5, a ave não levanta mais. FRANÇA (2008) relatou que nos programas de certificações e de auditoria para bem-estar em frangos, as indústrias avícolas devem apresentar um plano de ação para reduzir escore superior a três, quando considerado os escores variando entre zero e cinco, conforme *Bristol Gait Score*.

Em campo, a metodologia comumente utilizada inclui o exame visual da capacidade de locomoção das aves e a avaliação macroscópica da região afetada, o que envolve o sacrifício da ave. Independente da técnica de mensuração utilizada, os escores, ou seja, as notas atribuídas à integridade óssea são sempre consideradas. A maioria dos pesquisadores utilizam escores dispostos dessa forma: escore zero corresponde a uma ave normal, escore um corresponde a uma ave com lesão óssea intermediária e escore dois corresponde a uma ave com grave incidência locomotora. A princípio, esta medida pode ser realizada em aviários, fazendo uma amostragem de 100 aves observando-se o deslocamento das mesmas em uma distância de 1,0 m. Uma ave normal, com escore zero, deve andar normalmente, sem claudicação e dar no mínimo 10 passos nesta distância; a ave com escore 1 anda com certa dificuldade e dá entre 6 e 10 passos ininterruptos nesta distância; a ave com escore 2 tem muita dificuldade para andar e caminha menos que 6 passos ininterruptos na distância de um metro (ALMEIDA PAZ, 2008).

Avaliação de deformidades *Valgus* e *Varus*

As deformidades *Valgus-Varus* são caracterizadas pelo desvio lateral (*valgus*) ou medial (*varus*) de uma ou das duas pernas (MENDONÇA JR., 2000; JULIAN, 2005; GONZALES & MENDONÇA JR, 2006). A avaliação de deformidades *valgus* e *varus* pode ser realizada em campo, assim como o Gait Score. Com esta medida, avalia-se a angulação das articulações da perna entre a tíbia e o dedo três nas pernas direitas e esquerdas.

O *valgus* e o *varus* são identificados, respectivamente, por um desvio externo e interno do tarsometatarso quando colocado em linha com o tibiotarso. Na deformidade *valgus*, observa-se angulação apresentando desvio lateral (para fora) e a deformidade *varus* quando a angulação apresenta desvio medial (para dentro). Normalmente, a ave pode apresentar um ou os dois tipos de deformação no mesmo animal. Este tipo de deformação da articulação intertársica é a mais comum em frangos e ocorre mais frequentemente em machos do que em fêmeas (LETERRIER & NYS, 1992). A alteração *varus* tem tendência a surgir na fase mais precoce da vida do animal (5 a 15 dias de idade) e unilateralmente. Por outro lado, a alteração *valgus* ocorre mais frequentemente na fase mais tardia da vida do animal (2 a 7 semanas de idade) e bilateralmente (LETERRIER & NYS, 1992; CRESPO & SHIVAPRASAD, 2003).

Pressupõe-se que a deformidade angular ocorra em virtude de uma anormalidade genética, principalmente em frangos melhorados para crescimento rápido. EUSÉBIO-BALCAZAR (2010) provaram que a linha genética utilizada, o manejo de arraçamento e a má nutrição das matrizes podem causar dificuldades locomotoras, piorar o *Gait Score* e o aparecimento de problemas de patas e de desenvolvimento ósseo. OVIEDO-RONDÓN et al. (2008) relataram a ocorrência em pintos neonatos, devido ao aumento da temperatura durante o final da incubação. De acordo com JULIAN (2005), a deformidade das pernas pode resultar do aumento desuniforme da placa de crescimento que pode também resultar em força de tração desproporcional da musculatura ou dos tendões nas articulações, provocar o desalinhamento e a curvatura dos ossos. Segundo SORENSEN (1992), a incidência da deformidade do tibiotarso está associada a dedos torcidos nas linhagens com pré-disposição para angulação do tibiotarso.

Avaliação macroscópica da placa de crescimento

Para a discondroplasia tibial, o exame macroscópico é baseado no acúmulo e espessamento de cartilagem na região da placa de crescimento da epífise. É a condição na qual a massa de cartilagem pouco vascularizada, torna a região desmineralizada, se estende distalmente da placa de crescimento na epífise proximal da tíbia e, ocasionalmente, na porção proximal do tarsometatarso, distal da tíbia, proximal do fêmur e úmero podendo resultar em deformidade e dificuldades locomotoras (MENDONÇA JR., 1990).

Esse exame é de fácil aplicação e pode ser realizado em campo, assim como o *Gait Score*. A identificação macroscópica da discondroplasia na ave morta pode ser feita seccionando-se longitudinalmente o osso e visualizando-se a placa de crescimento. Com esse método, é possível classificar o grau de severidade das lesões, atribuindo-se um escore de 0 a 3. O escore 0 significa ausência de lesão, sem cartilagem abaixo da epífise. No escore 1, pode-se observar a placa cartilaginosa com espessamento de aproximadamente 3 cm. Ossos que apresentem placas com largura até 6 cm são classificados como de escore 2. Placas de espessamento superior a 6 cm, atingindo quase toda a região epifisária do osso recebe escore 3. A observação macroscópica para avaliação da incidência e da severidade das lesões por DT pode ser inconclusiva, requerendo a histopatologia para distinguir algumas lesões de outras patologias da placa de crescimento (ALMEIDA PAZ, 2008).

ALMEIDA PAZ (2008) relatou que conhecer os problemas locomotores é muito importante para a avicultura mundial pois a dificuldade de locomoção está relacionada às perdas econômicas mensuráveis, como condenações e desclassificações de carcaças, devido, principalmente, às fraturas e lesões na pele. As perdas de queda no desempenho por atraso no crescimento das aves com claudicação são também notadas.

Avaliação histológica da placa de crescimento

Os exames histológicos consistem na avaliação da estrutura, do arranjo e das condições das células ósseas na placa de crescimento. A

discondroplasia é identificada como o acúmulo de cartilagem avascular, composta de condrócitos não maduros, pequenas lacunas ovóides com quantidade maior de matriz que a cartilagem hipertrófica (ALMEIDA PAZ, 2008). Segundo metodologia descrita por TAKITA (1998), a caracterização histológica da severidade da DT recebe o seguinte escore: zero= placa de crescimento normal; 1 = placa de crescimento com banda larga e distinta de condrócitos pré-hipertróficos; escores 2 = placas de crescimento apresentando mudanças degenerativas no citoplasma e núcleos dos condrócitos.

Avaliação da resistência e densidade mineral óssea

O osso saudável, além de permitir boa capacidade de locomoção deve ter, também, força suficiente para resistir ao processamento do abatedouro, especialmente a operação de desossa (OVIEDO-RONDÓN 2008a; 2008b; 2008c). A resistência e força óssea não estão somente relacionadas com o conteúdo de cálcio e fósforo retido nos ossos. O osso é constituído por células vivas envolvidas numa matriz mineralizada, rica em colágeno. A matriz mineral é constituída por cálcio e fósforo, constituindo cerca de 60 a 70% do peso ósseo. Esta matriz inorgânica proporciona ao osso rigidez e resistência à compressão. Por outro lado a matriz orgânica de colágeno suporta a tensão e torção aplicada ao osso (OVIEDO-RONDÓN et al., 2006).

A densidade mineral óssea é considerada indicador de qualidade óssea. Entretanto, o estado do osso não pode ser descrito apenas por uma propriedade. Estudos recentes têm demonstrado que a mineralização óssea não reflete a força de quebra e nem as propriedades mecânicas dos ossos. As ligações e o conteúdo de colágeno ocupam papel importante na resistência óssea. Se o osso for muito mineralizado vai possuir boa rigidez, mas ao mesmo tempo vai ser facilmente quebrável quando sujeito a tensão. Por outro lado, ossos pouco mineralizados vão ser menos rígidos, mas mais maleáveis não quebrando com tanta facilidade (OVIEDO-RONDÓN et al., 2006).

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA PAZ, I.C.L.; MENDES, A.A.; TAKITA, T.S.; VULCANO, L.C.; GUERRA, P.C.; WESCHSLER, F.S.; GARCIA, R.G. Tibial dyschondroplasia and bone mineral density. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.4, p.207-212, 2004.
2. ALMEIDA, PAZ, I.C.L.; MENDES, A.A.; TAKITA, T.S.; VULCANO, L.C.; GUERRA, P.C.; WESCHSLER, F.S.; GARCIA, R.G.; TAKAHASHI, S.E.; MOREIRA, J.; PELÍCIA, K.; KOMIYAMA, C.M.; QUINTERIO, R.R. Comparision of techniques of tibial dyscondroplasia assessment in broiler chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.7, n.1, p.27-31, 2005.
3. ALMEIDA PAZ, I.C.L. Problemas Locomotores e Técnicas de Mensuração. SIMPOSIO SOBRE BEM-ESTAR DE FRANGOS E PERUS, 2008, Santos (SP). **Anais...** Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. São Paulo: Facta, 2008. p.57-68.
4. AMEENUDDIN, S.; De LUCA, H.F.; IKEKAWA, N.; KOBAYASHI, Y. 24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3: is it required for embryonic development in chicks. **Science**, v.217, p. 451-452, 1982.
5. ATENCIO, A.; EDWARDS, H.M.; PESTI, G.M.; WARE, G.O. The vitamin requirement of broiler breeders. **Poultry Science**, v.85, p. 674-692, 2006.
6. ATENCIO, A.; PESTI, G.M.; EDWARDS, JR. H.M. Twenty-five hydroxycholecalciferol as a cholecalciferol substitute in broiler breeder hen diets and its effect on the performance and general health of the progeny. **Poultry Science**, v.84, p.1277-1285, 2005.
7. BAINS, B.S.; BRAKE, J.T.; PARDUE, S.L. Reducing leg weakness in commercial broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 14, n 1, p. 24-27, 1998.
8. BAKER, D.H.; BIEHL, R.R.; EMMERT, J.L. Vitamin D3 requirement of young chicks receiving diets varying in calcium and available phosphorus. **British Poultry Science**, v.39, p.413-417, 1998.
9. BAR, A.; SHARVIT, M.; NOFF, D.; EDELSTEIN, S.; HURWITZ, S. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. **Journal of Nutrition**, v.110, p. 1930-1934, 1980.
10. BECKER, B.G. Bem-estar animal em avicultura. In: VII SIMPOSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2006. Chapeco (SC). **Anais...** Conferência APINCO 2006 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Santa Catarina: Facta, 2006.

11. BELL, N.B. Vitamin D-Endocrine system. **The Journal of Clinical Investigation**, v.76, p.1-6, 1985.
12. BETHKE, R.M.; RECORD, P.R.; WILDER, O.H.; WILDER, C.H. Effect of different sources of vitamin D on the laying bird II. Storage of vitamin D in the egg and chick and mineral composition of the mature embryo. **Poultry Science**, v.15, p.336-344, 1936.
13. CARRADINO, R.A.; WASSERMAN, R.H.; PUBOLS, M.H.; CHANG, S.I. Vitamin D₃ induction of a calcium-binding protein in the uterus of the laying fowl. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 378-380, 1968.
14. CASAUBÓN, H.T. Alteraciones del aparato esquelético de las aves industriales. XI Jornadas Médico Avícolas. **Anais...** Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 2007.
15. COHEN, A.; BAR, A.; EISNER, U.; HURWITZ, S. Calcium absorption, calcium-binding protein, and egg shell quality in Laying hens fed hydroxylated vitamin D derivatives. **Poultry Science**, v. 57, p.1646 -1651, 1978.
16. COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: Introduction. **Poultry Science**. v.79, p.982-984, 2000.
17. CRESPO, R.; SHIVAPRASAD, H. L. Developmental, metabolic and other noninfectious disorders. Chapter 31. In: SAIF, Y. M. et al. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11. Ed. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists, Iowa State Press, 2003, p. 1055-1102.
18. EDWARDS, H. M. Jr. Nutrition and skeletal problems in poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1018-1023, 2000.
19. EUSEBIO-BALCAZAR, P. "Effect of Breeder Nutrition and Feeding Program during Rearing and Production on Broiler Leg Health" **Master Science Thesis of North Carolina State University**, 2010.
20. FARQUHARSON, C.; JEFFERIES, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: The development of tibial Dyscondroplasia. **Poultry Science**, v. 79, p. 994-1004, 2000.
21. FERKET, P., UNI, Z. Early feeding – *in ovo* feeding enhances early gut development and digestive capacity of poultry. In: CONFERENCE EUROPEAN POULTRY 12th, Verona. **Anais...** Conference European Poultry, 2006 (CD-ROM).

22. FERKET, P, DE OLIVEIRA, J., GHANE, A., UNI, Z. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 118, 2005.
23. FRANÇA, J. M. SIMPOSIO SOBRE BEM-ESTAR DE FRANGOS E PERUS, 2008, Santos (SP). **Anais...** Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. São Paulo: Facta, 2008, p.129-134.
24. FRASER, D.R.; EMTAGE, J.S. Vitamin D in the avian egg. Its molecular identity and mechanism of incorporation into yolk. **Biochemistry Journal**, v.160, p. 671-682, 1976.
25. FREEMAN, B. M., VINCE, M. A. **Development of the Avian Embryo**. A Behavioural and Physiological Study, Chapman and Hall, London, 1974.
26. GARNER, J.P.; FALCONE, C.; WAKENELL, P.; MARTIN, M.; MENCH, J.A. Reliability and validity of a modified gait scoring system and its use in assessing tibial dischondroplasia in broilers. **British Poultry Science**, v. 43, p. 355-362, 2002.
27. GONZALES E MENDOÇA JR. CX. Problemas locomotores em frangos de corte. SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA 7. Chapecó, SC – Brasil. **Anais...**, p.79-94, 2006.
28. GONZALES, E., KONDO, N., SALDANHA, E.S.P.B., PIZZOLANTE, C.C., DECUYPERE, E. Performance of broiler chickens subjected to neonatal fast. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 21, 2000, Montreal, Canadá. **Anais ...** (Compact disk): Montreal: WPA, 2000b.
29. GONZALES, E., LEANDRO, N.S.M., VAROLI JR., J.C., TAKITA, T.S., LODDI, M.M. O tempo de jejum do neonato e a restrição alimentar quantitativa influenciando a produtividade de frangos de corte na idade de abate. In: CONFERÊNCIA APINCO' 2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Suplemento 2, Campinas: FACTA, 2000a.
30. GONZALES, E.; OLIVEIRA, A.S.C.; CRUZ, C.P.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; BRITO, A.B. *In ovo* supplementation of 25 (OH)D₃ to broiler embryos. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003, Lillehammer. **Proceedings...** Lillehammer: WPSA, 2003. p. 72-74.
31. GONZALES, E., LEANDRO, NSM, DAHLKE, F, BRITO, AB, CRUZ, CP The importance of endogenous nutrition of chicks from divergent strains for growing tested by deutectomy. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.10, p.139 - 141, 2008b.

32. GONZALES, E., MACARI, M., PAZ, ICLA. Cap. 9. Enfermidades metabólicas em frangos de corte. In: BERCHIERI JR., A., SILVA, EM, DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZA, MAF. (ed.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009. p.977-998.
33. GONZALES, E., MOGYCA, N.S.S., VAROLI JR., J.C., TAKITA, T.S., LODDI, M.M. O tempo de jejum do neonato afeta o desempenho do frango de corte na idade de abate. In: CONFERÊNCIA APINCO' 99 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Suplemento, Campinas: FACTA, 1999. p.12.
34. GONZALES, E.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Editora Facta. Campinas, SP, 2000.
35. GONZALES, E.; MACARI, M. Problemas Locomotores em Frangos de Corte. SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, VII, 2006, Chapecó-SC. **Anais...** Chapecó, p. 79-92, 2006.
36. GONZALES, E.; STRINGHINI, JH; DAHLKE, F.; CUNHA, WCP; XAVIER, SAG. Productive consequences of fasting neonatal chicks of different genetic constitutions for growing. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.10, p.209 - 212, 2008a.
37. GOODSON-WILLIAMS, G.; ROLAND, D.A.; MCQUIRE, J.A. Eggshell pimpling in young hens as influenced by dietary vitamin D3. **Poultry Science**, v.66, p.1980-1986, 1987.
38. GREGORY, N. G.; WILKINS, L. J. Skeletal damage and bone defects during catching and processing. Chapter 17. In: WHITEHEAD, C. C.(Ed.). *Bone biology skeletal disorders in poultry*. **Poultry Science** Symposium. Carfax publishing company, n. 23, p313-328, 1992.
39. HART, L.E.; SCHNOES, H. K.; DeLUCA, H.F. Studies on the role of 1,25-dihydroxyvitamin D in chick embryonic development. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.250, p.426-434, 1986.
40. HEANEY, R.P.; BARGER-LUX, M.J.; DOWELL, M.S.; CHEN, T.C.; HOLICK, M.F. Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.4111-4116, 1997.
41. JULIAN, R. J. Rapid growth problems: Ascites and skeletal deformities in broilers. **Poultry Science**, v.77, p.1773-1780, 2004.
42. JULIAN, R. Patologias ósseas em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...** Volume 2, Campinas: FACTA, 2005. p. 107-122.

43. KESTIN, S.C.; KNOWLES, T.G. TINCH, A.E.; GREGORY, N.G. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. **Veterinary Record**, v.131, p. 190-194, 1992.
44. KLASING, K. C. **Comparative avian nutrition**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 350.
45. KNOWLES, T. G; KESTIN, S.C.; HASLAM, S.M.; BROWN, S.N.; GREEN, L.E. Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. **Journal of Bone**, p. 1545, 2008.
46. LEESON, S., G. DIAZ; SUMMERS, J. D. **Skeletal disorders**. In: Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. Edit: S. Leeson, G. Diaz and J.D. Summers, University Books, Guelph. p, 124-189, 1995.
47. LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Commercial poultry nutrition**. 4th ed. Guelph, Ontario: University of Guelph. Department of Animal & Poultry Science, 2001. 587p.
48. LEITÃO, R. A.; LEANDRO, N. S. M.; PEDROSO, A. A.; STRINGHINI, J. H.; OLIVEIRA NETO, G. R.; CAFÉ, M. B. Efeito da suplementação de glicose in ovo sobre o desempenho inicial de pintos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, p.69, 2005.
49. LÓPEZ, C.C.; MENOCA, J. A.; GONZÁLEZ, E. A. Síndromes Metabólicas em Frangos de Corte. SIMPOSIO SOBRE BEM-ESTAR DE FRANGOS E PERUS, 2008, Santos (SP). **Anais...** Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. São Paulo: Facta, 2008. p.263-278.
50. MACARI M; FURLAN RL; GONZALES E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 375p.
51. MATTILA, P.; LEHIKONEN, K.; KIISKINEM, T.; PIRONEN, V. Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.4089-4092, 1999.
52. McDOWELL, L.R. **Vitamins in animal nutrition**. Comparative aspects to human nutrition. New York, Academic Press, 1989. 486p.
53. MENCH, J.A.; SIEGEL, P.B. **Poultry**. South Dakota State University, 2004. Disponível em: < <http://ars.sdstate.edu/animaliss/poultry.html> >
54. MENDONÇA, JR CX. Deformidades das pernas em frangos de corte. CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS; **Anais...** Campinas: Facta, 1990, p.29-41.
55. MENDONÇA, JR CX. Enfermidades do Sistema Locomotor. In:

- BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: Facta, 2000, p.29-36.
- 56.MOLENTO, C.F.M., BOND, G.B. Produção e bem-estar animal. **Revista Ciência Veterinária dos trópicos – Suplemento nº1**. Recife (PE): Facta. v.11, p. 36-42, 2008.
- 57.MURAKAMI, A.E. Balanço eletrolítico da dieta e sua influência sobre o desenvolvimento dos ossos de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas, 2000. p. 33-61.
- 58.NABER, E. C.; SQUIRES, M. W. Vitamine profiles of eggs as indicators of nutritional status in the laying hen: diet to egg transfer and commercial flock survey. **Poultry Science**, v. 72, n. 6, p. 1046-1053, 1993.
- 59.NAGASCHIRO, C. **Problemas Esqueléticos en aves: causas e impacto sobre a salud y el rendimiento productivo**. AMEVEA, Bolivia, ago, 2007.
- 60.NARBAITZ, R.; FRAGISKOS, B. Hypervitaminosis D in the chick embryo: comparative study on the activity of various vitamin D3 metabolites. **Calcified Tissue International**, Ottawa, Ontario, v.36, p. 392-400, 1984.
- 61.NARBAITZ, R.; STUMPF, W.; SAR, M.; DeLUCA, H.F. Auto radiographic demonstration of target cells for 1,25-dihydroxycholecalciferol in the chick embryo chorioallantoic membrane, duodenum, and parathyroid glands. **General and Comparative Endocrinology**, Madison, Wisconsin, v.42, p.0283- 289,1980.
- 62.NARBAITZ, R.; TOLNAY, S. Effects produced by the administration of high doses of 1,25-dihydroxycholecalciferol to the chick embryo. **Calcified Tissue International**, Ottawa, Ontario, v. 26, p. 221-226, 1978.
- 63.NARBAITZ, R.; TSANG, C.P.W. Vitamin deficiency in the chick embryo: effects on prehatching motility and on the growth and differentiation of bones, muscles and parathyroid glands. **Calcified Tissue International**, v.44, p.348-355, 1989.
- 64.NARBAITZ, R.; TSANG, C.P.W.; GRUNDER, A.A. Effects of vitamin D deficiency in the chicken embryo. **Calcified Tissue International**, v.40, p.109-113, 1987.
- 65.NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4.ed. Basingstoke, Hampshire: Palgrave Macmillan, 2005. 1119 p.

66. NISTAN, Z., DUNNINGTON, E. A., SIEGEL, P. B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. **Poultry Science**, v.70, n. 10, p. 2040-2048, 1991.
67. NOBLE, R.C., OGUNYEMI, D. Lipid changes in the residual yolk and liver of the chick immediately after hatching. **Biology of the Neonate**, v.56, p.226-236, 1989.
68. NORMAN, A. Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response. **American Journal Clinical Nutrition**, v.51, p.290-300, 1990.
69. NORMAN, A. Studies on the vitamin D endocrine system in the avian. **Journal of Nutrition**, v.117, p.797-807, 1987.
70. NORMAN, A.; HURWITZ, S. The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. **Journal of Nutrition**, v.123, p.310-316, 1993.
71. NOY, Y., SKLAN, D. Energy utilization in the newly hatched chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1750-1756, 1999.
72. NOY, Y., UNI, Z., SKLAN, D. Utilisation of yolk in the newly hatched chick. **British Poultry Science**, v. 37, p.987-995, 1996.
73. OLIVEIRA, A. F. G. **Estudo do padrão de crescimento ósseo em frangos de corte de diferentes grupos genéticos criados em duas densidades populacionais**. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá – PR, 2006, 73f, 2006.
74. OLIVEIRA, R. P. **Avaliação do desenvolvimento da discondroplasia tibial em frangos de corte submetidos com 25-hidroxicalciferol – Características Ultraestruturais**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP. 2008, 85f, 2008.
75. OVIEDO-RONDÓN E, FERKET P, HAVESTEIN G “Understanding long bone development in broilers and turkeys” **Avian and Poultry Biology Reviews**, v.17, n.3, p.77-88, 2006.
76. OVIEDO-RODÓN, E. Fatores predisponentes que afetam a capacidade de andar, **Suplemento** - Nutra Notícias DSM NUTRITIONAL PRODUCTS - Bem estar, fev, 2008. Latin American Feed Industry Disponível em: america-latina.dnp@dsm.com , 2008c.
77. OVIEDO-RODÓN, E.; WINELAND, M.J.; SMALL, J.; CURTCHIN, H.; McELROY, A.; BARRI, A.; MARTINS, S. Effect of early and late incubation temperatures and chick transportation conditions on bone development

- and leg health in Cobb-500 broilers. **Proceedings...** World Poultry Science Meeting, 2008.
- 78.OVIEDO-RONDÓN, E. “ Factores que Afectam a Capacidade de Andar em Perus e Frangos” **Aves e Ovos**, p. 14-23, 2008b.
- 79.OVIEDO-RONDÓN, E. “Leg Health in Large Broilers” **NC Broiler Supervisors’ Short Course**, 2008a.
- 80.PEDROSA, M.A.C.; CASTRO. M.L. Papel da vitamina D na função neuromuscular. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n.4, 2005.
- 81.PFEIFFER, D.J.; DALL’AQUA. An Analysis of an industry national broiler chicken leg weakness study in united Kingdom. **Epidemiology Division of the Royal Veterinary College University of London**, 2002.
- 82.PIZAURO JR, J. M; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia Tibial: Mecanismos de Lesão e Controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 169-185, 2002.
- 83.POWELL, K.C.; BITTAR FILHO, I. Atualidades em problemas locomotores em frango de corte. SIMPOSIO SOBRE BEM-ESTAR DE FRANGOS E PERUS, 2008, Santos (SP). **Anais...** Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. São Paulo: Facta, 2008. p. 187-196.
- 84.PRAUL, C. A.; FORD, B. C.; GAY, C. V. Gene expression and tibial dyschondroplasia. **Poultry Science**, v.79, p.1009-1013, 2000.
- 85.RAMANOFF, A. L. **Biochemistry of the avian embryo. A quantitative analysis of prenatal development**. New York : Wiley & Sons, 1967.
- 86.ROMANOFF, A. L. **The Avian Embryo: Structural and Functional Development**. The McMillan Company, New York, NY, 1960. 1305p.
- 87.ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. **Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos: tabelas brasileiras**. 2ª Ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.
- 88.SANTOS, T. T. **Influência da inoculação de ingredientes intra ovo em aspectos produtivos e morfológicos de frangos de corte oriundos de distintos pesos de ovos**. Pirassununga (SP): USP, 2007. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007.
- 89.SELL, JERRY L. **Nutrient Requirements of Poultry**. Revised Edition. National Academy Press, 176p, 1994.

90. SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.57, n.4, p.416-428, 2001.
91. SOARES, JR. J.H.; KERR, J.M.; GRAY, R.W. 25-hydroxycholecalciferol in poultry nutrition. **Poultry Science**, v.74, p.1919-1934, 1995.
92. SORENSEN, P. Genetics of leg disorders. Chapter 12. In: WHITEHEAD, C. C. (Ed.). Bone biology skeletal disorders in poultry. **Poultry Science Symposium**. Carfax Publishing Company, n. 23, p. 213- 230, 1992.
93. SUDA, T., SHINKI, T., TAKAHASHI, N. The role of vitamin D in bone and intestinal cell differentiation. **Annual Review Nutrition**, v.10, p.195-211, 1990.
94. SUNDE, M.L.; TURK, C.M.; DeLUCA, H.F. The essentiality of vitamin D metabolites for embryonic chick development. **Science**, v.20, n.4345, p.1067-1069, 1978.
95. TAKITA, T. S. **Efeito do genótipo, do ambiente e da interação genótipo x ambiente na incidência de discondroplasia tibial em frangos de corte machos**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 1998, 43p, 1998.
96. TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and betahydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v.83, n.12, p.2023-2028, 2004.
97. TUAN, R.S.; CARSON, M.J.; JOZEFIAK, J.A.; KNOWLES, K.A. SHOTWELL, B.A. Calcium-transport function of the chick embryonic chorioallantoic membrane. II functional involvement of calcium-binding protein, Ca²⁺-Atpase and carbonic anhydrase. **Journal Cell Science**, v.82, p. 85-97, 1986.
98. TURNER, R.T.; JAMES, G.S.; BELL, N. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism in chick embryo. **American Journal Physiology**, v.252, p.38-43, 1987.
99. UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n. 11, p.101-111, 2004.
100. UNI, Z., GANOT, S., SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p.75-82, 1998.
101. UNI, Z., TAKO, E. GAL-GARBER, O., SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late -term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003.

102. VAIANO, S.A, AZUOLAS, J.K., PARKINSON, G.B., SCOTT, P.C. Serum calcium, phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol, and endochondral ossification defects in commercial broiler chickens. **Poultry Science**, v.73, n.8, p.1296-1305, 1994.
103. VELLEMAN, S.G. The role of the extracellular matrix in skeletal development. **Poultry Science**, v.79, p.985-989, 2000.
104. VIEIRA, S.L, POPHAL, S. Nutrição pós-eclosão de frangos de corte. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, v. 2, n.3, p.189-199, 2000.
105. VIEIRA, S.L; POPHAL, S. Nutrição do embrião. **Ave World**, v.18, n.3, p. 66-71, 2005.
106. WARD, N.E. Consideration of vitamin D3 absorption may be needed. **Feedstuffs**, v.76, n.4, 2004.
107. WILLIAMS, C. J. Princípios fundamentais e fatores fisiológicos da injeção in ovo. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: FACTA, 2004. p. 171-177.
108. WILSON, H. R. Effects of Maternal Nutrition on Hatchability. **Poultry Science**, v. 76, p. 134-143, 1997.
109. YARGER, J. G.; QUARLES, C. L.; HOLLIS, B. W.; GRAY, R. W. Safety of 25-hydroxycholecalciferol in poultry rations. **Poultry Science**, v. 74, n. 9, p.1437–1446, 1995.

CAPÍTULO 2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL *IN OVO* PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO: Objetivou-se avaliar a qualidade de eclosão para frangos de corte machos e fêmeas, originados de embriões suplementados *in ovo* com 25-D-hidroxi-colecalciferol, 25(OH)D₃ aos 18 dias de desenvolvimento embrionário. A incubação foi conduzida no incubatório São Salvador Alimentos S/A em máquina de estágio múltiplo, utilizando-se 400 ovos de matrizes Cobb 500® com 35 semanas de idade. Na transferência e na vacinação, os ovos com embriões viáveis foram inoculados com a solução controle e com 25(OH)D₃ incorporados na vacina. A compatibilidade do produto foi avaliada anteriormente e as dosagens utilizadas foram zero e 1,250µg de 25(OH)D₃ equivalentes a 50 UI de vitamina D₃. Os ovos foram acondicionados em sacos de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato. O nascimento foi acompanhado a cada duas horas, avaliando-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade, a mortalidade embrionária (percentual, período de ocorrência e causas aparentes), os pesos e comprimentos dos neonatos e a qualidade do pintainho. O acompanhamento individual do peso das aves foi realizado até sete dias de idade. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 2 x 2 (dois inóculos - placebo e 25(OH)D₃ e dois sexos). Os dados foram submetidos à análise de variância e foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson entre as médias de interesse. Não houve diferença significativa na eclodibilidade entre os tratamentos. As fêmeas apresentaram maior comprimento corporal e menor peso aos sete dias do que os machos. Houve correlação positiva entre o peso aos sete dias com o comprimento corporal, o peso do ovo, peso ao nascimento e peso ao alojamento para ambos os sexos. Tanto o comprimento corporal quanto o peso aos sete dias apresentaram correlação negativa com o tempo de nascimento. A qualidade dos pintainhos e o peso aos sete dias foram piores para o grupo inoculado com 25(OH)D₃. Conclui-se que é possível inocular o metabólito 25(OH)D₃ *in ovo*, sem prejuízo ao processo de vacinação e transferência dos ovos embrionados. Entretanto, o metabólito 25(OH)D₃ não foi efetivo na melhoria da qualidade dos pintainhos incubados em máquina de estágio múltiplo.

Palavras-chave: embrião, frango de corte, suplementação *in ovo*, vitamina D.

CHAPTER 2 – VALIDATION OF THE METHOD OF INOCULATION OF 25-HIDROXI-CHOLECALCIFEROL *IN OVO* FOR BROILER

ABSTRACT: This work was carried out to evaluate the quality of newborn chicks, males and females, hatched from embryos supplemented *in ovo* with 25-D-hydroxy-colecalciferol, 25(OH)D₃ at 18 days of embryo development. Chicks were hatched in multiple stage hatcheries with 400 eggs 35-week old Cobb 500® breeder eggs. During the transference and vaccination, fertile and viable eggs were inoculated with placebo or 25(OH)D₃ solution incorporated in the vaccine and the compatibility of the mix were tested with two dosis, zero and 1,250µg of 25(OH)D₃ equivalent to 50 UI of vitamin D₃. Eggs were placed in air-permeable bags in order to discriminate the chicks and eggshell components. The hatch was checked each two hours to evaluate incubation period (hours), hatchability, embryo mortality (perceptual, period and apparent causes), weight and length and quality score of the newborn chicks. Chicks were individually weighed until seven days of age and experiment was conducted in a completely randomized design in a 2 x 2 factorial arrangement (25(OH)D₃ levels and sex). Data was analyzed as ANOVA and calculated the Pearson correlation coefficients for mains variable averages. No difference was observed in hatchability between treatments. Females showed higher body length and lower body weight at seven days of age compared to males. No positive correlation occurred between body weight at seven days of age for body length, egg weight, weight at hatch and weight at housing for both sexes. Body length and body weight at seven days of age showed negative correlation to time of hatch. Chick quality and weight at seven days of age showed worst results for the group inoculated with 25(OH)D₃ compared to placebo. It is possible to inoculate the metabolite 25(OH)D₃ *in ovo*, without prejudice to the vaccination process and transfer of embryonated eggs. It is possible to conclude that the metabolite 25(OH)D₃ was not effective to increase chick quality when eggs were hatched in multiple stage machines.

Key words: broiler, embryo, *in ovo* supplementation, vitamin D.

1. INTRODUÇÃO

A nutrição *in ovo* é uma prática recente que consiste na inoculação de nutrientes no líquido amniótico com a finalidade de melhorar o estado nutricional do embrião (LEITÃO et al., 2005), aumentando a eficiência digestiva, reduzindo a mortalidade e a morbidez pós-eclosão e contribuindo para melhorar a resposta imunológica do animal (UNI & FERKET, 2004).

A suplementação *in ovo* de nutrientes, pode fornecer elementos essenciais para diminuir a mortalidade embrionária tardia e permitir o desenvolvimento normal do tecido ósseo cujo crescimento é prioritário no período neonatal do pintainho. Com estrutura óssea mais resistente, o pintainho teria condições de suportar o intenso crescimento muscular que segue o pico de crescimento do tecido ósseo, prevenindo o aparecimento de problemas relacionados com o esqueleto, melhorando o desempenho do frango (GONZALES et al., 2009).

De acordo com KORVER (2005) e KASIM et al. (2006), a vitamina D está diretamente relacionada com a incidência de problemas ósseos, e envolvida em muitos processos fisiológicos, incluindo cálcio e fósforo, mineralização, absorção e mobilização óssea.

Para exercer sua função no organismo animal, é necessário que o colecalciferol (vitamina D₃) passe por dois processos metabólicos, no fígado onde é transformada em 25(OH)D₃ e posteriormente no rim, transformando-se em 1,25-(OH)₂D₃, metabolicamente ativo nos processos fisiológicos do animal (PIZAURO JR., 2002).

O metabolito 25(OH)D₃ é mais ativo do que a vitamina D₃ e proporciona maior eficiência na utilização desta vitamina (FRITTS & WALDROUP, 2003). A taxa de absorção de 25(OH)D₃ é cerca de 20% maior do que a vitamina D₃ e 1,25(OH)₂D₃ (APPLEGATE et al., 2003).

O uso do metabolito 25(OH)D₃ como aditivo alimentar para frangos de corte é realizado com o objetivo de melhorar o desempenho à idade de abate para diminuir a incidência de discondroplasia tibial (DT) (WEBER, 2003).

O embrião de frango de corte apresenta limitada quantidade de nutrientes para seu desenvolvimento. O fornecimento de nutrientes *in ovo* pode

funcionar como fonte extra de nutrientes ao embrião, resultando em maior peso ao nascimento, maior viabilidade e melhor vigor, entre outras características. Para tanto, é necessário definir quais nutrientes utilizar, o período e local da administração e, principalmente, a forma de fazer esta administração (SANTOS, 2007).

Para tanto, a uniformidade do desenvolvimento embrionário é muito importante, ao injetar nutrientes *in ovo*. Após a eclosão as aves apresentam funções digestivas limitadas, o que diminui a disponibilidade de nutrientes, e a absorção do fluído amniótico a partir do 17º dia de incubação torna-se essencial para o desenvolvimento do embrião (UNI et al., 2003).

Segundo OVIEDO-RONDÓN (2008), manter a uniformidade do desenvolvimento embrionário durante a incubação é fator crítico, pois condições ambientais desfavoráveis e/ou heterogêneas provocam stress ambiental que afeta o desenvolvimento ósseo e a qualidade das pernas.

O tipo de incubadora de carga única e múltipla foi recentemente avaliado por OVIEDO-RONDÓN et al (2009) constatando a relação entre o tipo de máquina de estágio múltiplo e o aumento do problema de pernas, principalmente nos machos.

Com este trabalho, objetivou-se avaliar a inoculação *in ovo* de 25(OH)D₃ aos 18 dias de desenvolvimento embrionário provenientes de ovos incubados em máquina de estágio múltiplo e seus efeitos nos índices de eclodibilidade, na mortalidade embrionária, na qualidade do neonato e do pintainho até sete dias de idade.

Como principal fato, pretendeu-se validar o método de suplementação do metabólito 25(OH)D₃ utilizando vacinadora automática industrial no momento da vacinação e da transferência dos ovos da incubadora para o nascedouro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização

A incubação experimental foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A, localizado em Itaberaí-GO. Posteriormente, os neonatos identificados individualmente foram encaminhados para o aviário experimental do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás – UFG em Goiânia-GO e criados por sete dias. O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº 014/12, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Instalações, equipamentos e manejo experimental no incubatório

A incubação foi realizada em máquina de estágio múltiplo, utilizando 400 ovos para análise e previamente selecionados por peso antes da incubação, obtidos de matrizes pesadas com 35 semanas de idade da linhagem Cobb 500®. Nessa pesquisa, não foi levado em consideração o aporte de vitamina D₃ e seus metabólitos proveniente da matriz.

No momento da transferência e da vacinação no 18º dia, os ovos com embriões viáveis foram inoculados com solução vacinal sem o metabólito da vitamina D₃ e com 1,250 µg de 25(OH)D₃, correspondente a zero e 50 UI de vitamina D₃, respectivamente. A compatibilidade do produto com a solução vacinal foi avaliada anteriormente, constatando-se a titulação e a integridade da partícula viral na presença do metabólito da vitamina D₃. A titulação da vacina de Marek e Gumboro diluída com adição da substância 25(OH)D₃ não apresentaram resultados significativos entre os diferentes tempos (T0, T30 e T60) de suspensão da vacina. A adição do produto 25(OH)D₃ não interferiu na titulação quando comparado com o grupo controle negativo seguindo a técnica de titulação em cultivo celular de fibroblasto de embriões de galinhas utilizada pelo controle de qualidade do laboratório da Merial Saúde Animal.

Após a inoculação, os ovos foram acondicionados em sacos de filó, ar-permeável, para identificar cada neonato ao seu tratamento. Para cada ovo, o período de incubação foi definido como o tempo entre a colocação em condições de incubação artificial e o efetivo nascimento. Concluído o nascimento, os pintainhos foram retirados do nascedouro e classificados. Antes da classificação dos neonatos os ovos não eclodidos foram submetidos à análise de embriodiagnóstico. Por meio do embriodiagnóstico foi possível obter o total dos ovos inférteis e por diferença entre este e o número total de ovos incubados e eclodidos, verificou-se o valor percentual de eclodibilidade dos ovos férteis, isto é, o total de ovos férteis eclodidos divididos pelo número total de ovos férteis incubados, multiplicado por 100.

Instalações, equipamentos e manejo experimental do aviário

Para condução do experimento a campo, foram utilizadas instalações em galpão para criação em piso construído de alvenaria com 17 x 8m de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé direito de 2,32m, coberto com telhas francesas, muretas de concreto com 0,46m nas laterais e tela de arame atingindo 1,70m de altura. Foram utilizados oito box, localizados no centro do aviário, com dimensionamento de 2,00 x 1,00m cada, nos quais, foram alojadas 50 aves.

A preparação do galpão para recepção dos lotes obedeceu às normas usuais de limpeza e desinfecção das instalações (telhas, telas, cortinas, piso, área externa, equipamentos), preconizando-se dez dias para limpeza, desinfecção por pulverização com desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído e sete dias para vazio sanitário. Os comedouros tubulares e bebedouros pendulares foram limpos e abastecidos duas vezes ao dia durante a criação do lote. O aquecimento do aviário foi por meio de uma central de gás P-90 distribuído em seis campânulas dispostas equidistantes, sendo a temperatura, também, controlada e monitorada todo o tempo de aquecimento, previsto para a primeira semana de vida do pintinho. As aves foram mantidas em um esquema de iluminação incandescente de 23L:1E durante o período dos primeiros sete dias de criação. O galpão possuía forração interna no teto e proteção na parte externa por

uma cortina com sistema de catracas para sua movimentação. Associado ao manejo de aquecimento e iluminação, o manejo das cortinas auxiliou na manutenção da temperatura interna do galpão adequada às aves. O sistema de ventilação negativa e nebulização foram monitorados por um sistema de painel de controle, pelo qual, todos os registros de temperatura e umidade foram armazenados para análise da condição ambiente e conforto das aves em qualquer período do dia.

Programa alimentar

Todos os pintainhos foram pesados ao alojamento e o acompanhamento individual do peso das aves foi realizado até aos sete dias de idade. Após o alojamento, as aves receberam ração e água *ad libitum*. A ração foi oferecida na forma farelada e formulada para atender as necessidades nutricionais para a fase pré-inicial de criação de frangos de acordo com as recomendações nutricionais utilizada na empresa São Salvador Alimentos S/A na época da presente pesquisa. A composição da dieta experimental utilizada no experimento na fase pré-inicial (um a sete dias) está apresentada na Tabela 1, com seus respectivos níveis nutricionais (Tabela 2).

TABELA 1 Composição percentual da dieta utilizada no experimento durante a fase pré-inicial (um a sete dias)

Ingredientes	Inclusão, %
Milho grão	57,03
Farelo de soja 46,5%	33,92
Farinha de carne 45%	3,80
Farinha de vísceras	2,00
Gordura de aves	1,07
Calcáreo 37%	0,53
Sal branco comum	0,39
Bicarbonato de sódio	0,13
DL-metionina 98%	0,34
Lisina 64%	0,36
Treonina 98%	0,07
Colina 75%	0,05
Suplemento vitamínico e mineral **	0,11
Aditivos *	0,14
Total	100,00

**Suplemento vitamínico e mineral fase inicial para frangos, níveis de garantia por quilograma de ração: 10.000 UI Vitamina A, 2.500 UI Vitamina D3, 25 UI Vitamina E, 2 mg Vitamina K3, 2,5 mg Vitamina B1, 6,5 mg Vitamina B2, 3,5 mg Vitamina B6, 18 µg Vitamina B12, 42 mg Niacina, 15 mg Ácido Pantotênico, 1,2 mg Ácido fólico, 0,08 mg Biotina, 0,3 mg Selênio, 0,075 mg Manganês, 62,5 mg Zinco, 50 mg Ferro, 8,125 g Cobre, 1 mg Iodo Veículo q.s.p. * Aditivos inicial: nicarbazina 25%; bacitracina de zinco 15%; sulfato de cobre 35%; anti-oxidante; anti-salmonela; anti-fúngico e enzima.

TABELA 2 Composição nutricional calculada da dieta utilizada no experimento na fase pré-inicial (um a sete dias) de frangos

Nutrientes e energia, %	Unidade	Inclusão, %
Proteína bruta	%	23,49
Gordura	%	4,45
Ac. Linoleico	%	1,54
Cinza	%	5,97
Cálcio	%	0,95
Cálcio/fósforo		1,96
Fósforo total	%	0,61
Fósforo disponível	%	0,48
Energia metabolizável	kcal/kg	3.001
Lisina total	%	1,41
Lisina digestível	%	1,29
Metionina total	%	0,67
Metionina digestível	%	0,64
AAS total	%	1,03
AAS digestível	%	0,94
Treonina total	%	0,92
Treonina digestível	%	0,81
Triptofano total	%	0,26
Triptofano digestível	%	0,23
Isoleucina total	%	0,97
Isoleucina digestível	%	0,89
Valina digestível	%	0,97
Arginina total	%	1,54
Arginina digestível	%	1,42
Colina	mg/kg	1.749
Na	%	0,23
Cl	%	0,33
K	%	0,90
Na+Cl+K	mEq/100g	243,11

* São Salvador Alimentos S/A.

Delimitação Experimental

Os ovos foram distribuídos em bandejas de 96 ovos e estas foram colocadas no mesmo nível, tanto na incubadora como no nascedouro. Cada ovo foi considerado como uma unidade experimental, com 200 repetições de um ovo para cada tratamento. Após o nascimento, as aves foram alojadas em grupos de machos e fêmeas, diferenciadas por tratamento. Cada pintainho foi considerado como uma unidade experimental. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 2 x 2 (sem e com 25(OH)D₃ e sexo.)

Variáveis analisadas

As variáveis analisadas estão mencionadas no Quadro 1 com suas respectivas unidades.

QUADRO 1 Variáveis analisadas para mortalidade embrionária, escore de qualidade dos neonatos e pesos e medidas no nascimento

Mortalidade Embrionária	Escore Neonato	Avaliação de peso e medidas no nascimento
Inférteis, %	Atividade	POT: peso ovo transferência, g
Mort. Embrionária 0-7dias, %	Umbigo	TI: tempo incubação, horas
Mort. Embrionária 8-14dias, %	Membrana	PN: peso ao nascer, g
Mort. Embrionária 15-18dias, %	Abdômen	PE: peso expedição, g
Mort. Embrionária 19-21dias, %	Pernas	CP: comprimento do pinto, mm
Bicado vivo, %	Canela	PA: peso alojamento, g
Bicado morto, %	Olhos	P7: peso aos sete dias, g
Pintos nascidos anormais, %	Penugem	Janela de nascimento, %
Trincados na transferência, %	Total	Taxa de eclosão, %
Posição errada, %		Eclodibilidade, %
Contaminados, %		

Avaliação da eclodibilidade e mortalidade embrionária dos ovos férteis

O nascimento foi acompanhado a cada duas horas, avaliando-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade dos ovos férteis, a mortalidade embrionária (percentual, período de ocorrência e causas aparentes), os pesos e a qualidade dos neonatos.

Os resultados de eclodibilidade, qualidade da eclosão dos neonatos foram avaliados por unidade de ovos amostrados. Foi, também, avaliado a dispersão/janela do nascimento de cada tratamento referente ao intervalo determinado para registro dos nascimentos. Os pintainhos foram sexados pela asa, pesados, classificados e identificados, individualmente, com anilha numerada.

A taxa de eclosão é uma medida da eficiência do processo de incubação artificial e é realizada após a retirada dos neonatos do nascedouro com a contagem total dos nascidos em relação ao total de ovos incubados, e foi determinada pela equação: $\text{eclosão} = (\text{n}^{\circ} \text{ total de ovos que eclodiram} / \text{n}^{\circ} \text{ total de ovos incubados}) \times 100$.

A eclodibilidade foi determinada realizando o exame de resíduo de uma amostra de ovos que não eclodiram (nível 95% de confiança). Neste exame é feita a quebra dos ovos com posterior análise visual e contagem dos inférteis. Portanto, o cálculo da eclodibilidade é realizado pela equação: $\text{eclodibilidade} = (\text{n}^{\circ} \text{ total de ovos que eclodiram} / \text{n}^{\circ} \text{ total de ovos férteis incubados}) \times 100$.

As avaliações de embriodiagnóstico foram realizadas no incubatório, seguindo o padrão estabelecido no quadro 2.

QUADRO 2. Padrão estabelecido para as avaliações de embriodiagnóstico

Embriodiagnóstico	Padrão
Eclosão, %	90,0
Inférteis, %	3,30
Mort. Embrionária 0-7dias, %	3,20
Mort. Embrionária 8-14dias, %	0,50
Mort. Embrionária 15-18dias, %	1,10
Mort. Embrionária 19-21dias, %	1,22
Bicado vivo, %	0,20
Bicado morto, %	0,20
Pintos nascidos anormais, %	0,00
Trincados na transferência, %	0,00
Posição errada, %	0,10
Contaminados, %	0,00

* São Salvador Alimentos S/A.

Avaliação da qualidade dos pintainhos

A qualidade dos pintos é medida seguindo o procedimento recomendado por TONA et al. (2003) descritos no Quadro 3 e Quadro 4. Com base nesses critérios, obteve-se um escore, com escala total de 100, e adaptado para se obter os escores máximo de 100, médio de 50 e ruim de zero. Além disso, os neonatos foram avaliados com relação ao seu comprimento, com paquímetro digital (marca GUT, ref. nº205509, capacidade 150 mm / 0,01 mm), sendo considerada a medida da extremidade do bico até a extremidade do dedo mais longo excluindo-se a unha. Após serem feitas as medidas os pintainhos receberam ração comercial micropelletizada pré-eclosão no incubatório, na quantidade de 1g/ave.

QUADRO 3. Definição dos parâmetros de qualidade dos pintos neonatos¹

Parâmetro	Definição
Atividade	Verificada quando se coloca o pintainho de costas. Um rápido retorno à posição em pé é definida como boa. Se permanecer de costas, é definido como fraca.
Penugem e aparência	A aparência deve ser limpa e seca. Se estiver úmida e suja ou ambos, é cotada como ruim.
Olhos	Coloca-se o pintainho em pé e observam-se seus olhos. O brilho e a extensão que ocupa a pálpebra sobre o olho.
Pernas	O pintainho é colocado em pé para determinar se permanece firme nessa posição. A conformação dos dedos é examinada. Se houver dificuldade de permanecer em pé, examina-se a articulação do joelho para verificar se há sinais de inflamação.
Canela	Observa-se o brilho e a cor da canela. A normal deve ser avermelhada e brilhante.
Área do umbigo	Examina-se a área do umbigo e ao redor dele, verificando-se o seu fechamento e sua cor. Se a cor for diferente da cor da pele, registra-se como de má qualidade.
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.
Resíduo vitelino	A observação da área do umbigo permite estimar do tamanho do resíduo vitelino. O tamanho será classificado em muito grande, grande ou pequeno.

¹Adaptado de TONA et al. (2003)

QUADRO 4. Alocação dos escores para os diferentes parâmetros de qualidade do neonato observado¹

Parâmetro	Característica	Escore
Atividade	Bom	16
	Médio	8
	Fraco	0
Penugem e aparência	Limpa e seca	16
	Limpa e úmida	8
	Suja e úmida	0
Olhos	Abertos e brilhantes	12
	Abertos e não brilhantes	6
	Fechados	0
Pernas e dedos	Pernas e dedos normais	12
	Uma perna afetada	6
	Duas pernas afetadas	0
Canela	Brilhante e avermelhada	12
	Brilhante e pálida	6
	Opaca e pálida	0
Umbigo	Completamente fechado e limpo	12
	Não completamente fechado, coloração normal	6
	Não fechado e com coloração anormal	0
Membrana remanescente	Sem membrana	10
	pequena	5
	Grande	0
Resíduo da gema	Sem gema aparente	10
	Gema pequena	5
	Gema grande	0

¹ Adaptado de TONA et al (2003)

Análises Estatísticas

Para as variáveis de peso dos ovos na incubação e transferência (perda de peso dos ovos); dispersão da janela de nascimento; peso ao nascer, na expedição e aos sete dias; avaliação de comprimento ao nascer do pintainho utilizou-se o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) sendo os dados submetidos à análise de variância aplicando-se o teste F. Também foi aplicado o teste t para calcular as correlações de Pearson entre as variáveis. Os dados dos resultados do escore de qualidade do neonato foram submetidos à análise estatística não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste Exato de Fisher.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pesos ao nascer (PN), o comprimento pintainho (CP) e o peso do pintainho no alojamento (PA) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3).

TABELA 3 Resultados de qualidade da incubação em máquina de estágio múltiplo provenientes de embriões inoculados no 18º de incubação com 25(OH)D₃

Variável	Sexo	Tratamentos		Médias	Trat.	Sexo	Trat. x Sexo
		Controle	25(OH)D ₃				
POT (g)	M	51,5	52,3	51,9	0,4163	0,2926	0,2943
	F	51,5	51,4	51,4			
	Média	51,5	51,8				
TI (h)	M	493,1	495,6	494,3	0,0003	0,1284	0,8337
	F	491,8	494,6	493,2			
	Média	492,5 b	495,1 a				
PN (g)	M	42,2	43,1	42,6	0,1318	0,1245	0,2777
	F	42,0	42,2	42,1			
	Média	42,1	42,6				
CP (mm)	M	163,8	163,2	163,5b	0,1558	<0,0001	0,5075
	F	172,9	171,4	172,2a			
	Média	168,4	167,3				
PA (g)	M	40,6	41,1	40,9	0,3969	0,1639	0,4769
	F	40,3	40,4	40,4			
	Média	40,5	40,8				
P7 (g)	M	156,0	151,9	153,9a	0,0590	<0,0001	0,5065
	F	147,5	145,5	146,5b			
	Média	151,7	148,7				

* Médias estatisticamente diferentes pelo teste F (P<0,05). POT: peso do ovo transferência (g); TI: tempo incubação (horas); PN: peso ao nascer (g); PE: peso expedição (g); CP: comprimento do pintainho (mm); PA: peso alojamento (g) e P7: peso aos sete dias (g).

O peso aos sete dias foi menor para embriões inoculados com 25(OH)D₃. Os machos, em geral, apresentaram maior peso aos sete dias em comparação às fêmeas, sendo significativa essa diferença. Entretanto, ao comparar machos inoculados com 25(OH)D₃ pode-se observar menor ganho de peso na 1ª semana comparado ao tratamento controle.

Ao avaliar o comprimento corporal no nascimento, observou-se diferença significativa entre os sexos, sendo maior para as fêmeas. Registrou-se

diferença ($p < 0,05$) com maior período médio de incubação (TI) para aves originadas de embriões inoculados no 18º de incubação com 25(OH)D₃, obtendo-se 495,12 horas para as aves inoculadas com 25(OH)D₃ e 492,47 horas para o grupo controle (Tabela 3). Ao avaliar os resultados de correlações na Tabela 4, constatou-se correlação positiva entre o peso do ovo, o peso ao nascimento, o peso alojamento, o comprimento com o peso aos sete dias. Tanto o comprimento corporal quanto o peso aos sete dias apresentaram correlação negativa com o tempo de nascimento. Pode-se inferir que as aves com maior comprimento corporal e maior peso aos sete dias nasceram em menor tempo (Tabela 4).

TABELA 4 Resultados de correlações de Pearson para os valores de POT: peso ovo transferência (g); TI: tempo incubação (horas); PN: peso ao nascer (g); CP: comprimento do pintainho (mm); PA: peso ao alojamento (g); P7: peso aos sete dias (g) de frangos de corte, originados de embriões inoculados ou não no 18º de incubação com 25(OH)D₃

	POT	TI	PN	CP	PA	P7
POT	1,00	0,24*	0,91*	0,02	0,89*	0,35*
TI		1,00	0,33*	-0,38*	0,32*	-0,26*
PN			1,00	-0,00	0,95*	0,37*
CP				1,00	-0,00	0,11*
PA					1,00	0,35*
P7						1,00

* Valores de correlação são estatisticamente diferentes de zero, pelo teste t, com nível de significância de 5%.

O tempo de incubação total no presente experimento foi de 506h para ambos os tratamentos, obtendo-se 81,00% de eclosão para as aves originadas de embriões inoculados no 18º de incubação com 25(OH)D₃ e 79,00% para o grupo controle. Embora obtivesse 2,0% a mais de eclodibilidade para os ovos inoculados com 25(OH)D₃, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

TABELA 5 Nascimento acumulado dos neonatos referente à incubação de 400 ovos em máquina de estágio múltiplo, provenientes de embriões inoculados ou não no 18º de incubação com 25(OH)D₃

Tempo (h) Incubação	Tratamentos				P*
	Controle		25(OH)D ₃		
476	0/200	0%	1/200	0,63%	1,00
478	0/200	0%	1/200	0,63%	1,00
480	0/200	0%	0/200	0%	1,00
482	9/200	4,5%	6/200	4,0%	0,60
484	10/200	9,5%	3/200	5,5%	0,08
486	22/200	20,5%	11/200	11,0%	0,06
488	14/200	27,5%	7/200	14,5%	0,17
490	13/200	34,0%	21/200	25,0%	0,20
492	21/200	44,5%	10/200	30,0%	0,05
494	14/200	51,5%	8/200	34,0%	0,27
496	12/200	57,5%	26/200	47,0%	0,02
498	17/200	66,0%	16/200	55,0%	1,00
500	9/200	70,5%	22/200	66,0%	1,00
502	9/200	75,0%	10/200	71,0%	1,00
504	4/200	77,0%	15/200	78,5%	0,01
506	4/200	79,0%	5/200	81,0%	1,00
Total	158/200	79,0%	162/200	81,0%	0,70

* Diferença significativa pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

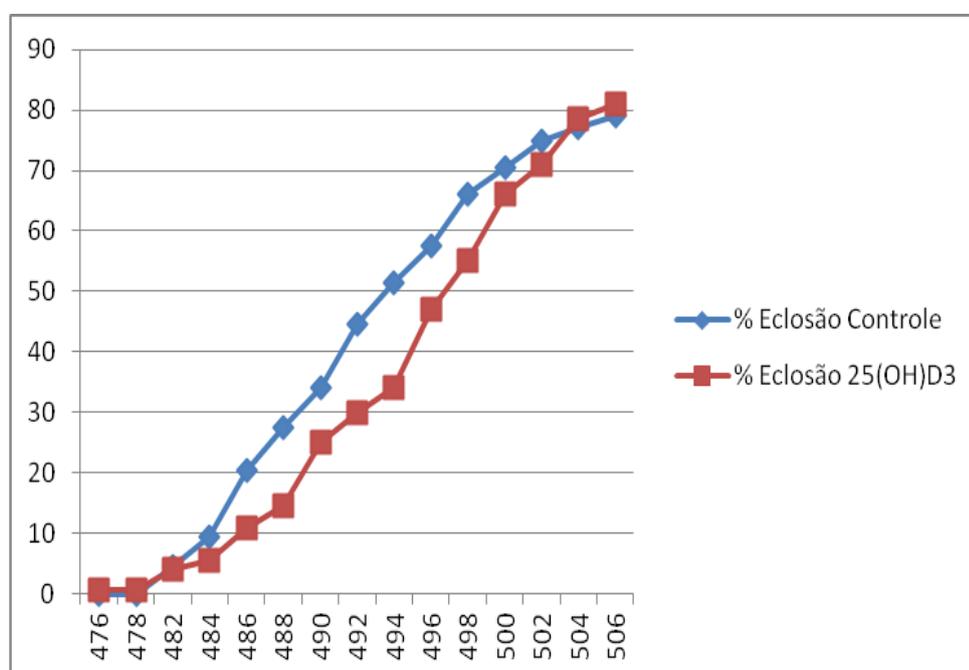


Figura 1. Distribuição da Janela de nascimento (eclosão) dos neonatos provenientes de embriões inoculados ou não no 18º de incubação com 25(OH)D₃

O comportamento da janela de nascimento foi diferente entre os tratamentos. Observou-se um intervalo de 24 horas para o grupo controle em comparação com os embriões inoculados com 25(OH)D₃ que apresentaram maior intervalo de nascimento, atingindo 30 horas. Os intervalos de nascimento de ambos os tratamentos foram considerados satisfatórios para incubação em máquina de estágio múltiplo, porém, a eclodibilidade geral foi considerada baixa. Observou-se que o desenvolvimento embrionário das aves inoculadas com 25(OH)D₃ foi mais lento, inicialmente, em relação ao nascimento do tratamento controle, recuperando essa diferença no final da janela de nascimento (Figura 1).

De acordo com WILLIAMS (2004), as diferenças encontradas em eclodibilidade utilizando a injeção *in ovo* no 18º dia são mais importantes ao se considerar a idade das matrizes e o tipo de incubadora que os próprios ajustes de temperatura e umidade da máquina. Diferentes tipos de incubadoras apresentam diferentes perfis de perda de água e da temperatura, resultando em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário nos mesmos pontos cronológicos de incubação.

Em geral as máquinas de estágio múltiplo apresentam maiores diferenças no estágio de desenvolvimento do embrião quando comparados com as máquinas de estágio único (GONZALES, 2012). O momento ideal da injeção *in ovo*, em termos de desenvolvimento, depende mais das características fisiológicas do embrião do que do tempo real de incubação. E essa condição pode afetar a eficiência da nutrição pré-eclosão, o que pode ter ocorrido no presente experimento, pois a inoculação tem que atingir a localização desejada (âmnio) dentro do ovo embrionado, e quanto mais uniforme estiver o desenvolvimento embrionário, melhor será a assimilação e aproveitamento da substância inoculada.

OVIEDO-RONDÓN et al. (2009) relataram que a qualidade do embrião pode ser afetada pelo tipo de incubadora utilizada (carga múltipla / única) e que existe uma constatação de que embriões incubados em cargas múltiplas apresentarem maiores percentuais de alterações de marcha e deformidade de pernas. De acordo com os autores as incubadoras de carga múltipla não fornecem bom aquecimento aos embriões no início da incubação, nem o adequado resfriamento na fase final do processo, ocasionando grande produção

de calor com consequências diretas e negativas no desenvolvimento ósseo do embrião.

No presente experimento, observou-se o retardo na eclosão dos embriões inoculados com 25(OH)D₃ para o final da janela de nascimento. Embora não foram encontradas diferenças significativas na avaliação do embriodiagnóstico, o percentual de ovos bicados vivos para os embriões inoculados com 25(OH)D₃ foi de 2,5 %, em comparação ao grupo controle que foi de 0,5% conforme demonstrado na Tabela 6.

TABELA 6 Resultados de mortalidade embrionária da incubação de 400 ovos em máquina de estágio múltiplo, provenientes de embriões inoculados ou não no 18º de incubação com 25(OH)D₃

Embriodiagnóstico	Controle	25(OH)D ₃	P*
Inférteis, %	11/200 (5,5%)	10/200 (5,0%)	1,00
Mort. Embrionária 0-7dias, %	10/200 (5,0%)	11/200 (5,5%)	1,00
Mort. Embrionária 8-14dias, %	4/200 (2,0%)	3/200 (1,5%)	1,00
Mort. Embrionária 15-18dias, %	4/200 (2,0%)	2/200 (1,0%)	0,68
Mort. Embrionária 19-21dias, %	2/200 (1,0%)	3/200 (1,5%)	1,00
Bicado vivo, %	1/200 (0,5%)	5/200 (2,5%)	0,21
Bicado morto, %	1/200 (0,5%)	1/200 (0,5%)	1,00
Pintos nascidos anormais, %	1/200 (0,5%)	0/200 (0,0%)	1,00
Trincados na transferência, %	5/200 (2,5%)	2/200 (1,0%)	0,44
Posição errada, %	2/200 (1,00%)	1/200 (0,5%)	1,00
Contaminados, %	1/200 (0,5%)	0/200 (0,0%)	1,00
Total	42/200	38/200	0,70

* Diferença não significativa pelo teste Exato de Fisher ($p > 0,05$).

Verificou-se que o período de avaliação da janela de nascimento poderia ter sido maior do praticado no presente experimento, já que se constatou uma janela de nascimento bastante satisfatória para o tipo de máquina de estágio múltiplo. Provavelmente, a eclodibilidade dos ovos poderia ser maior para os embriões inoculados com 25(OH)D₃. Segundo WILLIANS (2004) ovos inoculados no estágio final de incubação (dia 19) deve conter menos de 1,0% de ovos bicados.

De acordo com NARBAITZ & FRAGISKOS (1984); NARBAITZ et al. (1987) e NARBAITZ & TSANG (1989), o excesso ou deficiência de vitamina D₃ está diretamente associada com menor eclosão dos ovos férteis devido ao aumento da mortalidade embrionária na terceira semana de incubação.

TORRES (2008) ao avaliar a mortalidade embrionária dos ovos provenientes de reprodutoras pesadas com 64 semanas de idade, suplementadas com vitamina D₃ e 25(OH)D₃ na ração, encontrou maior diferença na mortalidade da 3ª semana e no percentual de ovos bicados, sendo superiores para o tratamento (2.000D₃ + 69µg 25(OH)D₃) em comparação ao tratamento com 2.000D₃. De certa forma, pode-se observar que o aumento da dosagem de vitamina D provavelmente refletiu no aumento dessas variáveis. O mesmo autor, ao avaliar as mesmas dosagens, mas com reprodutoras de 67 semanas, observou maior mortalidade embrionária na primeira semana. Somente nas avaliações de reprodutoras com 67 semanas, constatou melhor eclosão quando associou 2.000 D₃ com 25(OH)D₃ não registrando diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis do embriodiagnóstico.

A avaliação de qualidade dos pintainhos foi significativamente menor para os machos inoculados com 25(OH)D₃, sendo as características específicas de escore, como: atividade, cicatrização umbilical, membrana e total, as prejudicadas na classificação dos neonatos (Tabela 7).

TABELA 7 Médias e medianas dos escores de qualidade de pintos de corte machos e fêmeas com um dia de idade provenientes de embriões inoculados ou não no 18º de incubação com 25(OH)D₃ incubados em máquina de estágio múltiplo

Escore	Controle		25(OH)D ₃		P*
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
Atividade	14,9(16)a	15,6(16)a	14,1(16)b	15,2(16)a	0,0021*
Umbigo	9,1(12)b	11,1(12)a	9,0(12)b	10,6(12)a	<0,0001*
Membrana	11,0(12)a	11,1(12)a	10,1(12)b	11,1(12)a	0,0264*
Abdômen	11,2(12)ab	11,4(12)a	10,7(12)b	11,5(12)ab	0,1473
Pernas	9,9(10)	9,9(10)	9,9(10)	10,0(10)	0,4186
Canela	16,0(16)	16,0(16)	16,0(16)	15,9(16)	0,4772
Olhos	10,0(10)	10,0(10)	9,9(10)	10,0(10)	0,3180
Penugem	11,7(12)	12,0(12)	11,8(12)	11,8(12)	0,2856
Total	93,8(100)b	97,2(100)a	91,7(94)c	96,2(100) a	<0,0001*

* Diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

Na ordem de escore total, as fêmeas obtiveram os melhores escores, e os machos apresentaram os piores, sendo os inoculados com 25(OH)D₃ os mais

prejudicados. Esses registros reforçam os pesos obtidos aos sete dias, quando se constatou menor peso para os embriões inoculados com 25(OH)D₃.

Na presente pesquisa, observou-se que o tempo de incubação apresentou correlação negativa (-0,2423) e valor de ($p < 0,01$) com escore de qualidade de cicatrização umbilical. Os pintainhos que nasceram mais tarde apresentaram piores escores na avaliação de qualidade realizada no incubatório. Essa diferença refletiu na qualidade do pintainho, principalmente os embriões inoculados com 25(OH)D₃. Também, foi possível constatar correlação negativa do tempo de incubação com as avaliações de atividade (-0,3197) e abdômen (-0,1729). Esses resultados estão de acordo com HODGETTS (2006) que observou que os neonatos nascidos no final da janela de nascimento apresentam maiores problemas de cicatrização umbilical que os demais.

Não houve mortalidade até aos sete dias das aves originadas de embriões inoculados no 18º dia de incubação em nenhum dos tratamentos. Entretanto, a janela de nascimento, o comprimento corporal e o escore de qualidade de pintainhos incubados em máquina de estágio múltiplo sofreu interferência negativa da inoculação com 25(OH)D₃ no 18º dia de incubação refletindo no peso aos sete dias de idade.

GONZALES et al. (2003) avaliaram os pesos dos pintainhos logo após o nascimento e no alojamento e observaram diferença estatística, relacionada com o nível de suplementação *in ovo* com 25(OH)D₃ no 18º dia de incubação com tendência linear e negativa nas seguintes quantidades correspondentes a 0,00; 0,625; 1,250 e 1,875 µg de 25(OH)D₃.

4. CONCLUSÃO

É possível inocular o metabólito 25(OH)D₃ *in ovo*, sem prejuízo ao processo de vacinação industrial e transferência dos ovos embrionados originados de matrizes pesadas.

O metabólito 25(OH)D₃ não é efetivo na melhoria da qualidade dos pintainhos de corte provenientes de embriões incubados em máquina de estágio múltiplo e inoculados no 18º dia de desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

1. APPLGATE, T. J.; ANGEL, R.; CLASSEN, H. L. Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, and bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v.82, p.1140-1148, 2003.
2. FRITTS, C. A., WALDROUP, P. W. Effect of source and level of vitamin D on live performance and bone development in growing broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 1, p. 45-52, 2003.
3. GONZALES, E.; OLIVEIRA, A.S.C.; CRUZ, C.P.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; BRITO, A.B. *In ovo* supplementation of 25 (OH)D₃ to broiler embryos. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003, Lillehammer. **Proceedings...** Lillehammer: WPSA, 2003. p. 72-74.
4. GONZALES, E., MACARI, M., PAZ, ICLA. Cap. 9. Enfermidades metabólicas em frangos de corte. In: BERCHIERI JR., A., SILVA, EM, DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZA, MAF. (ed.). **Doenças das aves**. Campinas (SP): FACTA, 2009. p. 977-998.
5. GONZALES, E. Comentário avícola: incubação. **Revista Avicultura Industrial**, 2008. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/> WebSite/Notícias/ Acesso em: 13 de outubro de 2012.
6. HODGETTS, B. Successfully closing the hatch window. **International Hatchery Practice**, v.20, n.5, p 23, 2006.
7. KASIM S.; BLAKE B.L, FAN X.; CHARLOFF, E.; EGANI, K. The role of dopamine receptors in the neurobehavioral syndrome provoked by activation of L-type calcium channels in rodents. **Developmental Neuroscience** v.28, p.505-517, 2006.
8. KORVER, D. Research, analytical techniques and practical experiences using HyD™. In: ARKANSAS NUTRITION CONFERENCE, 2005, Arkansas. **Proceedings...** 2005, p.12.
9. LEITÃO, R. A.; LEANDRO, N. S. M.; PEDROSO, A. A.; STRINGHINI, J. H.; OLIVEIRA NETO, G. R.; CAFÉ, M. B. Efeito da suplementação de glicose in ovo sobre o desempenho inicial de pintos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, p.69, 2005.
10. NARBAITZ, R.; FRAGISKOS, B. Hypervitaminosis D in the chick embryo: comparative study on the activity of various vitamin D₃ metabolites. **Calcified Tissue International**, v.36, p. 392-400, 1984.
11. NARBAITZ, R.; TSANG, C.P.W.; GRUNDER, A.A. Effects of vitamin D deficiency in the chicken embryo. **Calcified Tissue International**, v.40, p.109-113, 1987.

12. NARBAITZ, R.; TSANG, C.P.W. Vitamin deficiency in the chick embryo: effects on prehatching motility and on the growth and differentiation of bones, muscles and parathyroid glands. **Calcified Tissue International**, v.44, p.348-355, 1989.
13. OVIEDO-RONDÓN E. "Factores que Afectam a Capacidade de Andar em Perus e Frangos" **Aves e Ovos**, Janeiro - Fevereiro, p. 14-23, 2008.
14. OVIEDO-RONDÓN E. Wineland M, Funderburk S, Small J, Cutchin H, Mann M "Incubation conditions affect leg health in large, high-yield broilers" **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.640-646, 2009.
15. PIZAURO JR, J. M; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia Tibial: Mecanismos de Lesão e Controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 169-185, 2002.
16. R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available at < <http://www.R-project.org/>> assessed in 2012.
17. SANTOS, T. T. **Influência da inoculação de ingredientes intra ovo em aspectos produtivos e morfológicos de frangos de corte oriundos de distintos pesos de ovos**. Pirassununga (SP): USP, 2007. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007.
18. SBCAL/COBEA: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) **Proteção e Bem Estar de Animais de Laboratório**. <http://www.cobea.org.br/>
19. TONA, K.; BAMELIS, F.; DE KATELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; MORAES, V.B.M.; BUYSE, J.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of storage time on spread of hatch, chick quality and chick juvenile growth. **Poultry Science**, v.82, p.763-741, 2003.
20. TORRES, C. **Desempenho produtivo de reprodutoras de frangos de Corte suplementadas com 25-hidroxicolecalciferol**. Porto Alegre (RS): UFRGS, 2008. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
21. UNI, Z., TAKO, E. GAL-GARBER, O., SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late -term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003.
22. UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n.11, p.101-111, 2004.

23. WEBER, G. Symposium conference: The use of 25(OH)D₃. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003. **Proceedings...** WPSA: Lillehammer, 2003.
24. WILLIAMS, C. J. Princípios fundamentais e fatores fisiológicos da injeção in ovo. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: FACTA, 2004 p. 171-177.

CAPÍTULO 3. QUALIDADE DE PINTAINHOS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE ATÉ 21 DIAS PROVENIENTES DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL *IN OVO*

RESUMO: Objetivou-se avaliar a qualidade dos neonatos e desempenho de frangos originados de embriões suplementados *in ovo* com 25-D-hidroxicolecalciferol, 25(OH)D₃ aos 19 dias de desenvolvimento embrionário. A incubação foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A em máquina de estágio único, utilizando 2.752 ovos de matrizes Cobb 500 com 40 semanas de idade. Na transferência e vacinação, os ovos com embriões viáveis foram inoculados com a solução controle e com 25(OH)D₃ incorporados na vacina. A compatibilidade do produto foi avaliada anteriormente e as dosagens utilizadas foram de zero e 1,250µg de 25(OH)D₃ equivalentes a 50 UI de vitamina D₃. Os ovos foram acondicionados em sacos de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato. O nascimento foi acompanhado a cada quatro horas, avaliando-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade, a mortalidade embrionária (percentual, período de ocorrência e causas aparentes), os pesos e comprimentos dos neonatos e a qualidade do pintainho. Após pesagem, qualificação e sexagem, 120 pintos de corte machos foram enviados para o aviário experimental da UFG. Pesaram-se as aves, as dietas e as aves mortas para cálculo do desempenho até 21 dias de idade. O delineamento experimental aplicado foi em blocos ao acaso tendo como critério de distribuição do bloco o andar da bateria, com dois tratamentos e cinco repetições de 12 aves por unidade experimental, totalizando 10 unidades neste experimento. Os resultados de eclodibilidade dos ovos férteis entre os tratamentos apresentaram diferença ($p < 0,05$), obtendo-se maior eclodibilidade as aves inoculadas com 25(OH)D₃. A utilização do aditivo 25(OH)D₃ *in ovo* foi efetiva ($p < 0,05$) na melhoria da eclodibilidade dos ovos férteis. O metabólico 25(OH)D₃ melhorou a viabilidade dos frangos de corte até 21 dias de idade. Entretanto, não houve influência ($p > 0,05$) para peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar de um aos 21 dias de idade. Portanto, a utilização 25(OH)D₃ *in ovo* não é efetiva na melhoria do desempenho dos frangos.

Palavras-chaves: embrião, frango de corte, suplementação *in ovo*, vitamina D.

CHAPTER 3 – CHICK QUALITY AND BROILER PERFORMANCE UNTIL 21 DAYS OF AGE OBTAINED FROM EMBRYOS SUPPLEMENTED WITH 25-HYDROXY-CHOLECALCIFEROL *IN OVO*

ABSTRACT: This work was carried out to evaluate the quality of newborn chicks, males and females, hatched from embryos supplemented *in ovo* with 25-D-hydroxy-cholecalciferol, 25(OH)D₃ at 19 days of embryo development. Chicks were hatched in one-stage hatcheries with 2752 eggs 45-week old Cobb 500® breeder. During the transference and vaccination, fertile and viable eggs were inoculated with placebo or 25(OH)D₃ solution incorporated in the vaccine and the compatibility of the mix were tested with two dosis, zero and 1,250µg of 25(OH)D₃ equivalent to 50 UI of vitamin D₃. Eggs were placed in air-permeable bags in order to discriminate the chicks and eggshell components. The hatch was checked each four hours to evaluate incubation period (hours), hatchability, embryo mortality (percentage, period and apparent causes), weight and length and quality score of the newborn chicks. Difference was observed (P<0.05) for hatchability. No influence either was verified (P>0.05) for embryo mortality and newborn chick quality. No influence either was verified (P>0.05) for average live weight, weight gain, feed intake and feed conversion from one to 21 days of age. It is possible to observe that the use on 25(OH)D₃ inoculated *in ovo* was not effective to improve performance in broilers.

Keywords: embryo, broiler, *in ovo* supplementation, vitamin D.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a busca por melhor desempenho e rendimento de carnes na indústria avícola aumentou as pesquisas nos setores de incubação, principalmente, quando se refere à nutrição do embrião. Existem procedimentos que permitem a inoculação *in ovo* sem causar prejuízo ao desenvolvimento embrionário, sendo possível suplementar, via exógena, embriões de frangos de corte utilizando a mesma técnica de vacinação. De acordo com CAMPOS (2007), as escolhas dos produtos a serem inoculados assim como suas concentrações dependem de novas pesquisas na área.

De acordo com WILLIANS (2004), conhecer os fatores que influenciam a aplicação pode definir o sucesso ou o fracasso da aplicação *in ovo*. As interações da idade do embrião no momento da injeção, da eclodibilidade e das respostas fisiológicas devem ser levadas em consideração ao estudar as técnicas de injeção para identificar o momento ideal e atingir a localização desejada dentro do ovo embrionado. Há cinco compartimentos separados no ovo no estágio final de incubação que podem ser acessados pela injeção *in ovo*: a câmara de ar; o saco alantoide, o âmnio; o saco vitelino e o embrião em si. Sendo que cada compartimento representa uma via distinta de administração do embrião.

Dependendo do estágio de desenvolvimento do embrião, o volume da inoculação de produtos *in ovo* pode ser aplicado em locais distintos. Ao se proceder a aplicação no momento da transferência da incubadora para o nascedouro (décimo oitavo dia de incubação) a aplicação ocorre primordialmente no líquido amniótico (JOICHEMSEN & JEURISSEN, 2002). A distribuição de soluções no âmnio resulta em consumo oral e absorção interna pelas superfícies da mucosa intestinal do embrião. A partir de 19 dias uma maior proporção das inoculações, ocorre no próprio embrião (WILLIANS, 2004).

A suplementação exógena de embriões de frangos de corte já foi testada em pesquisas conduzidas com essa finalidade, inoculando-se manualmente os ovos e comprovou-se que essa via de alimentação do embrião é compatível e promissora (CRUZ et al., 2003a,b, GONZALES et al., 2003 a, b, c, UNI et al., 2003). O fato é que, a suplementação de ingredientes *in ovo* no líquido

amniótico do embrião, por máquinas de vacinação automática, ainda é um estudo recente nas indústrias de incubação.

A suplementação *in ovo* com o metabólito 25(OH)D₃ pode ser importante para o crescimento normal do tecido ósseo no período neonatal, cujo crescimento é prioritário nessa fase de desenvolvimento do pinto. Desse modo, com a estrutura óssea mais resistente, o pintainho teria condições de suportar o intenso crescimento muscular que segue o pico de crescimento do tecido ósseo, prevenindo-se o aparecimento futuro de problemas relacionados com o esqueleto e melhorando o seu desempenho (GONZALES & MACARI, 2000).

O metabólito 25(OH)D₃ é mais ativo do que a vitamina D₃ e proporciona maior eficiência na utilização desta vitamina (FRITTS & WALDROUP, 2003). E possui taxa de absorção cerca de 20% maior do que a vitamina D₃ e 1,25(OH)2D₃ (APPLEGATE et al., 2003).

De acordo com WILSON (1997), a deficiência de vitamina D, também pode ser uma das causas de mortalidade embrionária tardia e estarem relacionadas com problemas de qualidade do esqueleto da ave. SELL & JERRY (1994) relatou que a eclosão do neonato é afetada pelos níveis de vitamina D presente na membrana que envolve a gema do ovo.

O uso de o 25(OH)D₃ como aditivo alimentar para frangos de corte é realizado com o objetivo de melhorar o desempenho à idade de abate, com marcante diminuição da incidência de discondroplasia tibial (DT) (WEBER, 2003).

Objetivou-se, neste presente trabalho, estudar a influência da utilização do metabólito 25(OH)D₃ *in ovo* proveniente de ovos incubados em máquina de estágio único, principalmente, os efeitos no desenvolvimento embrionário, no desempenho e as possibilidades de utilizar a técnica de aplicação automática de vacinação industrial *in ovo* com o metabólito 25(OH)D₃.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização

A incubação experimental foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A, localizado em Itaberaí-GO. Posteriormente, os neonatos, identificados, foram encaminhados para o aviário experimental do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (UFG) em Goiânia-GO e criados por 21 dias.

O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº 014/12, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Instalações, equipamentos e manejo experimental no incubatório

A incubação foi conduzida em máquina de estágio único utilizando 2.752 ovos, sendo 1.376 ovos inoculados com 1,250 µg de 25(OH)D₃ na solução vacinal e 1.376 ovos sem o metabólito da vitamina D₃. Paralelamente, 180 ovos foram previamente selecionados por peso antes da incubação e destinados para análise individual. Os ovos foram obtidos de matrizes pesadas com 40 semanas de idade da linhagem Cobb 500®. Nessa pesquisa, também, não foi levado em consideração o aporte de vitamina D₃ e seus metabólitos proveniente das matrizes pesadas.

No momento da transferência e da vacinação, os ovos embrionados foram inoculados, via cavidade amniótica, com solução vacinal, sem o metabólito da vitamina D₃ e com 1,250 µg de 25(OH)D₃, correspondente a zero e 50 UI de vitamina D₃, respectivamente.

A compatibilidade do produto com a solução vacinal foi avaliada anteriormente, constatando-se a titulação e a integridade da partícula viral na presença do metabólito da vitamina D₃. A titulação da vacina de Marek e Gumboro diluída com adição da substância 25(OH)D₃ não apresentaram resultados significativos entre os diferentes tempos (T0, T30 e T60) de suspensão

da vacina. A adição do produto 25(OH)D₃ não interferiu na titulação quando comparado com o grupo controle negativo seguindo a técnica de titulação em cultivo celular de fibroblasto de embriões de galinhas utilizada pelo controle de qualidade do laboratório da Merial Saúde Animal.

Após a vacinação os 180 ovos foram acondicionados em sacos de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato ao seu tratamento. Para cada ovo, o período de incubação foi definido como o tempo entre a colocação em condições de incubação artificial e o efetivo nascimento.

Instalações, equipamentos e manejo experimental no aviário

Para condução do experimento, foram utilizadas duas baterias de aço galvanizado, cada uma com cinco andares e divisões com 0,80 x 0,75 x 0,25m (comprimento x largura x altura), instaladas em galpão de alvenaria com 12,96 x 2,96m (38,36m²) de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé direito de 2,32m, coberto com telhas francesas, muretas de concreto com 0,46m nas laterais e tela de arame até o teto do telhado atingindo 1,70m de altura. O galpão possuía forração interna no teto e proteção na parte externa por uma cortina com sistema de catracas para sua movimentação.

O aquecimento de cada andar das baterias foi realizado por meio de lâmpadas incandescentes de 60 W, que permaneceram ligadas durante as duas primeiras semanas. A iluminação externa às baterias foi feita com lâmpadas incandescentes de 40 W espalhadas pelo galpão. O aquecimento interno foi monitorado diariamente e associado ao manejo das cortinas para manter a temperatura interna do galpão adequada às aves.

As aves foram mantidas em um esquema de iluminação de 23L:1E durante o período dos primeiros sete dias de criação. Dos sete aos 21 dias as aves receberam 4 horas de escuro em 24 horas. Os comedouros e bebedouros foram do tipo calha, limpos e abastecidos duas vezes ao dia na primeira semana e três vezes ao dia na segunda e terceira semana de criação.

Programa alimentar

Todos os pintainhos machos foram pesados ao alojamento e o acompanhamento do desempenho foi realizado até aos 21 dias de idade. As aves e as dietas foram pesadas no 1º, 7º, 14º e 21º dias de idade e estes dados foram utilizados para cálculo do ganho de peso, do consumo de ração e do índice de conversão alimentar. Após o alojamento, as aves receberam ração e água *ad libitum*. A ração foi oferecida na forma farelada e formulada para atender as necessidades nutricionais para a fase inicial de criação de frangos de acordo com as recomendações nutricionais utilizada na empresa São Salvador Alimentos S/A na época da presente pesquisa.

A composição da dieta experimental utilizada no experimento na fase inicial (um a 21 dias) está apresentada na Tabela 1, com seus respectivos níveis nutricionais (Tabela 2).

TABELA 1 Composição percentual da dieta utilizada no experimento durante a fase inicial (um a 21 dias)

Ingredientes	Inclusão, %
Milho grão	58,89
Farelo de soja 46,5%	18,07
Farinha de carne 45%	4,20
Soja integral tostada	14,40
Calcáreo 37%	0,47
Sal branco comum	0,34
Bicarbonato de sódio	0,10
DL-metionina 98%	2,99
Lisina 64%	0,32
Treonina 98%	0,06
Colina75%	0,06
Suplemento vitamínico e mineral **	0,10
Aditivos *	0,02

**Suplemento vitamínico e mineral fase inicial para frangos, níveis de garantia por quilograma de ração: 10.000 UI Vitamina A, 2.500 UI Vitamina D3, 25 UI Vitamina E, 2 mg Vitamina K3, 2,5 mg Vitamina B1, 6,5 mg Vitamina B2, 3,5 mg Vitamina B6, 18 µg Vitamina B12, 42 mg Niacina, 15 mg Ácido Pantotênico, 1,2 mg Ácido fólico, 0,08 mg Biotina, 0,3 mg Selênio, 0,075 mg Manganês, 62,5 mg Zinco, 50 mg Ferro, 8,125 g Cobre, 1 mg Iodo Veículo q.s.p. * Aditivos inicial: nicarbazina 25%; bacitracina de zinco 15%; sulfato de cobre 35%; anti-oxidante; anti-salmonela; anti-fúngico e enzima.

TABELA 2 Composição nutricional calculada da dieta utilizada no experimento na fase inicial (um a 21 dias) de frangos

Nutrientes e energia, %	Unidade	Inclusão, %
Proteína bruta	%	21,75
Gordura	%	6,11
Ac. Linoleico	%	2,71
Matéria seca	%	88,54
Cinza	%	5,51
Cálcio	%	0,93
Cálcio/fósforo		1,97
Fósforo total	%	0,61
Fósforo disponível	%	0,47
Energia metabolizável	kcal/kg	3.099
Lisina total	%	1,29
Lisina digestível	%	1,17
Metionina total	%	0,63
Metionina digestível	%	0,60
AAS total	%	0,97
AAS digestível	%	0,87
Treonina total	%	0,85
Treonina digestível	%	0,74
Triptofano total	%	0,24
Triptofano digestível	%	0,21
Isoleucina total	%	0,89
Isoleucina digestível	%	0,80
Valina digestível	%	0,87
Arginina total	%	1,42
Arginina digestível	%	1,30
Colina	mg/kg	1.699
Na	%	0,21
Cl	%	0,30
K	%	0,87
Na+Cl+K	MEq/100g	230,12

* São Salvador Alimentos S/A.

Delineamento Experimental

O delineamento experimental aplicado no incubatório foi um fatorial 2 x 2, sendo que os ovos foram distribuídos em 32 bandejas de 86 ovos e estas foram colocadas nos mesmos níveis em 16 andares para ambos os tratamentos, totalizando 16 repetições, tanto na incubadora como no nascedouro.

Para avaliação de desempenho foram alojados 120 machos Cobb 500®, em baterias resultantes da incubação experimental. O delineamento aplicado foi em blocos ao acaso tendo como critério de distribuição do bloco o andar da bateria, com dois tratamentos (com e sem inoculação de 25(OH)D₃) e cinco repetições de 12 aves por unidade experimental, totalizando 10 unidades experimentais.

Avaliação da eclodibilidade e mortalidade embrionária dos ovos férteis

O nascimento foi acompanhado a cada quatro horas, avaliando-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade, a mortalidade embrionária, os pesos ao nascimento e a qualidade dos neonatos. Os resultados de eclodibilidade, mortalidade embrionária e qualidade dos neonatos incubados em máquina de estágio único foram avaliados nos 180 ovos amostrados.

Avaliou-se, também, a dispersão/janela do nascimento dos tratamentos referente ao intervalo determinado para registro dos nascimentos. Decorridos 506,5 horas de incubação, todos os neonatos foram pesados e examinados macroscopicamente para definir a qualidade.

As avaliações de embriodiagnóstico seguiram o padrão estabelecido no Quadro 1.

QUADRO 1. Padrão estabelecido para as avaliações de embriodiagnóstico

Embriodiagnóstico	Padrão
Eclosão, %	90,0
Inférteis, %	3,30
Mort. Embrionária 0-7dias, %	3,20
Mort. Embrionária 8-14dias, %	0,50
Mort. Embrionária 15-18dias, %	1,10
Mort. Embrionária 19-21dias, %	1,22
Bicado vivo, %	0,20
Bicado morto, %	0,20
Pintos nascidos anormais, %	0,00
Trincados na transferência, %	0,00
Posição errada, %	0,10
Contaminados, %	0,00

* São Salvador Alimentos S/A.

Avaliação da qualidade dos pintainhos

A qualidade dos pintos foi avaliada seguindo o procedimento recomendado por TONA et al. (2003) e descritos no Quadro 2 e no Quadro 3. Com base nesses critérios, obteve-se um escore, com escala total de 100, e adaptado para se obter os escores máximo de 100, médio de 50 e ruim, zero.

Posteriormente, os neonatos foram avaliados com relação ao seu comprimento, considerada a medida da extremidade do bico até a extremidade do dedo mais longo excluindo-se a unha, medida com paquímetro digital (marca GUT, ref. nº205509, capacidade 150 mm / 0,01mm). Após serem feitas as medidas os pintainhos receberam ração comercial micropelletizada pós-eclosão no incubatório, na quantidade de 1g/ave.

QUADRO 2. Definição dos parâmetros de qualidade dos pintos neonatos¹

Parâmetro	Definição
Atividade	Verificada quando se coloca o pintainho de costas. Um rápido retorno à posição em pé é definida como boa. Se permanecer de costas, é definido como fraca.
Penugem e aparência	A aparência deve ser limpa e seca. Se estiver úmida e suja ou ambos, é cotada como ruim.
Olhos	Coloca-se o pintainho em pé e observam-se seus olhos. O brilho e a extensão que ocupa a pálpebra sobre o olho.
Pernas	O pintainho é colocado em pé para determinar se permanece firme nessa posição. A conformação dos dedos é examinada. Se houver dificuldade de permanecer em pé, examina-se a articulação do joelho para verificar se há sinais de inflamação.
Canela	Observa-se o brilho e a cor da canela. A normal deve ser avermelhada e brilhante.
Área do umbigo	Examina-se a área do umbigo e ao redor dele, verificando-se o seu fechamento e sua cor. Se a cor for diferente da cor da pele, registra-se como de má qualidade.
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.
Resíduo vitelino	A observação da área do umbigo permite estimar do tamanho do resíduo vitelino. O tamanho será classificado em muito grande, grande ou pequeno.

¹Adaptado de TONA et al. (2003)

QUADRO 3. Alocação dos escores para os diferentes parâmetros de qualidade do neonato observado¹

Parâmetro	Característica	Escore
Atividade	Bom	16
	Médio	8
	Fraco	0
Penugem e aparência	Limpa e seca	16
	Limpa e úmida	8
	Suja e úmida	0
Olhos	Abertos e brilhantes	12
	Abertos e não brilhantes	6
	Fechados	0
Pernas e dedos	Pernas e dedos normais	12
	Uma perna afetada	6
	Duas pernas afetadas	0
Canela	Brilhante e avermelhada	12
	Brilhante e pálida	6
	Opaca e pálida	0
Umbigo	Completamente fechado e limpo	12
	Não completamente fechado, coloração normal	6
	Não fechado e com coloração anormal	0
Membrana remanescente	Sem membrana	10
	pequena	5
	Grande	0
Resíduo da gema	Sem gema aparente	10
	Gema pequena	5
	Gema grande	0

¹ Adaptado de TONA et al. (2003)

Avaliação de desempenho zootécnico

Na condução dos experimentos foram avaliados os pesos das aves e das dietas e anotados o peso das aves mortas para cálculo da mortalidade diária. As aves foram pesadas para cálculos dos índices zootécnicos: peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar corrigida pelo peso das aves mortas (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). Estes valores foram tabulados da seguinte forma:

- Ganho de peso (g): calculado pela diferença entre os pesos das aves obtidos nas pesagens.

- Consumo de ração (g): obtido pela diferença entre a quantidade de dieta oferecida no início e as sobras ao final de cada semana avaliada, considerando o número de aves mortas no intervalo para correção dos valores de consumo.
- Índice de conversão alimentar: obtido pela relação entre o ganho de peso e o consumo de ração, considerando o número de aves mortas no intervalo como critério para correção dos valores deste índice.
- Viabilidade: calculada pela diferença entre o número de aves no início do experimento e a mortalidade que foi anotada diariamente.

O índice de eficiência produtiva foi calculado pela fórmula:

$$IEP = [(GPD \times V) / (CA)] \times 100$$

em que:

IEP = índice de eficiência produtiva

GPD = ganho de peso diário em quilogramas

V = viabilidade em porcentagem

CA = conversão alimentar

Análises Estatísticas

Para análise das variáveis de peso dos ovos na incubação e transferência (perda de peso dos ovos); dispersão da janela de nascimento; peso ao nascer, peso na expedição e avaliação de comprimento do pintainho utilizou-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) sendo os dados submetidos à análise de variância aplicando-se o teste F. Os dados dos resultados do escore de qualidade de pinto ao nascer foram submetidos à análise estatística não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste Exato de Fisher. Para as variáveis de desempenho os dados foram submetidos à análise de variância. Também foi aplicado o teste t para calcular as correlações de Pearson entre as variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso ao nascer, o comprimento corporal e o peso do pinto na expedição no incubatório foi avaliado após a eclosão, sendo maiores para as aves inoculadas com 25(OH)D₃, mas não se observou diferença significativa (Tabela 3). Registrou-se, significativamente, um menor período médio de incubação (TI) para as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃, obtendo-se 495,9 horas para as aves inoculadas com 25(OH)D₃ e 499,5 horas para o grupo controle (Tabela 3).

TABELA 3 Médias dos resultados de qualidade de eclosão da incubação de 180 ovos em máquina de estágio único provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Variável	Tratamentos		P	CV(%)
	Controle	25(OH)D ₃		
Peso ovo incubação (g)	60,75	61,36	0,2317	5,39
Peso ovo transferência (g)	53,37	53,72	0,5160	6,44
Perda de peso incubação (%)	12,47	12,17	0,4981	22,83
Tempo incubação (h)	499,5 b	495,9 a	<0,001	1,09
Peso ao nascer (g)	44,34	44,92	0,2625	6,67
Peso expedição (g)	43,36	44,16	0,3686	11,11
Comprimento do pintainho (mm)	166,10	167,70	0,1100	3,16

*Médias estatisticamente diferentes pelo teste F de análise de variância ($p < 0,001$) CV = coeficiente de variação.

O tempo de incubação total no presente experimento (Tabela 3) foi de 506,5h para ambos os tratamentos, obtendo-se 90,18% de eclosão para as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ e 85,17% para o grupo controle. Os resultados de eclosão entre os tratamentos apresentaram diferença significativa, obtendo-se maior eclosão as aves inoculadas com 25(OH)D₃. O desenvolvimento embrionário das aves inoculadas com 25(OH)D₃ foi mais precoce em relação ao nascimento do tratamento controle, resultando em efeitos positivos sobre a eclodibilidade dos ovos. De acordo com ITO et al., 2008), o 25(OH)D₃ é essencial para a formação do osso, da casca do ovo e para eclosão dos pintainhos, pois estimula e modula a síntese de proteínas, regula a absorção de cálcio no intestino e na membrana do saco da gema do embrião, sendo responsável por até 90% da absorção do cálcio encontrado no

sangue. Além de aumentar a permeabilidade do fósforo no intestino e promover o alongamento das vilosidades intestinais.

No presente experimento, foi possível verificar que o comprimento do corpo apresentou correlação negativa com o tempo ao nascimento. Ou seja, os pintainhos que nasceram em menor tempo apresentaram maior comprimento do que aqueles que nasceram mais tardiamente (Tabela 4). Observou-se alta correlação ($p= 0,783$) do peso dos ovos antes da incubação e na transferência com o peso dos neonatos ao nascer e na expedição, fato esperado e sem relação com os tratamentos (Tabela 4).

TABELA 4 Resultados de correlações de Pearson para os valores de POI: peso do ovo incubação (g); POT: peso do ovo transferência (g); PP: perda de peso (%); TI: tempo incubação (horas); PN: peso ao nascer (g); PE: peso expedição (g); CP: comprimento do pintainho (mm) de frangos de corte com um dia de idade, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

	POI	POT	PP	TI	PN	PE	CP
POI	1,0000	0,8616*	-0,0964	0,1684	0,7832*	0,7832*	0,2016*
POT		1,0000	-0,5252*	0,1135	0,8957*	0,8907*	0,1931*
PP			1,0000	0,0924	-0,4649*	-0,3497*	0,0469
TI				1,0000	0,0964	0,3013*	-0,1972*
PN					1,0000	0,9187*	0,1787*
PE						1,0000	0,1000
CP							1,0000

* Valores de correlação acima de 0,17 e abaixo de -0,17 são estatisticamente diferentes, pelo teste t, com nível de significância de 5%.

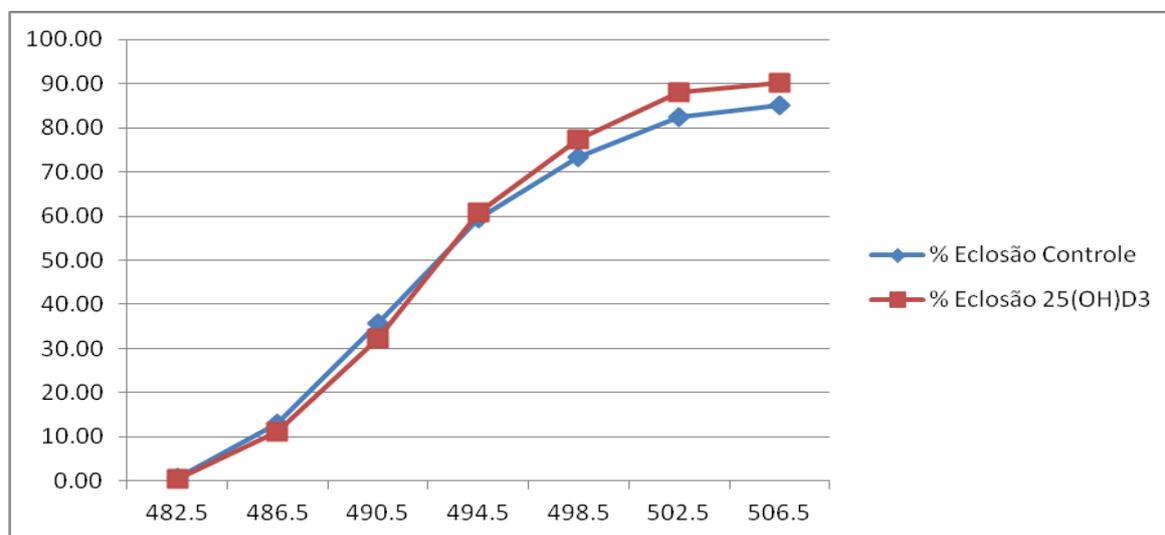
A janela de nascimento de ambos os tratamentos (Tabela 5) foi considerada boa, com um intervalo de 24 horas. Caracterizou-se com uma base estreita (menor intervalo entre primeiros e últimos), pico alto (maior concentração de nascimento) e menor coeficiente de variação (Figura 1). De acordo com CALIL (2010), o processo de incubação realizado em máquinas de estágio único, apresenta-se características de redução da janela de nascimento nesses modelos de máquinas, o que propicia melhores condições de hidratação para os pintainhos

que nasceram primeiro. A redução da janela de nascimento pode ser estimada entre quatro e oito horas, visto que essas máquinas são providas de sistemas automatizados de eclosão que associam as variáveis de temperatura, umidade e gás carbônico para controlar em tempo real a curva de nascimento dos embriões.

TABELA 5 Média acumulada de nascimento dos neonatos referente à incubação de 2.752 ovos em máquina de estágio único, amostrados por bandeja de 86 ovos, provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Tempo (h) Incubação	Tratamentos		Médias
	Controle	25(OH)D ₃	
482.5	0,56	0,19	0,38
486.5	11,25	9,62	10,44
490.5	30,69	27,75	29,22
494.5	51,12	52,37	51,75
498.5	63,18	66,56	64,87
502.5	70,93	75,68	73,31
506.5	73,25 b	77,56 a	75,41

* Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de análise de variância ($p < 0,05$).



Janela (h)	intervalo	482,5	486,5	490,5	494,5	498,5	502,5	506,5
25(OH)D ₃	%	0,44	11,19	32,27	60,90	77,40	88,01	90,19
Controle	%	0,65	13,08	35,68	59,45	73,47	82,49	85,17

FIGURA 1 Distribuição da janela de nascimento (eclosão) dos neonatos provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

A maior eclodibilidade observada para os ovos inoculados com 25(OH)D₃ em relação ao grupo controle foi semelhante aos resultados de ATENCIO et al. (2006) que, ao avaliarem reprodutoras suplementadas com maiores doses de vitamina D₃ e 25(OH)D₃, observaram melhor eclodibilidade e qualidade dos ovos. Entretanto, contradiz com os resultados de TORRES (2008) que não observou diferença na eclodibilidade dos ovos ao aumentar as doses de vitamina D₃ e 25(OH)D₃ na ração de reprodutoras de frango de corte.

A resposta da escolha da dose de vitamina D₃ e 25(OH)D₃ nas pesquisas científicas estão relacionadas com a quantidade de colecalciferol presente no ovo, portanto nem sempre os resultados serão semelhantes. Segundo SELL & JERRY (1994), a vitamina D presente na gema do ovo é metabolizada pelo embrião e utilizada para formação do esqueleto da ave.

GONZALES et al. (2003a) avaliaram os pesos dos pintainhos logo após o nascimento e no alojamento e observaram diferença, relacionada ao nível de suplementação *in ovo* de 25(OH)D₃, com tendência linear e negativa nas quantidades correspondentes a 0,00; 0,625; 1,250 e 1,875 µg de 25(OH)D₃.

Segundo AMMENUDDIN et al. (1982), a maior habilidade da forma hidroxilada do 25(OH)D₃ de ser transferida para os ovos e conseqüentemente para o embrião é o fator que melhora o desenvolvimento embrionário e a eclodibilidade dos ovos quando fornecido como única fonte de vitamina D, o que se observou na presente pesquisa. Porém, as quantidades administradas devem ser levadas em consideração ao analisar aos resultados dessas variáveis.

De acordo com NARBER (1993), a eficiência de transferência de vitamina D da dieta das reprodutoras para os ovos, é considerada média. E a simples elevação dos níveis de suplementação para as reprodutoras, pode não ser eficiente, pois a demanda dessa vitamina pode ser afetada por condições específicas da dieta ou pela forma molecular da mesma (VIEIRA, 2005).

Na avaliação do embriodiagnóstico, com relação aos resultados dos ovos amostrados por bandeja da incubação na máquina de estágio único (Tabela 6) não se observou diferença ($p>0,05$) para os tratamentos utilizados. Entretanto, os resultados de bicados vivos apresentaram diferença ($p=0,0634$) para as aves inoculadas com 25(OH)D₃. Como na retirada dos pintainhos do nascedouro foi observado possibilidade de maiores eclosões, após as 506,5 horas, quando se

finalizou a contagem das eclosões é possível inferir que o percentual de eclosão aumentasse se houvesse ainda a contagem a mais após quatro horas. Visto que nesse experimento não se observou antecipação do nascimento para as aves inoculadas com 25(OH)D₃ e sim o aumento do percentual de eclosão do meio para o final da janela de nascimento.

TABELA 6 Resultados de mortalidade embrionária da incubação de 2.752 ovos em máquina de estágio único, amostrados por bandeja, provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Embriodiagnóstico	Controle	25(OH)D ₃	P*
Inférteis, %	29/147	13/110	0,1242
Mort. Embrionária 0-7dias, %	56/147	56/110	0,0975
Mort. Embrionária 8-14dias, %	15/147	14/110	0,5547
Mort. Embrionária 15-18dias, %	16/147	7/110	0,2709
Mort. Embrionária 19-21dias, %	7/147	4/110	0,7626
Bicado vivo, %	5/147	10/110	0,0634
Bicado morto, %	0/147	1/110	0,4280
Pintos nascidos anormais, %	4/147	1/110	0,6212
Trincados na transferência, %	8/147	6/110	0,9999
Posição errada, %	9/147	3/110	0,4977

* Diferença não significativa pelo teste Exato de Fisher (p>0,05).

Avaliando-se os dados de peso inicial, peso aos sete dias, peso final e conversão alimentar no presente experimento (Tabela 7), pode-se perceber que o desempenho até aos 21 dias não foi significativo.

No entanto, a mortalidade das aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ foi menor (p=0,0612) que as aves do tratamento controle. Pode-se perceber que houve aumento considerável da mortalidade das aves do tratamento controle.

Existem poucos trabalhos de pesquisa com inoculação *in ovo* utilizando o metabólito 25(OH)D₃. A maioria dos dados de literatura descrevem melhorias relacionadas com o desempenho quando se utiliza o produto na ração das aves. Os resultados da inoculação *in ovo* utilizando o metabólito 25(OH)D₃, indicam que a vitamina D melhora a viabilidade dos frangos de corte até a idade de abate por mecanismos ainda desconhecidos.

TABELA 7 Resultado de desempenho de frangos de corte machos aos 21 dias de idade, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Desempenho (um – 21dias)	Tratamentos		P*	CV(%)
	Controle	25(OH)D ₃		
Peso médio (g) um dia	41,53	41,68	0,6842	1.35
Peso médio (g) sete dias	200,5	193,9	0,2907	4.72
Conversão alimentar sete dias	0,8674	0,8822	0,6900	6.47
Peso médio (g) 21 dias	903,2	881,8	0,4938	5.29
Conversão alimentar 21 dias	1,2492	1,2504	0,9787	5.51
Mortalidade (%)	10,0%	1,7%	0,0612	**

*Diferença não significativa pelo teste de análise de variância ($p>0,05$). CV = coeficiente de variação. ** Diferença não significativa pelo teste de teste de Wruskal-Wallis ($p>0,05$).

GONZALES et al. (2003a) ao inocularem 25(OH)D₃ manualmente 312 ovos com embriões viáveis de 16 dias de incubação, obtidos de lotes de matrizes Cobb 500 de 49 semanas de idade, via cavidade amniótica, com 0,3 mL de soluções contendo 0,00; 0,625; 1,250 e 1,875 µg de 25(OH)D₃ não observaram diferença no desempenho das aves aos 10 dias quando usou níveis crescentes de 25(OH)D₃. Entretanto, a mortalidade foi diminuída para os tratamentos que receberam 25(OH)D₃, à semelhança do que ocorreu na presente pesquisa. Os resultados indicaram que a vitamina D melhorou a viabilidade dos frangos de corte criados em baterias até 21 dias de idade.

CAMPOS (2007) observou redução de 3,13% de mortalidade na 1ª semana e 5,08% até 21 dias de idade quando suplementou 0,5 mL de solução de vitaminas, contendo 1,2 mg de D₃, porém não encontrou resultado significativo na mortalidade e no desempenho das aves ($p>0,05$). O autor descreveu redução de 6,07% da eclodibilidade ao comparar com o tratamento controle, mas atribuiu ao volume de solução inoculado, já que a osmolaridade das soluções estavam compatíveis com as recomendações de FERKET et al. (2005) que devem ser mantidas entre 400 e 650 mOsm.

4. CONCLUSÃO

A suplementação do metabólito 25(OH)D₃ da vitamina D₃ pode ser aplicada utilizando a técnica de vacinação industrial *in ovo*.

A utilização do aditivo 25(OH)D₃ *in ovo* é efetiva na melhoria da eclodibilidade dos ovos férteis de matrizes pesadas incubados em máquinas de estágio único.

A administração *in ovo* do metabólico 25(OH)D₃ não melhora o desempenho de frangos de corte machos até 21 dias de idade.

REFERÊNCIAS

1. AMEENUDDIN, S.; De LUCA, H.F.; IKEKAWA, N.; KOBAYASHI, Y. 24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃: is it required for embryonic development in chicks. **Science**, v.217, p. 451-452, 1982.
2. APPEGATE, T. J.; ANGEL, R.; CLASSEN, H. L. Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, and bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v.82, p.1140-1148, 2003.
3. ATENCIO, A.; EDWARDS, H.M.; PESTI, G.M.; WARE, G.O. The vitamin requirement of broiler breeders. **Poultry Science**, v.85, p. 674-692, 2006.
4. CALIL, T. Ferramentas para Redução da Janela de Nascimento de Pintos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2010 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2010, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: FACTA, 2010. p. 215-230.
5. CAMPOS, A. M. A. **Efeito da inoculação *in ovo* de soluções nutritivas sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos de corte**. VIÇOSA (MG): UFV, 2007. 65f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
6. CRUZ, C.P.; STRINGHINI, J.H.; CUNHA, W.C.P.; BRITO, A.B.; GONZALES, E. Viabilidade da aplicação *in ovo* de ácido orgânico em embriões de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: FACTA, 2003. Supl.5, p. 13, 2003a.
7. CRUZ, C.P.; STRINGHINI, J.H.; XAVIER, S.A.G.; LEANDRO, N.S.M.; GONZALES, E. Aplicação de probiótico em ovos embrionados de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Supl.5, p. 12, 2003b.
8. FERKET, P, DE OLIVEIRA, J., GHANE, A., UNI, Z. Effect of *in ovo* feeding solution osmolality on hatching turkeys. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 118, 2005.
9. GONZALES, E.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Editora Facta. Campinas, SP, 2000.
10. GONZALES, E.; OLIVEIRA, A.S.C.; CRUZ, C.P.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; BRITO, A.B. *In ovo* supplementation of 25 (OH)D₃ to broiler embryos. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003, Lillehammer. **Proceedings...** Lillehammer: WPSA, 2003a, p. 72-74.

11. GONZALES, E.; OLIVEIRA, A.S.C.; CRUZ, C.P.; LEANDRO, N.S.M.; ANDRADE, M.A.; STRINGHINI, J.H.. El uso *in ovo* de probiótico en embriones de pollos para carne. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 14, 2003, Santa Cruz de la Sierra. **Anais...** Santa Cruz de la Sierra, Bolivia: Asociación Latinoamericana de Avicultura, 2003b, CD-ROM.
12. ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. **Doenças do Sistema Esquelético em Frangos (Patogênese e Patogenia)**, Ed: DSM NUTRITIONAL PRODUCTS, 2008. p.2-86.
13. JOCHEMSEN, P, JEURISSEN, SHM. The localization and uptake of *in ovo* injected soluble and particulate substances in the Chicken. **Poultry Science**, v.81, p.1811–1817, 2002.
14. NABER, E. C.; SQUIRES, M. W. Vitamine profiles of eggs as indicators of nutritional status in the laying hen: diet to egg transfer and commercial flock survey. **Poultry Science**, v. 72, n. 6, p. 1046-1053, 1993.
15. R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available at < <http://www.R-project.org/>> assessed in 2012.
16. SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 2007. 283p.
17. SELL, JERRY L. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9 Revised Edition. National Academy Press, 1994. 176p.
18. SBCAL/COBEA: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) **Proteção e Bem Estar de Animais de Laboratório**. <http://www.cobea.org.br/>
19. TONA, K.; BAMELIS, F.; DE KATELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; MORAES, V.B.M.; BUYSE, J.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of storage time on spread of hatch, chick quality and chick juvenile growth. **Poultry Science**, v.82, p. 763-741, 2003.
20. TORRES, C. **Desempenho produtivo de reprodutoras de frangos de Corte suplementadas com 25-hidroxicolecalciferol**. Porto Alegre (RS): UFRGS, 2008. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
21. UNI, Z., TAKO, E. GAL-GARBER, O., SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003.

- 22.VIEIRA, S.L; POPHAL, S. Nutrição do embrião. **Ave World**, v.18, n.3, p. 66-71, 2005.
- 23.WEBER, G. Symposium conference: The use of 25(OH)D₃. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003. **Proceedings...** WPSA: Lillehammer, 2003.
- 24.WILLIAMS, C. J. Princípios fundamentais e fatores fisiológicos da injeção *in ovo*. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: FACTA, 2004. p. 171-177.
- 25.WILSON, H. R. Effects of Maternal Nutrition on Hatchability. **Poultry Science**, v. 76, p.134-143, 1997.

CAPÍTULO 4. QUALIDADE DE PINTAINHOS NEONATOS E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE ATÉ 35 DIAS OBTIDOS DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL *IN OVO*

RESUMO: Objetivou-se avaliar a qualidade de neonatos e o desempenho em frangos originados de embriões aos 19 dias de desenvolvimento embrionário, suplementados *in ovo* com 25-D-hidroxi-colecalciferol, 25(OH)D₃. A incubação foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A em máquina de estágio único, utilizando 2.752 ovos de matrizes Cobb 500 com 45 semanas de idade. Na transferência e vacinação, os ovos com embriões viáveis foram inoculados com a solução controle e com 25(OH)D₃ incorporados na vacina. A compatibilidade do produto foi avaliada anteriormente e as dosagens utilizadas foram zero e 1,250µg de 25(OH)D₃ equivalentes a 50 UI de vitamina D₃. Os ovos foram acondicionados em sacos de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato. O nascimento foi acompanhado a cada quatro horas, avaliando-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade, a mortalidade embrionária (percentual, período de ocorrência e causas aparentes), os pesos e comprimentos dos neonatos e a qualidade do pintainho. Após pesagem, qualificação e sexagem, 840 pintos de corte, machos foram enviados para o aviário experimental da UFG e distribuídos em 24 boxes. Pesaram-se as aves, as dietas e as aves mortas para cálculo do desempenho até 35 dias de idade. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e doze repetições de 35 aves cada, totalizando 840 pintos em 24 unidades experimentais. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos para os resultados de eclodibilidade dos ovos férteis, mortalidade embrionária e qualidade do neonato. Também, não houve influência ($p>0,05$) para peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar de um a 35 dias de idade. Portanto, a utilização do aditivo *in ovo* não é efetiva na melhoria do desempenho dos frangos.

Palavras-chaves: embrião, frango de corte, suplementação *in ovo*, vitamina D.

CHAPTER 4 – CHICK QUALITY AND BROILER PERFORMANCE UNTIL 35 DAYS OF AGE OBTAINED FROM EMBRYOS SUPPLEMENTED WITH 25-HYDROXY-CHOLECALCIFEROL *IN OVO*

ABSTRACT: This work was carried out to evaluate the quality of newborn chicks, males and females, hatched from embryos supplemented *in ovo* with 25-D-hydroxy-cholecalciferol, 25(OH)D₃ at 19 days of embryo development. Chicks were hatched in one stage hatcheries with 2752 eggs 45-week old Cobb 500® breeder. During the transference and vaccination, fertile and viable eggs were inoculated with placebo or 25(OH)D₃ solution incorporated in the vaccine and the compatibility of the mix were tested with two dosis, zero and 1,250µg of 25(OH)D₃ equivalent to 50 UI of vitamin D₃. Eggs were placed in air-permeable bags in order to discriminate the chicks and eggshell components. The hatch was checked each four hours to evaluate incubation period (hours), hatchability, embryo mortality (percentage, period and apparent causes), weight and length and quality score of the newborn chicks. After weighing in the hatchery, 840 male day-old chicks were housed in 24 experimental pens, and chicks and diets were weighed until 35 days of age. Experiment was conducted in a completely randomized design in a with two treatments and 12 replicates of 35 birds each. Data was analyzed by ANOVA and data compared by F test with 5% probability levels. No difference was observed ($p>0.05$) for hatchability, embryo mortality and newborn chick quality. No influence either was verified ($p>0.05$) for average live weight, weight gain, feed intake and feed conversion from one to 35 days of age. It is possible to observe that the use on 25(OH)D₃ inoculated *in ovo* was not effective to improve performance in broilers.

Keywords: embryo, broiler, supplementation *in ovo*, vitamin D.

1. INTRODUÇÃO

A suplementação *in ovo* de nutrientes, como a vitamina D, pode favorecer a diminuição da mortalidade embrionária tardia, melhorando a eclodibilidade dos ovos e permitindo o desenvolvimento normal do tecido ósseo no período neonatal do pintainho e na fase inicial de criação (GONZALES et al., 2003).

Um dos produtos testados para suplementar os pintainhos antes do nascimento é o intermediário ativo da vitamina D₃, 25-D-hidroxi-colecalciferol (25(OH)D₃). O objetivo é fornecer fonte exógena de uma vitamina essencial para o crescimento ósseo na forma intermediária de mais rápida utilização que a vitamina D₃ (WEBER, 2003), independentemente do aporte proveniente da matriz.

Para exercer sua função no organismo animal, é necessário que o colecalciferol (vitamina D₃) passe por dois processos metabólicos, no fígado onde é transformada em 25(OH)D₃ e posteriormente no rim, transformando-se em 1,25(OH)₂D₃, metabolicamente ativo nos processos fisiológicos do animal (PIZAURO Jr., et al. 2002).

O produto 25(OH)D₃ é solúvel em água e absorvido no intestino mais eficientemente do que o colecalciferol, a fonte de vitamina D₃ comumente utilizada como suplemento em rações avícolas. A suplementação de 25(OH)D₃ é particularmente interessante para os pintainhos neonatos, para os quais a absorção de gordura dietética é relativamente deficiente na fase inicial (WEBER, 2003).

A finalidade é fornecer uma fonte intermediária exógena *in ovo*, de utilização mais rápida que a vitamina D₃, preparando o pintainho para o adequado crescimento ósseo. Do ponto de vista fisiológico, uma das funções da vitamina D₃ é a de controlar a absorção de cálcio pelo trato digestivo, induzindo a síntese da proteína carreadora de cálcio, quando necessário. Essa função estaria prejudicada no embrião, mas plenamente atendida no pintainho alimentado após a eclosão. Com estrutura óssea mais resistente, o pintainho suportaria o intenso crescimento muscular prevenindo o aparecimento de problemas relacionados com o esqueleto (GONZALES et al., 2009).

As pesquisas têm indicado que o uso de 25(OH)D₃ determina um melhor desempenho dos frangos de corte à idade de abate, com marcante diminuição da incidência de DT (WEBER, 2003). De acordo com UNI et al. (2004), a função hepática do neonato e, portanto, do embrião na fase final de desenvolvimento, é considerado imaturo.

Em pesquisa com suplementação de 25(OH)D₃, GONZALES et al. (2003) verificaram que o produto determinou estímulo metabólico ao embrião, diminuindo o tempo de eclosão sem, entretanto, afetou a qualidade do neonato ou o desempenho dos pintos até 10 dias de idade. Os autores indicaram que é necessária a continuação dos estudos da alimentação exógena com o produto em pesquisas que envolvam a avaliação da qualidade do esqueleto e a relação com problemas de pernas em frangos de corte. Com os resultados de GONZALES et al. (2003) é possível concluir que a alta atividade metabólica do embrião estimulada pelo 25(OH)D₃ influenciou o tempo do nascimento e, conseqüentemente, o peso do pinto ao nascer.

Diante da complexidade, torna-se necessária a realização de pesquisas nessa área, visando esclarecer possíveis efeitos do aumento ou da redução da suplementação de vitamina D₃ e seus metabólitos nas dietas pré-eclosão *in ovo* de embriões de frango de corte. Por isso, espera-se que uma suplementação adequada de vitamina D estimule o crescimento da ave na fase de extrema atividade metabólica, durante o crescimento embrionário e após a eclosão.

Com este trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação de 25(OH)D₃ nos índices de eclodibilidade, de mortalidade embrionária, na qualidade do neonato e na produtividade de frangos de corte até 35 dias de idade originados de embriões suplementados *in ovo* com 25(OH)D₃ aos 19 dias de desenvolvimento embrionário.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização

A incubação experimental foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A, localizado em Itaberaí, Goiás, Brasil.

Posteriormente, os neonatos foram encaminhados para o aviário experimental do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás – UFG em Goiânia, Goiás, Brasil. e criados por 35 dias.

O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº 014/12, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Instalações, equipamentos e manejo experimental no incubatório

A incubação foi conduzida em máquina de estágio único utilizando 2.752 ovos, sendo 1.376 ovos inoculados com 1,250 µg de 25(OH)D₃ na solução vacinal e 1.376 ovos sem o metabólito da vitamina D₃. Paralelamente, foram selecionados 180 ovos por peso antes da incubação e destinados para análise individual. Os ovos foram obtidos de matrizes pesadas com 45 semanas de idade da linhagem Cobb 500®. Nessa pesquisa, não foi levado em consideração o aporte de vitamina D₃ e seus metabólitos proveniente das matrizes pesadas.

No momento da transferência e da vacinação, os ovos com embriões viáveis foram inoculados, com solução vacinal, sem o metabólito da vitamina D₃ e com 1,250 µg de 25(OH)D₃, correspondente a zero e 50 UI de vitamina D₃, respectivamente.

A compatibilidade do produto com a solução vacinal foi avaliada anteriormente, constatando-se a titulação e a integridade da partícula viral na presença do metabólito da vitamina D₃. A titulação da vacina de Marek e Gumboro diluída com adição da substância 25(OH)D₃ não apresentaram resultados significativos entre os diferentes tempos (T0, T30 e T60) de suspensão

da vacina. A adição do produto 25(OH)D₃ não interferiu na titulação quando comparado com o grupo controle negativo seguindo a técnica de titulação em cultivo celular de fibroblasto de embriões de galinhas utilizada pelo controle de qualidade do laboratório da Merial Saúde Animal. Após a vacinação, foram acondicionados 180 ovos em sacos de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato ao seu tratamento. Para cada ovo, o período de incubação foi definido como o tempo entre a colocação em condições de incubação artificial e o efetivo nascimento.

Instalações, equipamentos e manejo experimental no aviário

Para conduzir o experimento a campo, foram utilizadas instalações em galpão para criação em piso construído de alvenaria com 17 x 8m de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé direito de 2,32m, coberto com telhas francesas, muretas de concreto com 0,46m nas laterais e tela de arame atingindo 1,7m de altura. Foram utilizados 24 boxes com dimensionamento de 2 x 1m cada, nos quais, foram alojadas 35 aves.

A preparação do galpão para recepção dos lotes obedeceu às normas usuais de limpeza e desinfecção das instalações (telhas, telas, cortinas, piso, área externa, equipamentos), preconizando-se dez dias para limpeza, desinfecção com pulverização de desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído e sete dias para vazio sanitário. Os comedouros tubulares e bebedouros pendulares foram limpos e abastecidos duas a três vezes ao dia durante a criação do lote.

O aquecimento do aviário foi realizado por meio de uma central de gás P-90 distribuído para um sistema contendo seis campânulas dispostas equidistantes, sendo a temperatura, também, controlada e monitorada todo o tempo de aquecimento, previsto para as duas primeiras semanas de vida do pintainho. O sistema de iluminação adotado durante o período de criação (35 dias) foi de 23H de luz e 1H de escuro. O galpão possuía forração interna no teto e proteção na parte externa por uma cortina com sistema de catracas para sua movimentação. Associado ao manejo de aquecimento e de iluminação, o manejo das cortinas auxiliou na manutenção da temperatura adequada para as aves. O sistema de ventilação negativa e nebulização foram monitorados por um sistema

de painel de controle, pelo qual, todos os registros de temperatura e umidade foram armazenados para análise da condição ambiente e conforto das aves em qualquer período do dia.

Programa alimentar

Após o alojamento, as aves receberam ração e água *ad libitum*. A ração foi oferecida na forma farelada e formulada de acordo com as recomendações nutricionais utilizada na empresa São Salvador Alimentos S/A na época da presente pesquisa. A composição das dietas experimentais utilizadas no experimento na fase inicial (um a 21 dias) e na fase crescimento (21 a 35 dias) está apresentada na Tabela 1, com os respectivos níveis nutricionais (Tabela 2).

TABELA 1 Composição percentual das dietas utilizadas no experimento durante as fases inicial (1 a 21 dias) e crescimento (21 a 35 dias)

Ingredientes, %	Inicial	Crescimento
Milho grão	58,89	67,77
Farelo de soja 46,5%	20,52	16,96
Farinha de carne 45%	4,20	3,20
Soja integral tostada 36%	14,40	1,73
Farinha de penas 79%	-	1,66
Farinha de vísceras 12%	-	2,33
Farinha de sangue 89%	-	0,93
Gordura de aves	-	2,33
Calcáreo 37%	0,47	0,53
Sal branco comum	0,34	0,28
Bicarbonato de sódio	0,10	0,13
DL-metionina 98%	0,32	0,28
Lisina 64%	0,33	0,46
Treonina 98%	0,06	0,06
Colina 75%	0,06	1,10
Suplemento vitamínico e mineral **	0,10	0,10
Aditivos *	0,21	0,22
Total	100	100

**Suplemento vitamínico e mineral fase inicial para frangos, níveis de garantia por quilograma de ração: 10.000 UI Vitamina A, 2.500 UI Vitamina D3, 25 UI Vitamina E, 2 mg Vitamina K3, 2,5 mg Vitamina B1, 6,5 mg Vitamina B2, 3,5 mg Vitamina B6, 18 µg Vitamina B12, 42 mg Niacina, 15 mg Ácido Pantotênico, 1,2 mg Ácido fólico, 0,08 mg Biotina, 0,3 mg Selênio, 0,075 mg Manganês, 62,5 mg Zinco, 50 mg Ferro, 8,125 g Cobre, 1 mg Iodo Veículo q.s.p. * Aditivos inicial: nicarbazina 25%; bacitracina de zinco 15%; sulfato de cobre 35%; anti-oxidante; anti-salmonela; anti-fúngico e enzima.

**Suplemento vitamínico e mineral fase crescimento para frangos, níveis de garantia por quilograma de ração: 8.000 UI Vitamina A, 1.900 UI Vitamina D3, 20 UI Vitamina E, 1,8 mg Vitamina K3, 1,8 mg Vitamina B1, 5,5 mg Vitamina B2, 2,6 mg Vitamina B6, 15 µg Vitamina B12, 35 mg Niacina, 13 mg Ácido Pantotênico, 0,9 mg Ácido fólico, 0,05 mg Biotina, 0,3 mg Selênio, 0,075 mg Manganês, 62,5 mg Zinco, 50 mg Ferro, 8,125 g Cobre, 1 mg Iodo Veículo q.s.p. * Aditivos cresc.: nicarbazina 25%; bacitracina de zinco 15%; sulfato de cobre 35%; anti-oxidante; anti-salmonela; anti-fúngico e enzima.

TABELA 2 Composição nutricional calculada das dietas utilizadas no experimento durante as fases inicial (um a 21 dias) e crescimento (21 a 35 dias)

Nutrientes e energia, %	Unidade	Inicial	Crescimento
Proteína bruta	%	21,75	20,00
Gordura	%	6,11	6,34
Cinza	%	5,51	4,95
Cálcio	%	0,93	0,90
Cálcio/fósforo		1,97	1,96
Fósforo total	%	0,61	0,56
Fósforo disponível	%	0,47	0,46
Energia metabolizável	kcal/kg	3.099	3.239
Lisina total	%	1,29	1,19
Lisina digestível	%	1,17	1,08
Metionina total	%	0,63	0,57
Metionina digestível	%	0,60	0,54
AAS total	%	0,97	0,92
AAS digestível	%	0,87	0,82
Treonina total	%	0,85	0,80
Treonina digestível	%	0,74	0,69
Triptofano total	%	0,24	0,20
Triptofano digestível	%	0,21	0,17
Isoleucina total	%	0,89	0,77
Isoleucina digestível	%	0,80	0,69
Valina digestível	%	0,87	0,86
Arginina total	%	1,42	1,23
Arginina digestível	%	1,30	1,12
Colina	mg/kg	1.699	1.600
Na	%	0,21	0,20
Cl	%	0,30	0,27
K	%	0,87	0,64
Na+Cl+K	mEq/100g	230,12	174,39

* São Salvador Alimentos S/A.

Delimitação Experimental

O delineamento experimental aplicado no incubatório foi um fatorial 2 x 2, sendo que os ovos foram distribuídos em 32 bandejas de 86 ovos e estas foram colocadas nos mesmos níveis em 16 andares para ambos os tratamentos, totalizando 16 repetições, tanto na incubadora como no nascedouro.

O delineamento experimental aplicado no aviário foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e doze repetições de 35 frangos de corte machos por unidade experimental, totalizando 840 em 24 unidades experimentais.

- Tratamento 1 = controle: 420 pintainhos machos de um dia, provenientes de embriões inoculados com solução vacinal, sem 25(OH)D₃, correspondente a zero UI de vitamina D₃.
- Tratamento 2 = 25(OH)D₃: 420 pintainhos machos de um dia, provenientes de embriões inoculados com 1,250 µg de 25(OH)D₃, correspondente 50 UI de vitamina D₃ na solução vacinal.

Variáveis analisadas

As variáveis analisadas estão mencionadas no Quadro 1 com suas respectivas unidades.

QUADRO 1 Variáveis analisadas - mortalidade embrionária, escore de qualidade dos pintainhos e pesos e medidas no nascimento

Mortalidade Embrionária	Escore Neonato	Avaliação de peso e medidas no nascimento
Inférteis, %	Atividade	TI: tempo incubação, horas
Mort. Embrionária 0-7dias, %	Umbigo	PN: peso ao nascer, g
Mort. Embrionária 8-14dias, %	Membrana	PE: peso expedição, g
Mort. Embrionária 15-18dias, %	Abdômen	CP: comprimento do pinto, mm
Mort. Embrionária 19-21dias, %	Pernas	Janela de nascimento, %
Bicado vivo, %	Canela	Taxa de eclosão, %
Bicado morto, %	Olhos	Eclodibilidade, %
Pintos nascidos anormais, %	Penugem	
Trincados na transferência, %	Total	
Posição errada, %		
Contaminados, %		

Avaliação da eclodibilidade e mortalidade embrionária dos ovos férteis

O nascimento foi acompanhado a cada quatro horas, avaliando-se o período de incubação (horas), a eclodibilidade, a mortalidade embrionária (percentual, período de ocorrência e causas aparentes), os pesos ao nascimento e a qualidade dos neonatos.

Os resultados de eclodibilidade, mortalidade embrionária, qualidade da eclosão e dos neonatos incubados em máquina de estágio único foram avaliados nos 180 ovos amostrados e nas 32 bandejas de 86 ovos. Concluído o nascimento, os pintainhos foram retirados do nascedouro e classificados.

Antes da classificação dos neonatos os ovos não eclodidos foram submetidos à análise de embriodiagnóstico. Por meio do embriodiagnóstico foi possível obter o total dos ovos inférteis e por diferença entre este e o número total de ovos incubados e eclodidos.

A porcentagem de eclosão ou taxa de eclosão é uma medida da eficiência do processo de incubação artificial e é realizada após a retirada dos neonatos do nascedouro com a contagem total dos nascidos em relação ao total de ovos incubados, e foi determinada pela equação: $\text{eclosão} = (\text{n}^{\circ} \text{ total de ovos que eclodiram} / \text{n}^{\circ} \text{ total de ovos incubados}) \times 100$.

A eclodibilidade foi determinada realizando o exame de resíduo de uma amostra de ovos que não eclodiram. Neste exame é feita a quebra dos ovos com posterior análise visual e contagem dos inférteis. Portanto, o cálculo da eclodibilidade é realizado pela equação: $\text{eclodibilidade} = (\text{n}^{\circ} \text{ total de ovos que eclodiram} / \text{n}^{\circ} \text{ total de ovos férteis incubados}) \times 100$.

Avaliou-se, também, a dispersão/janela do nascimento de cada tratamento referente ao intervalo determinado para registro dos nascimentos. Decorridos cerca de 520 horas de incubação, todos os neonatos foram pesados e examinados macroscopicamente para definir a sua qualidade.

As avaliações de embriodiagnóstico foram realizadas no incubatório, seguindo o padrão estabelecido no Quadro 2.

QUADRO 2 Padrão estabelecido para as avaliações de embriodiagnóstico*

Embriodiagnóstico	Padrão
Eclosão, %	90,00
Inférteis, %	3,30
Mort. Embrionária 0-7dias, %	3,20
Mort. Embrionária 8-14dias, %	0,50
Mort. Embrionária 15-18dias, %	1,10
Mort. Embrionária 19-21dias, %	1,22
Bicado vivo, %	0,20
Bicado morto, %	0,20
Pintos nascidos anormais, %	0,00
Trincados na transferência, %	0,00
Posição errada, %	0,10
Contaminados, %	0,00

* São Salvador Alimentos S/A.

Avaliação da qualidade dos pintainhos

A qualidade dos pintos foi medida seguindo o procedimento recomendado por TONA et al. (2003) descritos no Quadro 3 e Quadro 4.

QUADRO 3 Definição dos parâmetros de qualidade dos pintos neonatos

Parâmetro	Definição
Atividade	Verificada quando se coloca o pintainho de costas. Um rápido retorno à posição em pé é definida como boa. Se permanecer de costas, é definido como fraca.
Penugem e aparência	A aparência deve ser limpa e seca. Se estiver úmida e suja ou ambos, é cotada como ruim.
Olhos	Coloca-se o pintainho em pé e observam-se seus olhos. O brilho e a extensão que ocupa a pálpebra sobre o olho.
Pernas	O pintainho é colocado em pé para determinar se permanece firme nessa posição. A conformação dos dedos é examinada. Se houver dificuldade de permanecer em pé, examina-se a articulação do joelho para verificar se há sinais de inflamação.
Canela	Observa-se o brilho e a cor da canela. A normal deve ser avermelhada e brilhante.
Área do umbigo	Examina-se a área do umbigo e ao redor dele, verificando-se o seu fechamento e sua cor. Se a cor for diferente da cor da pele, registra-se como de má qualidade.
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.
Resíduo vitelino	A observação da área do umbigo permite estimar do tamanho do resíduo vitelino. O tamanho será classificado em muito grande, grande ou pequeno.

Adaptado de TONA et al. (2003)

QUADRO 4 Alocação dos escores para os parâmetros de qualidade neonato

Parâmetro	Característica	Escore
Atividade	Bom	16
	Médio	8
	Fraco	0
Penugem e aparência	Limpa e seca	16
	Limpa e úmida	8
	Suja e úmida	0
Olhos	Abertos e brilhantes	12
	Abertos e não brilhantes	6
	Fechados	0
Pernas e dedos	Pernas e dedos normais	12
	Uma perna afetada	6
	Duas pernas afetadas	0
Canela	Brilhante e avermelhada	12
	Brilhante e pálida	6
	Opaca e pálida	0
Umbigo	Completamente fechado e limpo	12
	Não completamente fechado, coloração normal	6
	Não fechado e com coloração anormal	0
Membrana remanescente	Sem membrana	10
	pequena	5
	Grande	0
Resíduo da gema	Sem gema aparente	10
	Gema pequena	5
	Gema grande	0

Adaptado de TONA et al. (2003)

Com base nesses critérios, obteve-se um escore, com escala total de 100, e adaptado para se obter os escores máximo de 100, médio de 50 e ruim, zero. Além disso, os neonatos foram avaliados com relação ao seu comprimento, com paquímetro digital (marca GUT, ref. n°205509, capacidade 150 mm / 0,01mm), sendo considerada a medida da extremidade do bico até a extremidade do dedo mais longo excluindo-se a unha.

Avaliação de desempenho zootécnico

Na condução dos experimentos foram avaliados os pesos das aves e das dietas e anotados o peso das aves mortas para cálculo da mortalidade diária.

Aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias, as aves foram pesadas para cálculos dos índices zootécnicos: peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar corrigida pelo peso das aves mortas (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). Estes valores foram tabulados da seguinte forma:

- Ganho de peso (g): calculado pela diferença entre os pesos das aves obtidos nas pesagens.
- Consumo de ração (g): obtido pela diferença entre a quantidade de dieta oferecida no início e as sobras ao final de cada semana avaliada, considerando o número de aves mortas no intervalo para correção dos valores de consumo.
- Índice de conversão alimentar: obtido pela relação entre o ganho de peso e o consumo de ração, considerando o número de aves mortas no intervalo como critério para correção dos valores deste índice.
- Viabilidade: calculada pela diferença entre o número de aves no início do experimento e a mortalidade que foi anotada diariamente.

O índice de eficiência produtiva foi calculado pela fórmula:

$$\text{IEP} = \frac{(\text{GPD} \times \text{V})}{(\text{CA})} \times 100$$

em que:

IEP = índice de eficiência produtiva

GPD = ganho de peso diário em quilogramas

V = viabilidade em porcentagem

CA = conversão alimentar

Análises Estatísticas

Para as variáveis de avaliação da janela de nascimento; peso ao nascer e na expedição; avaliação de comprimento ao nascer do pintinho e desempenho utilizou-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) sendo os dados submetidos à análise de variância aplicando-se o teste F.

Os dados dos resultados do escore de qualidade de pinto ao nascer e embriodiagnóstico foram submetidos à análise estatística não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Também foi aplicado o teste t para calcular as correlações de Pearson entre as variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de eclosão dos ovos analisados foi de 86,26% para os ovos sem 25(OH)D₃ e 86,85% para os ovos inoculados com 25(OH)D₃ (Tabela 3). Observou-se redução da taxa de pintos refugos para os ovos inoculados com 25(OH)D₃ representando maior taxa de pintos vendáveis, mas sem efeito significativo.

TABELA 3 Resultados de eclosão (ECL = taxa de eclosão; PR = taxa de pintos refugos; PV = taxa de pintos vendáveis) de pintos de frangos de corte, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

25(OH)D ₃	Nascidos	ECL,%	PR	PR,%	PV	PV,%
0,000 µg	1187	86,26	26	2,19	1161	84,07
1,250 µg	1195	86,85	23	1,92	1172	84,92

*Diferenças não significativa pelo teste de análise de variância ($p > 0,05$). ECL = taxa de eclosão; PR,% = taxa de pintos refugos; PV,% = taxa de pintos vendáveis [eclosão-(pintos refugos + não nascidos)].

Observou-se um menor período médio de incubação (TI) em ambos os sexos para as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃, mas sem efeito significativo entre os tratamentos (Tabela 4).

As fêmeas dos dois tratamentos não apresentaram efeito significativo no período médio de incubação.

Apesar do peso ao nascer (PN) e do peso na expedição (PE) entre os sexos terem sido maiores para as fêmeas, essa diferença não foi significativa.

As fêmeas que apresentaram o maior peso ao nascer ($p = 0,0872$), obtiveram um menor período de incubação. Entretanto, a avaliação de comprimento das aves foi significativa ($p < 0,05$) para os machos originados de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃.

TABELA 4 Resultados médios de qualidade da incubação em máquina de estágio único provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Variável	Sexo	Tratamentos		Média	Trat.	Sexo	Trat. x Sexo
		Controle	25(OH)D ₃				
TI (h)	M	511,6	510,8	511,2	0,2398	0,0872	0,7693
	F	510,3	509,0	509,7			
	Média	511,0	509,9				
PN (g)	M	46,45B	46,80	46,62	0,1673	0,1291	0,0346
	F	48,19Aa	46,51b	47,35			
	Média	47,32	46,66				
PE (g)	M	45,04	45,12	45,63	0,1364	0,2427	0,0978
	F	46,38	44,89	45,08			
	Média	45,71	45,01				
CP (mm)	M	170,52b	174,57Aa	172,55	0,0211	0,1478	0,0347
	F	171,14	171,32B	171,23			
	Média	170,83	172,95				

^{ab} Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha ($p < 0,05$); ^{AB} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ($p < 0,05$); TI: tempo incubação (horas); PN: peso ao nascer (g); PE: peso expedição (g); CP: comprimento do pintainho (mm).

GONZALES et al. (2003) ao avaliarem os pesos dos pintos, logo após o nascimento e no alojamento, observaram diferenças relacionadas com o nível de suplementação de 25(OH)D₃, com tendência linear e negativa nas seguintes quantidades correspondentes a 0,00; 0,625; 1,250 e 1,875 µg de 25(OH)D₃.

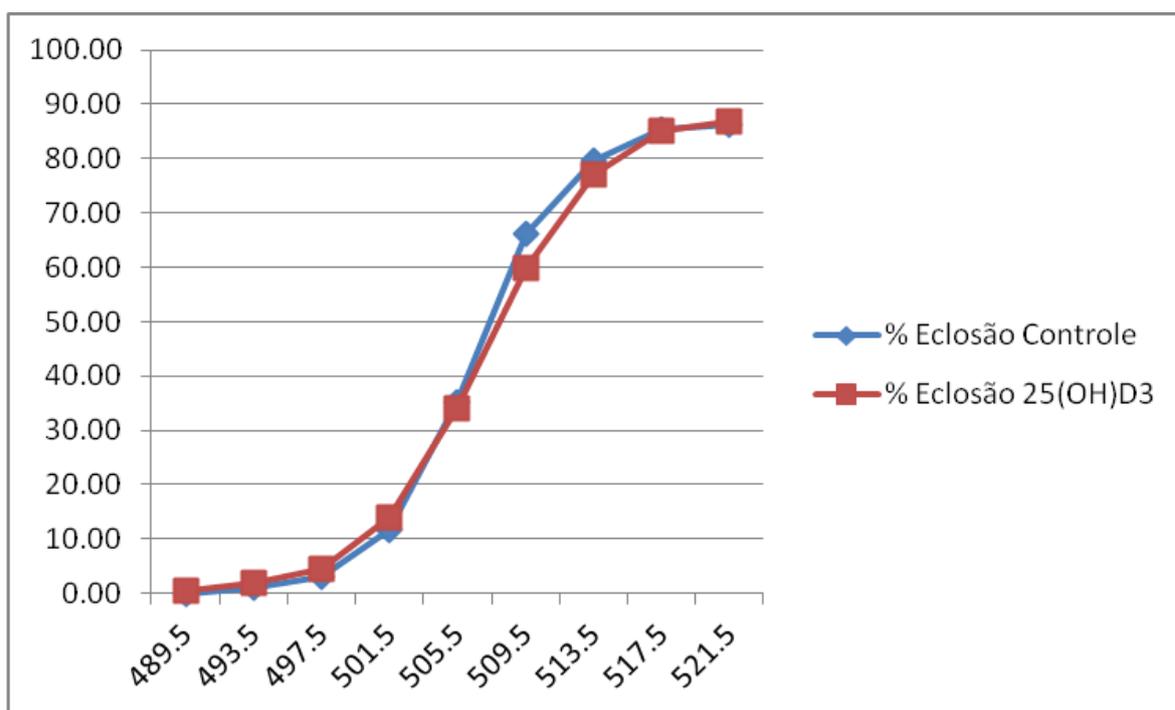
Ao avaliar as eclosões e dispersão da janela do nascimento dos 2.752 ovos no intervalo a cada quatro horas, (Tabela 5) não se observou diferença significativa entre os tratamentos analisando a média geral da variável no tempo, entretanto, as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ anteciparam o início do nascimento com diferença significativa no primeiro período da janela de nascimento.

A janela de nascimento não foi considerada satisfatória, com intervalo de 32 horas, acima do tempo estimado para eclosão em máquinas de estágio único que geralmente apresentam um intervalo de 24 horas de janela de nascimento. Caracterizou-se com uma base ampla (intervalo grande entre primeiros e últimos), com pico mais baixo e maior coeficiente de variação (Figura 1).

TABELA 5 Média acumulada de nascimento dos neonatos referente à incubação de 2.752 ovos em máquina de estágio único, amostrados por bandeja de 86 ovos, provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Tempo (h) Incubação	Tratamentos		Médias
	Controle	25(OH)D ₃	
489,5	0,00	0,44	0,22
493,5	0,88	1,63	1,25
497,5	2,69	3,81	3,25
501,5	9,94	12,13	11,03
505,5	30,19	29,25	29,72
509,5	57,00	51,44	54,22
513,5	68,56	66,31	67,44
517,5	73,50	73,25	73,37
521,5	74,19	74,69	74,44

*Diferença não significativa pelo teste de análise de variância ($p < 0,05$).



Janela (h)	intervalo	489,5	493,5	497,5	501,5	505,5	509,5	513,5	517,5	521,5
25(OH)D ₃	%	0,51	1,89	4,43	14,10	34,01	59,81	77,11	85,17	86,85
Controle	%	0,00	1,02	3,13	11,56	35,10	66,28	79,72	85,47	86,26

Figura 1. Distribuição da Janela de nascimento (eclosão) dos neonatos provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Avaliaram-se os resultados de correlações e verificou-se que o comprimento do corpo não apresentou nenhuma correlação com o tempo ao nascimento. Ou seja, pintainhos maiores e mais pesados não necessariamente nasceram em menor tempo. Pode-se verificar que o tempo de incubação na presente pesquisa sofreu interferência das oscilações de temperatura durante o final da incubação, não sendo recomendado relacioná-lo com o comprimento do neonato. Observou-se que o peso ao nascer apresentou correlação negativa (-0,1521) e valor de ($p=0,06$) para a avaliação de atividade e também, correlação negativa para a qualidade da cicatrização umbilical (-0,1443) e valor de ($p=0,07$). Portanto, os neonatos mais pesados tiveram menor classificação do escore de qualidade ao nascer. Verificou-se também, que o peso ao nascer apresentou correlação positiva (0,1524) e valor de ($p=0,06$) com o comprimento dos pintainhos (Tabela 6).

TABELA 6 Resultados de correlações de Pearson e valores de p para TI: tempo incubação (horas); PN: peso ao nascer (g); PE: peso expedição (g); CP: comprimento do pinto (mm); ATI: atividade; UMB: cicatrização umbigo; PER: qualidade pernas de pintos de frangos de corte com um dia de idade, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

	TI	PN	PE	CP	ATI	UMB	PER
TI	1,0000	0,2379*	0,4029*	-0,0160	-0,0887	-0,1803*	-0,0287
PN	<0,01*	1,0000	0,9533*	0,1524*	-0,1521*	-0,1443*	0,0762
PE	<0,01*	<0,01*	1,0000	0,1601*	-0,0928	-0,1271	0,0167
CP	0,8450	0,0600*	0,0460*	1,0000	0,1778*	0,0476	0,2149*
ATI	0,2772	0,0613*	0,2509	0,0269*	1,0000	0,2039*	0,4831
UMB	0,0263*	0,0762*	0,1150	0,5564	0,0109*	1,0000	0,1705*
PER	0,7253	0,4784	0,8369	<0,01*	<0,01*	0,0339*	1,0000

* Valores de correlação com resultado em forma de matriz (acima da diagonal, valores de correlação e abaixo valores de p).

Na presente pesquisa, independente do tratamento, observou-se que o tempo de incubação apresentou correlação negativa (-0,1803) e valor de ($p=0,026$) com escore de qualidade de cicatrização umbilical. Os pintainhos que nasceram mais tarde, em geral, apresentaram piores escores na avaliação de qualidade realizada no incubatório.

HODGETTS (2006) confirmou problemas de desidratação de neonatos que nascem no início da janela e problemas de má cicatrização de umbigo daqueles nascidos no final da janela. O autor justificou pelo amplo intervalo de tempo que os neonatos permanecem no nascedouro.

Na presente pesquisa, não se observou correlação com cicatrização de umbigo, entretanto, ao correlacionar o comprimento do neonato (CP) com os critérios de avaliação de qualidade no presente experimento, observou-se que o comprimento pode ser um bom indicativo de avaliação geral do neonato relacionando-se significativamente com a atividade (0,1778) e valor de ($p=0,02$) e a qualidade de pernas (0,2149) e valor de ($p<0,01$).

De acordo com MOLENAAR et al. (2008), o comprimento corporal pode ser melhor indicador de desempenho no futuro. GONZALES et. al. (2011) também utilizaram o comprimento corporal para avaliar o potencial de crescimento das aves aos sete dias de idade e observaram correlação positiva entre o peso aos sete dias com o comprimento corporal, o peso do ovo, peso ao nascimento e peso ao alojamento para ambos os sexos. Os autores também observaram que tanto o comprimento corporal quanto o peso aos sete dias apresentaram correlação negativa com o tempo de nascimento, sugerindo uma possível diferença no metabolismo das aves que nascem em menor tempo, têm maior comprimento corporal e maior peso aos sete dias, o que não foi possível observar na presente pesquisa, provavelmente devido à ocorrência de alteração de temperatura na 3ª semana de incubação.

Os resultados de mortalidade embrionária provenientes de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ estão expressos pelos valores absolutos encontrados nos tratamentos e apresentados na Tabela 7.

Com relação aos resultados de mortalidade embrionária dos ovos amostrados por bandeja da incubação na máquina de estágio único (Tabela 7) não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos utilizados. Observou-se em ambos os tratamentos, o aumento da mortalidade embrionária de 3ª semana, sendo superior a 3,5%. Também, registrou-se aumento de neonatos em posição errada e aumento do número de bicado vivo e bicado morto, acima dos padrões estabelecidos pela empresa.

TABELA 7 Resultados de mortalidade embrionária da incubação 2.752 ovos em máquina de estágio único, amostrados por bandeja, provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Embriodiagnóstico	Controle	25(OH)D ₃	P*
Inférteis, %	27/184	28/178	0,8837
Mort, Embrionária 0-7dias, %	51/184	62/178	0,1733
Mort, Embrionária 8-14dias, %	12/184	10/178	0,8270
Mort, Embrionária 15-18dias, %	54/184	50/178	0,8170
Mort, Embrionária 19-21dias, %	5/184	2/178	0,4490
Bicado vivo, %	9/184	7/178	0,7996
Bicado morto, %	4/184	5/178	0,7472
Pintos nascidos anormais, %	0/184	1/178	0,9999
Trincados – transferência, %	12/184	6/178	0,3311
Posição errada, %	6/184	6/178	0,9999
Contaminados, %	2/184	1/178	0,9999

* Diferença não significativa pelo teste Exato de Fisher ($p > 0,05$).

Nos registros do embriodiagnóstico foi possível observar que os embriões passaram por algum tipo de problema durante a incubação experimental. Analisando os dados de ambiência da máquina de incubação, observou-se que o supervisor acusou aumento de temperatura acima do tolerável durante a 3ª semana de incubação, fato que explica os resultados do embriodiagnóstico e a ampla janela de nascimento dos pintainhos.

Os parâmetros de temperatura e umidade devem ser controlados minuciosamente, pois podem desencadear problemas de pernas nas aves. De acordo com OVIEDO-RONDÓN (2008), o aumento da incidência da discondroplasia tibial às três semanas de idade está relacionado com temperaturas desajustadas nos primeiros oito dias de incubação ou com períodos de temperaturas excessivas entre o 10º e o 18º dia.

Temperaturas acima de 37°C e concentrações oxigênio abaixo de 19% durante os últimos quatro dias de incubação provaram, recentemente, reduzir o desenvolvimento ósseo e aumentar a assimetria óssea em frangos (OVIEDO-RONDÓN et al., 2009; OVIEDO-RONDÓN et al., 2008). Na presente pesquisa, observou-se exatamente essa condição de temperatura elevada no final da incubação.

Segundo OVIEDO-RONDÓN et al. (2008) padrões anormais de temperatura durante todo o processo de incubação devem ser evitados. A assimetria de pernas, causada pelo stress térmico pré-eclosão, é muito importante, pois provoca forças anormais nas articulações e ossos levando a deformações ósseas e alterações na marcha na fase mais tardia da vida das aves. O nível de assimetria óssea destas alterações tem sido utilizado como parâmetro de avaliação de bem-estar animal (OVIEDO-RONDÓN, 2008).

Além disso, temperaturas elevadas afetam a utilização do vitelo nutritivo por parte do embrião. A gema possui lipídios, minerais e vitaminas essenciais à modelação óssea e os hormônios da tireoide têm um papel fundamental na diferenciação da placa de crescimento ósseo e essas alterações podem interferir no desenvolvimento embrionário. De acordo com WILSON (1997), a deficiência de vitamina D, também pode ser uma das causas de mortalidade embrionária tardia e estarem relacionadas com problemas de qualidade do esqueleto da ave. SELL & JERRY (1994) relatou que a eclosão do neonato é afetada pelos níveis de vitamina D presente na membrana que envolve a gema do ovo.

A qualidade de pintainhos machos e fêmeas com um dia de idade provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃ estão expressos pelos valores das médias dos tratamentos e apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 Médias e medianas dos escores de qualidade de pintos machos e fêmeas com um dia de idade provenientes de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Escore	Controle		25(OH)D ₃		P*
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
Atividade	16(16)	15,63(16)	15,4(16)	15,35(16)	0,6167
Umbigo	8,11(9)	8,31(6)	9,6(12)	8,27(6)	0,2973
Membrana	9,17(12)	9,68(12)	10,35(12)	10,37(12)	0,4390
Abdômen	11,64(12)	12(12)	12(12)	11,67(12)	0,4955
Pernas	10(10)	9,54(10)	10(10)	9,32(10)	0,1235
Canela	16(16)	16(16)	16(16)	15,78(16)	0,3633
Olhos	10(10)	9,88(10)	10(10)	9,72(10)	0,5992
Penugem	12(12)	11,59(12)	11,85(12)	11,67(12)	0,3942
Total	92,94(94)	92,65(94)	95,2(100)	92,18(94)	0,4072

* Diferença não significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Apesar do aumento de temperatura na 3ª semana de incubação, a qualidade dos pintainhos nascidos foi considerada boa, superior a 92%, nos dois tratamentos. Entretanto, a avaliação do escore de qualidade dos pintos (Tabela 8) não foi significativa entre os tratamentos em todas as variáveis de qualidade do neonato analisadas. Aparentemente, os machos inoculados com 25(OH)D₃ apresentaram maior valor de escore total (95,2), entretanto não se diferenciou estatisticamente dos demais.

Os resultados de desempenho de frango de corte aos 35 dias de idade estão expressos pelos valores das médias dos tratamentos e apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 Resultado de desempenho (peso inicial PMI, peso final PMF, ganho médio de peso GMP, consumo médio de ração CMR, conversão alimentar CA e mortalidade Mort) de pintos de frangos de corte machos com 35 dias de idade, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

25(OH)D ₃	PMI, g ¹	PMF, g	GMP, g	CMR, g	CA	Mort, %
0,000 µg	44,11	2.396	2.341	3.507	1,496	9,14
1,250 µg	44,36	2.359	2.305	3.501	1,510	6,18
P	0,2637	0,1522	0,1616	0,8115	0,3864	0,0731
C.V%	1,21	2,62	1,69	2,63	2,66	-

¹ No momento do alojamento, peso inicial PMI; peso final PMF; ganho médio de peso GMP; consumo médio de ração CMR e conversão alimentar CA. Efeito ns = não significativo (p>0,05).

Avaliando-se os resultados de desempenho no presente experimento (Tabela 9), pode-se perceber a redução da mortalidade das aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃. Entretanto, os resultados de desempenho foram semelhantes e não significativos (p>0,05) para o peso inicial (PMI), o peso final (PMF), o ganho médio de peso (GMP), o consumo médio de ração (CMR) e a conversão alimentar (CA).

GONZALES et al. (2003), ao inocularem manualmente 312 ovos com embriões viáveis de 16 dias de incubação, obtidos de lotes de matrizes Cobb 500 de 49 semanas de idade, via cavidade amniótica, com 0,3 mL de soluções contendo 0,00; 0,625; 1,250 e 1,875 µg de 25(OH)D₃ não observaram diferença

significativa ($p > 0,05$) no desempenho das aves aos 10 dias ao usar níveis crescentes de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Entretanto, a mortalidade foi diminuída para os tratamentos que receberam $25(\text{OH})\text{D}_3$, à semelhança do que ocorreu na presente pesquisa ($p < 0,10$). UNI & FERKET (2004) também relataram em seus trabalhos que a suplementação *in ovo* diminui a mortalidade das aves e melhora o crescimento dos pintainhos.

FERKET & UNI (2006) relataram que as limitações nutricionais no final da incubação e pós-eclosão podem causar diminuição da eclodibilidade e aumento da incidência de doenças causando mortalidade em torno de 5%.

CAMPOS (2007) observou redução de 3,13% de mortalidade na 1ª semana e 5,08% até 21 dias de idade quando suplementou 0,5 mL de solução de vitaminas, contendo 1,2mg de D_3 , porém, não encontrou resultado significativo na mortalidade e no desempenho das aves ($p > 0,05$). O autor descreveu redução de 6,07% da eclodibilidade ao comparar com o tratamento controle, mas atribuiu ao volume de solução inoculado, já que a osmolaridade das soluções estavam compatíveis com as recomendações de FERKET et al., (2005) que devem ser mantidas entre 400 e 650 mOsm.

Existem poucos trabalhos de pesquisa com inoculação *in ovo* utilizando o metabólito $25(\text{OH})\text{D}_3$. A maioria dos dados de literatura descrevem melhorias relacionadas com o desempenho quando se utiliza o produto na ração das aves.

Os resultados da inoculação *in ovo* utilizando o metabólito $25(\text{OH})\text{D}_3$, indicam que a vitamina D melhora a viabilidade dos frangos de corte até a idade de abate.

4. CONCLUSÃO

A inoculação *in ovo* com metabólito $25(\text{OH})\text{D}_3$ não influencia os resultados de eclodibilidade dos ovos férteis de matrizes pesadas incubados em máquinas de estágio único, mortalidade embrionária e qualidade do pintainho de corte.

A administração *in ovo* do metabólico $25(\text{OH})\text{D}_3$ não é efetiva na melhoria do desempenho de frangos de corte machos até a idade de 35 dias.

REFERÊNCIAS

1. CAMPOS, A. M. A. **Efeito da inoculação *in ovo* de soluções nutritivas sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos de corte.** VIÇOSA (MG): UFV, 2007. 65f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
2. FERKET, P, DE OLIVEIRA, J., GHANE, A., UNI, Z. Effect of *in ovo* feeding solution osmolality on hatching turkeys. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 118, 2005.
3. FERKET, P., UNI, Z. Early feeding – *in ovo* feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: CONFERENCE EUROPEAN POULTRY 12th, Verona. **Anais...** Conference European Poultry, 2006 (CD-ROM).
4. GONZALES, E., MACARI, M., PAZ, ICLA. Cap. 9. Enfermidades metabólicas em frangos de corte. In: BERCHIERI JR., A., SILVA, EM, DI FÁBIO, J., SESTI, L., ZUANAZA, MAF. (ed.). **Doenças das aves.** Campinas (SP): FACTA, p.977-998, 2009.
5. GONZALES, E.; MELLO, H.H.C; LABOISSIÈRE, M.; CARVALHO, F.B.; STRINGHIN, JH. Comprimento corporal como medida de qualidade do pintinho para predição do desempenho do frango de corte. **Anais...** XXII Congresso Latino Americano 2011.
6. GONZALES, E.; OLIVEIRA, A.S.C.; CRUZ, C.P.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; BRITO, A.B. *In ovo* supplementation of 25 (OH)D₃ to broiler embryos. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003, Lillehammer. **Proceedings...** Lillehammer: WPSA, p. 72-74, 2003.
7. HODGETTS, B. Successfully closing the hatch window. **International Hatchery Practice**, v. 20, n. 5, p. 23, 2006.
8. MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHO, R.; VAN DEN BRAND. H. Relationship between hatchling length and weight on later productive performance in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v.64, p.599-604, 2008.
9. OVIEDO-RONDÓN, E. “La incubación afecta el desarrollo óseo y la incidència de problemas de piernas”, **Industria Avícola**, p.14-16, 2008.
10. OVIEDO-RONDÓN E, SMALL J, WINELAND M, CHRISTENSEN V, MOZDZIAK P, KOCI M, FUNDERBURK S, ORT D, MANN K “Broiler embryo bone development is influenced by incubator temperature, oxygen concentration and eggshell conductance at the plateau stage in oxygen consumption” **British Poultry Science**, v.49, n.6, p.666-676, 2008.

11. OVIEDO-RONDÓN E, WINELAND M, FUNDERBURK S, SMALL J, CUTCHIN H, MANN M “Incubation conditions affect leg health in large, high-yield broilers” **Journal of Applied Poultry Research** v.18, p.640-646, 2009.
12. PIZAURO JR, J. M. Estrutura e função do tecido ósseo. In: MACARI, M., FURLAN, R. L., GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p.247-262
13. PIZAURO JR, J. M; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia Tibial: Mecanismos de Lesão e Controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 169-185, 2002.
14. R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available at < <http://www.R-project.org/> > assessed in 2012.
15. SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 2007. 283p.
16. SELL, JERRY L. **Nutrient Requirements of Poultry**, Revised Edition. National Academy Press, 1994. 176p.
17. SBCAL/COBEA: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) **Proteção e Bem Estar de Animais de Laboratório**. <http://www.cobea.org.br/>
18. TONA, K., BAMELIS, F., DE KETELAERE, B., BRUGGEMAN, V., MORAES, V.M.B., BYUSE, J., ONAGBESAN, O., DECUYPERE, E. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. **Poultry Science**, v.82, p.736-741, 2003.
19. UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n. 11, p.101-111, 2004.
20. WEBER, G. Symposium conference: The use of 25(OH)D₃. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 14, 2003. **Proceedings...** WPSA: Lillehammer, 2003.
21. WILSON, H. R. Effects of Maternal Nutrition on Hatchability. **Poultry Science**, v. 76, p. 134-143, 1997.

CAPÍTULO 05 - EFEITO DA QUALIDADE ÓSSEA DE FRANGO DE CORTE, OBTIDOS DE EMBRIÕES SUPLEMENTADOS *IN OVO* COM 25-HIDROXI-COLECALCIFEROL

RESUMO: Objetivou-se avaliar a qualidade do esqueleto de frangos originados de embriões aos 19 dias de desenvolvimento embrionário, suplementados *in ovo* com 25-D-hidroxi-colecalciferol, 25(OH)D₃. A incubação foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A em máquina de estágio único, utilizando 2.752 ovos de matrizes Cobb 500 com 45 semanas de idade. Na transferência e vacinação, os ovos embrionados foram inoculados com a solução controle e com 25(OH)D₃ incorporados na vacina. A compatibilidade do produto foi avaliada anteriormente e as dosagens utilizadas foram zero e 1,250µg de 25(OH)D₃ equivalentes a 50 UI de vitamina D₃. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e doze repetições de 35 aves cada, totalizando 840 pintos em 24 box no aviário experimental da UFG. Os dados de resistência e densidade mineral óssea foram submetidos à análise de variância, utilizando o teste F e os dados de *Gait Score*, deformidade *vagus-varus* e avaliação da lesão macroscópica e microscópica da tíbia foram submetidos à análise estatística não paramétrica com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). As comparações dos efeitos foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis. Também, aplicou-se o teste de t para calcular as correlações de Pearson entre as variáveis. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos para as avaliações de *gait score*, deformidade *vagus-varus*, discondroplasia tibial, resistência e densidade mineral óssea. Portanto, a utilização do aditivo 25(OH)D₃ *in ovo* aos 19 dias de desenvolvimento embrionário não é efetivo na melhoria do esqueleto de frangos de corte.

Palavras-chaves: embrião, esqueleto, suplementação *in ovo*, vitamina D.

CHAPTER 5 - EFFECT ON BONE QUALITY OF BROILERS OBTAINED FROM EMBRYOS SUPPLEMENTED *IN OVO* WITH 25-HYDROXY-CHOLECALCIFEROL

ABSTRACT: This work was carried out to evaluate bone quality of broilers hatched from embryos at 19 days of hatching, supplemented *in ovo* with 25-D-hydroxy-cholecalciferol, 25(OH)D₃. Incubation process was performed in a simple stage machine in which 2.000 45-weeks Cobb 500® breeder eggs. During vaccination, fertile eggs were during the transference and vaccination, fertile and viable eggs were inoculated with placebo or 25(OH)D₃ solution incorporated in the vaccine and the compatibility of the mix were tested with two dosis, zero and 1,250µg of 25(OH)D₃ equivalent to 50 UI of vitamin D₃. Eggs were placed in air-permeable bags in order to discriminate the chicks and eggshell components. A total of 840 broilers were placed in experimental pens in a completely randomized design with two treatments and 12 replicates with 35 chicks each. Data of bone resistance and bone mineral density were submmited to ANOVA analysis and to compare *Gait Score*, *valgus-varus* deformities and macro and microscopic evaluation of tibia non-parametric analysis with Kruskall-Wallis was used and “t” test of Student and Pearson correlation was used to compare the variables. No difference ($p>0.05$) was observed between treatments for *Gait Score*, *valgus-varus* deformities, tibial discondroplasia frequency and bone resistance and mineral density. It is possible to conclude that the use of 25(OH)D₃ *in ovo* at 19 days of embryo development was not effective to increase bone quality.

Key words: embryo, *in ovo* supplementation, skeleton, vitamin D.

1. INTRODUÇÃO

A discondroplasia tibial é uma das patologias esqueléticas de maior preocupação em termos de bem-estar animal. Como auxílio de mensuração da DT, a monitoria de lesões pode ser realizada por muitas técnicas. Entretanto, há pouco entendimento empresarial dos prejuízos causados pela DT devido uma falta de identificação e quantificação sistemática dos problemas esqueléticos nas indústrias.

Atualmente, o aumento dos índices de condenação em abatedouros por rejeição total ou parcial das carcaças por problemas de pernas tem representado aumento significativo do custo do quilo do peso vivo. A discondroplasia tibial (DT) é um dos problemas de pernas mais comuns podendo ter prevalência de 30% (OVIEDO-RONDÓN, 2008a) e causar deformações nas tíbias e consequentes alterações na marcha dos frangos (CRESPO & SHIVAPRASAD, 2003).

PATTISON (1992) estudou as lesões secundárias associadas com a DT que são: a curvatura da porção proximal da tíbia, a fratura das fíbulas e os defeitos de angulação da articulação intertarsal. O autor estabeleceu a ordem de prioridade e maior taxa de prevalência indicando os problemas relacionados à rotação tibial (pernas tortas), discondroplasia e deformidade angular (*valgus-varus*), como os mais importantes, respectivamente. Essas anormalidades do sistema locomotor são classificadas como distúrbios do desenvolvimento (RIDDELL, 1992). A taxa de crescimento é a principal causa que desencadeia a elevada exigência de crescimento rápido dos ossos longos (ESTEVEZ, 2010).

De acordo com RIDDELL (1992), a deformação de *valgus-varus* (VVD) é uma das formas mais prevalentes distorções de ossos longos e consiste da angulação para fora ou para dentro da perna. A discondroplasia tibial (DT), também é considerada uma das principais causas de perda de pernas, podendo gerar aumento significativo no escore para locomoção. Lesões graves de DT causam enfraquecimento da tíbia e angulação anormal levando a deformações das pernas, claudicação e dor (WHITEHEAD, 2009).

De acordo com SCAHAW (2000), as empresas dos setores de avicultura devem priorizar a redução de problemas esqueléticos, visando proporcionar o bem-estar da ave ao atender o escore $< 3,0$ em seus “check list” de verificação. E que o escore $> 3,0$ em 20% das aves é muito grave e inaceitável. SKINNER-NOBER & TEETER (2009) observaram diferenças comportamentais em frangos com *gait score* 2 e 3 e atribuíram esse resultado a estratégia de adaptação física da ave para se adaptar às mudanças de conformação do esqueleto.

Portanto, objetivou-se com o presente trabalho estudar a influência da utilização do metabólito $25(\text{OH})\text{D}_3$ inoculado *in ovo* como aditivo utilizado na nutrição pré-eclosão de embriões de frango de corte, avaliar os efeitos no desenvolvimento do esqueleto e as medidas de avaliação da deficiência locomotora, especificamente, utilizando *Gait Score*, avaliação macroscópica e microscópica da placa de crescimento. Objetivou-se, também, estabelecer correlações entre o *Gait Score*, lesões por discondroplasia tibial, deformidade angular (*valgus* e *varus*) e simetria dos membros locomotores em frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A incubação experimental foi conduzida no incubatório da empresa São Salvador Alimentos S/A, localizado em Itaberaí – GO.

O experimento a campo foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás – UFG em Goiânia, Goiás, Brasil.

O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o protocolo nº 014/12, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

A incubação foi realizada em máquina de estágio único, com 2.752 ovos previamente selecionados por peso, obtidos de matrizes pesadas com 45 semanas de idade da linhagem Cobb 500®. No momento da transferência, realizou-se a vacinação automática dos ovos aos 19 dias de incubação. Os ovos com embriões viáveis foram inoculados com solução vacinal, sem 25(OH)D₃ e com 1,250 µg de 25(OH)D₃, correspondente a zero e 50 UI de vitamina D₃, respectivamente. A compatibilidade do produto com a solução vacinal foi avaliada anteriormente, constatando-se a integridade da partícula viral na presença da vitamina. Após a inoculação, cada ovo inoculado foi acondicionado em saco de filó, ar-permeável, para discriminar cada neonato ao seu tratamento.

Após a pesagem, qualificação conforme TONA et al. (2003) e sexagem dos neonatos no incubatório, 840 pintainhos de corte machos foram encaminhados para o aviário experimental do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás - UFG e distribuídos em 24 boxes em galpão de piso para avaliação da qualidade do sistema locomotor das aves.

No alojamento, foram selecionadas cinco aves por box e identificadas com anilhas na asa para acompanhamento do peso semanal e da qualidade do esqueleto. Após o alojamento, as aves receberam ração e água *ad libitum*. O sistema de iluminação adotado durante o período de criação (um a 35 dias de idade) foi de 23H de luz e 1H de escuro. Uma ave marcada por box foi retirada, semanalmente, para avaliação da incidência de problemas locomotores.

Programa alimentar

A ração foi oferecida na forma farelada e formulada de acordo com as recomendações nutricionais utilizada na empresa São Salvador Alimentos S/A na época da presente pesquisa. A composição das dietas experimentais utilizadas no experimento na fase inicial (um a 21 dias de idade) e na fase crescimento (21 a 35 dias) estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, com seus respectivos níveis nutricionais.

TABELA 1 Composição percentual da dieta utilizada no experimento nas fases inicial (um a 21 dias) e crescimento (21 a 35 dias)

Ingredientes, %	Inicial	Crescimento
Milho grão	58,89	67,77
Farelo de soja 46,5%	20,52	16,96
Farinha de carne 45%	4,20	3,20
Soja integral tostada 36%	14,40	1,73
Farinha de penas 79%	-	1,66
Farinha de vísceras 12%	-	2,33
Farinha de sangue 89%	-	0,93
Gordura de aves	-	2,33
Calcáreo 37%	0,47	0,53
Sal branco comum	0,34	0,28
Bicarbonato de sódio	0,10	0,13
DL-metionina 98%	0,32	0,28
Lisina 64%	0,33	0,46
Treonina 98%	0,06	0,06
Colina 75%	0,06	1,10
Suplemento vitamínico e mineral **	0,10	0,10
Aditivos *	0,21	0,22
Total	100	100

**Suplemento vitamínico e mineral fase inicial para frangos, níveis de garantia por quilograma de ração: 10.000 UI Vitamina A, 2.500 UI Vitamina D3, 25 UI Vitamina E, 2 mg Vitamina K3, 2,5 mg Vitamina B1, 6,5 mg Vitamina B2, 3,5 mg Vitamina B6, 18 µg Vitamina B12, 42 mg Niacina, 15 mg Ácido Pantotênico, 1,2 mg Ácido fólico, 0,08 mg Biotina, 0,3 mg Selênio, 0,075 mg Manganês, 62,5 mg Zinco, 50 mg Ferro, 8,125 g Cobre, 1 mg lodo Veículo q.s.p. * Aditivos inicial: nicarbazina 25%; bacitracina de zinco 15%; sulfato de cobre 35%; anti-oxidante; anti-salmonela; anti-fúngico e enzima.

**Suplemento vitamínico e mineral fase crescimento para frangos, níveis de garantia por quilograma de ração: 8.000 UI Vitamina A, 1.900 UI Vitamina D3, 20 UI Vitamina E, 1,8 mg Vitamina K3, 1,8 mg Vitamina B1, 5,5 mg Vitamina B2, 2,6 mg Vitamina B6, 15 µg Vitamina B12, 35 mg Niacina, 13 mg Ácido Pantotênico, 0,9 mg Ácido fólico, 0,05 mg Biotina, 0,3 mg Selênio, 0,075 mg Manganês, 62,5 mg Zinco, 50 mg Ferro, 8,125 g Cobre, 1 mg lodo Veículo q.s.p. * Aditivos crescimento: nicarbazina 25%; bacitracina de zinco 15%; sulfato de cobre 35%; anti-oxidante; anti-salmonela; anti-fúngico e enzima.

TABELA 2 Composição nutricional calculada das dietas utilizadas durante a fase inicial (um a 21 dias) e crescimento (21 a 35 dias)

Nutrientes e energia, %	unidade	Inicial	Crescimento
Proteína bruta	%	21,75	20,00
Gordura	%	6,11	6,34
Ac. Linoleico	%	2,71	2,19
Matéria seca	%	88,54	88,79
Cinza	%	5,51	4,95
Cálcio	%	0,93	0,90
Cálcio/fósforo		1,97	1,96
Fósforo total	%	0,61	0,56
Fósforo disponível	%	0,47	0,46
Energia metabolizável	kcal/kg	3.099	3.239
Lisina total	%	1,29	1,19
Lisina digestível	%	1,17	1,08
Metionina total	%	0,63	0,57
Metionina digestível	%	0,60	0,54
AAS total	%	0,97	0,92
AAS digestível	%	0,87	0,82
Treonina total	%	0,85	0,80
Treonina digestível	%	0,74	0,69
Triptofano total	%	0,24	0,20
Triptofano digestível	%	0,21	0,17
Isoleucina total	%	0,89	0,77
Isoleucina digestível	%	0,80	0,69
Valina digestível	%	0,87	0,86
Arginina total	%	1,42	1,23
Arginina digestível	%	1,30	1,12
Colina	mg/kg	1.699	1.600
Na	%	0,21	0,20
Cl	%	0,30	0,27
K	%	0,87	0,64
Na+Cl+K	mEq/100g	230,12	174,39

* São Salvador Alimentos S/A.

Delineamento Experimental

O delineamento experimental aplicado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e doze repetições de 35 aves por unidade experimental, totalizando 840 frangos de corte machos em 24 unidades no experimento.

Coleta material para análises laboratoriais experimentais

Diariamente, o lote foi acompanhado para controle de mortalidade e de possíveis problemas de pernas. As aves mortas foram necropsiadas imediatamente após a sua identificação e a causa *mortis* investigada. Além desse acompanhamento, semanalmente, a parcela sofreu redução no número de aves em função das coletas semanais de uma ave por box para necropsias e análises laboratoriais. Uma ave com identificação por box foi retirada semanalmente, pesada e sacrificada por deslocamento cervical, procedendo-se à retirada das pernas (coxa + sobrecoxa + pé). As pernas de cada ave foram pesadas, envolvidas com gaze embebida em solução fisiológica, colocadas em saco plástico e congeladas a -20°C, para análises posteriores.

Variáveis Analisadas

Análise “Gait Score”

O sistema de escore adotado nesse experimento foi descrito por GARNER et al. (2002), como segue:

- Escore zero significa ave normal;
- Escore 1, a ave apresenta defeito discreto e indefinido;
- Escore 2, a ave apresenta defeito unilateral ou pernas assimétricas;
- Escore 3, a ave consegue dar 5 a 10 passos e senta quando é tocada;
- Escore 4, a ave consegue dar 1 ou 2 passos;
- Escore 5, a ave não levanta mais.

A avaliação do *Gait Score* foi realizada no aviário experimental em 100% das aves, totalizando 632 observações aos 35 dias de idade.

Avaliação de deformidades *valgus* e *varus*

As avaliações de deformidades *valgus* e *varus* também foram realizadas no aviário experimental em 100% das aves, logo após a avaliação de *gait score*. Observou-se a simetria e a frequência de desvio das pernas e dedos (deformidades *valgus/varus*) avaliando a angulação das articulações entre a tíbia e o dedo três nas pernas direitas e esquerdas. Caracterizou-se:

- Deformidade *valgus*, quando a angulação apresentou desvio lateral (para fora);
- Deformidade *varus* quando a angulação apresentou desvio medial (para dentro).

Análise macroscópica das tíbias

A avaliação da incidência de discondroplasia tibial (DT) foi realizada, semanalmente, pela visualização macroscópica da placa de crescimento da porção proximal da tíbia direita, cortando-se longitudinalmente o osso. Para medir a espessura da placa de crescimento utilizou-se um paquímetro digital.

A metodologia adotada foi a descrita por TAKITA (1998) e apresentada por GONZALES & MACARI (2000) que determinaram os seguintes escores:

- Escore zero = placa de crescimento normal;
- Escore 1 = placa de crescimento com espessamento +/- 3mm;
- Escore 2 = placa de crescimento com espessamento +/- 6mm;
- Escore 3 = placa de crescimento com espessamento superior a 6mm.

Registrou-se também, o comprimento e espessura da tíbia. As avaliações macroscópicas da tíbia das aves foram realizadas nas idades de 7, 14, 21, 28 e 35 dias de idade.

Análise histopatológica das tíbias

Para comprovar possíveis alterações de discondroplasia tibial durante as avaliações macroscópicas da tíbia direita foi realizado um estudo histopatológico das placas de crescimento da porção proximal da tíbia das aves marcadas nas idades de 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de idade.

A metodologia adotada foi adaptada à metodologia descrita por TAKITA (1998), que caracteriza, histologicamente, a severidade da DT de acordo com os seguintes escores:

- Escore 0 = placa de crescimento normal;
- Escore 1 = placa de crescimento com uma banda larga e distinta de condrócitos pré-hipertróficos;
- Escores 2 = placas de crescimento apresentando mudanças degenerativas no citoplasma e núcleos dos condrócitos, o qual, na presente pesquisa, foi subdividido em três níveis (discreto, moderado e severo).

Análise de densitometria óssea das tíbias

As análises de densidade mineral óssea foram realizadas no laboratório da UNESP Campus Botucatu, SP Brasil.

A análise radiográfica e densitométrica foram realizadas aos 14, 21, 28 e 35 dias. As tíbias esquerdas foram radiografadas dispostas ao lado de uma escala de alumínio (liga 6063, ABTN) de 12 degraus com diferentes espessuras em milímetros, utilizada como padrão densitométrico. A chapa radiográfica foi digitalizada em um scanner HP scanjet 4C, com adaptador de transparências. Pelo programa computacional CROMOX1[®], foi possível selecionar o terço médio das tíbias para análise da densidade óptica, expressa em tons de cinza, que foram depois convertidas em equivalentes de milímetros de alumínio. Posteriormente, com a imagem digitalizada, analisou-se o comprimento, espessura média, área da epífise distal e área total de cada tíbia, com o programa computacional Image Proplus[®].

Análise de resistência óssea das tíbias

As análises de resistência óssea foram realizadas na Escola de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás – UFG em Goiânia, Goiás, Brasil.

As tíbias esquerdas foram secas a 55⁰C por 72 horas e, posteriormente, obteve-se o peso seco e medidas de comprimento e espessura mediana da tíbia, por meio de paquímetro digital.

As tíbias esquerdas foram utilizadas em provas biofísicas de resistência óssea, analisando-se a força máxima (CM), força na ruptura e deflexão na força máxima, obtendo-se a curva força x deslocamento, determinada por meio de programa computacional. As variáveis foram medidas em ensaio de flexão de três pontos com distância de vão de apoio de 70 mm, célula de carga 500 kgf e ensaio tipo estático (2mm/min) com auxílio do analisador universal de ensaios, Instron, série 3367, Grove City, EUA.

Análises Estatísticas

Os dados de resistência óssea foram submetidos à análise de variância e os dados de *Gait Score* e avaliação da lesão macroscópica e microscópica da tíbia foram submetidos à análise estatística não paramétrica com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). As comparações dos efeitos foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Também foi aplicado o teste de t para calcular as correlações de Pearson entre as variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos resultados da avaliação do escore não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos utilizados (Tabela 3). Embora, as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ terem atingido o menor valor de escore, os resultados não foram suficientes para expressar uma diferença significativa.

TABELA 3 Média e mediana do escore do andar (*Gait Score*), rotação tibial e deformidade angular *valgus-varus* aos 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Escore	Tratamentos		P *
	Controle	25(OH)D ₃	
" <i>Gait Score</i> "	2,0 (2)	1,5 (1)	0,1787
Rotação tibial	0,58 (0)	0,16 (0)	0,1530
Deformidade angular	0,16 (0)	0,33 (0)	0,3560

*Diferença não significativa para o teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).

A frequência nos diferentes estágios do *Gait Score* aos 35 dias de idade (Tabela 4) foi semelhante entre os tratamentos utilizados e não significativa. As aves apresentaram incidência de 46% para escore (1), caracterizado por defeito discreto e indefinido e 49% para escore (2), caracterizado por defeito unilateral/bilateral ou pernas assimétricas, de acordo com GARNER et al. (2002).

De modo geral as aves aos 35 dias de idade em ambos os tratamentos, apresentaram uma classificação de escore < 3,0 de "*Bristol Gait Score*", atendendo as recomendações de bem estar animal relatadas por SCAHAW (2000).

Nas avaliações de marcha em lotes de frango de corte é comum encontrar de 30 a 65% da população com padrões de marcha anormais sem que haja problemas ósseos (OVIEDO-RONDÓN, 2008a; 2008b).

TABELA 4 Frequência de escore do andar (Gait Score) aos 35 dias de idade de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Frequência (%)	Escore andar (N ⁰)		Escore andar (%)	
	Controle	25(OH)D ₃	Controle	25(OH)D ₃
Escore 0	13	9	4	3
Escore 1	144	146	46	46
Escore 2	153	156	49	49
Escore 3	2	9	1	3
Escore 4	0	0	0	0
Total	312	320	312	320

Embora, no presente experimento, não se observou diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis de *Gait Score*, rotação tibial e deformidade *valgus-varus*, houve correlação positiva do *Gait Score* com a incidência de rotação tibial (0,4008) e com a deformidade angular (0,4569). À medida que aumenta o desvio lateral da tibia e a deformidade dos dedos, o escore da marcha dos frangos, também, é aumentado. Portanto, a associação entre *Gait Score* e desvio lateral pode ser um indicativo da dificuldade de locomoção das aves devido ao desvio seja ele *varus* e/ou *valgus* (Tabela 5).

TABELA 5 Resultados de correlações de Pearson e valores de p para GS: Gait Score; RT: rotação tibial; DVV: deformidade valgus-varus e DT: discondroplasia tibial de frangos de corte machos aos 35 dias de idade, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Amostras	GS	RT	DVV	DT
" <i>Gait Score</i> "	1,0000	0,4569*	0,4008*	0,1180
Rotação tibial	0,0248	1,0000	0,1966	0,3299
Deformidade angular	0,0522	0,3572	1,0000	0,1294
Discondroplasia tibial	0,5829	0,1154	0,5468	1,0000
100% lote	GS	RT	DVV	DT
" <i>Gait Score</i> "	1,0000	0,3850*	0,2257*	-
Rotação tibial	0,0000	1,0000	-0,0229	-
Deformidade angular	0,0000	0,5659	1,0000	-

(*) Valores de correlação são estatisticamente diferentes, pelo teste t, com nível de significância de 5%. Valores de correlação com resultado em forma de matriz (acima da diagonal, valores de correlação e abaixo valores de p). (-): não avaliado.

Outros autores também encontraram correlação positiva entre *Gait Score* e a deformidade *valgus*. BERNARDI (2011) observou, na análise de correlação (0,21), a associação entre as características *Gait Score* e desvio lateral. SANOTRA et al. (2001) também encontraram correlação positiva entre *Gait Score* e a deformidade *valgus*. Segundo JULIAN (1998), as deformidades angulares e de torções nos ossos longos (deformidade *valgus-varus*, pernas torcidas, pernas curvas) acometem 20% dos frangos e estão relacionadas com o rápido crescimento e podem causar alterações no andar. De acordo com SCAHAW (2000), a torção da epífise ou diáfise dos ossos longos e a discondroplasia podem ser a causa de uma diferença de 0,5 a 2,6 no escore de andar de frangos de corte.

Na presente pesquisa, observou-se que a correlação (0,3299) entre a rotação tibial (RT) e o escore histológico da discondroplasia tibial (DT) é maior que a correlação (0,1180) do *Gait Score* com a DT. As lesões de DT foram mais evidentes quando as aves apresentavam deformidade *valgus* e não necessariamente associadas ao *Gait Score*. Foi possível verificar que a ocorrência de DT, nem sempre estão associadas ao *Gait Score* e que somente a deformidade *valgus* apresentou-se mais correlacionada ao *Gait Score*.

Estes resultados estão de acordo com FERNANDES et al. (2012) que verificaram alta correlação entre o *Gait Score* e a deformidade *valgus* aos 35 dias de idade. Os autores concluíram que a maneira com que os frangos de corte caminham nem sempre é afetada pela ocorrência de alguns problemas, como a discondroplasia tibial. Sendo que o *Gait Score* pode ser o mesmo para aves com ou sem estas lesões. E que a dificuldade em caminhar está mais relacionada com problemas de desvio de articulações como *valgus*, como observado na presente pesquisa.

Ao avaliar a frequência de rotação angular tibial (pernas tortas) aos 35 dias, observou-se maior incidência para deformidades *valgus*, caracterizado pelo desvio lateral para fora, em ambos, tratamentos (Tabela 6), obtendo-se 56,41% para o grupo controle e 48,13% para o grupo de aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃. Embora, as aves inoculadas com 25(OH)D₃ terem apresentado menor frequência de deformidade *valgus*, os resultados não foram significativos.

TABELA 6 Frequência de rotação angular tibial (pernas tortas) aos 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Desvio Lateral Pernas (Tibiotarso)	(Nº avaliado)		Frequência (%)	
	Controle	25(OH)D ₃	Controle	25(OH)D ₃
Normal	121	131	38,78	40,94
D. <i>valgus</i>	176	154	56,41	48,13
D. <i>varus</i>	15	35	4,81	10,94
Total	312	320	100,00	100,00

Resultados semelhantes foram relatados por BERNARDI (2011) que observou maior incidência de desvio lateral (*valgus*). LETERRIER & NYS (1992) em seus estudos também verificaram maior frequência de desvio lateral (*valgus*), sendo os machos mais acometidos.

As pernas tortas ou desvio lateral estão relacionados com a deformidade angular e/ou rotação da porção da diáfise da tíbia. A incidência pode chegar a 25%, podendo ocorrer em qualquer idade, inclusive durante e pós-eclosão (THORP, 1992). KESTIN et al. (1992) encontraram a incidência de mais de 26% de frangos com graves anormalidades nos membros, incluindo alterações no andar.

A deformidade angular (*valgus-varus*) pode ocorrer devido a uma anormalidade genética, principalmente em frangos de corte melhorado para crescimento rápido (GONZALES & MENDONÇA JR., 2006). A deformidade *valgus* ou *varus* pode ser causada pela discondroplasia, mas também, pode ser vista em frangos de corte de 35 a 42 dias de idade que apresentam redução ou parada no crescimento ou em aves que se encontram na fase de resolução parcial de um distúrbio discondroplásico (DSM, 2008). Em situações de escore (4) para discondroplasia no tibiotarso e tarsometatarso, a ave pode apresentar deformidade valgus nas pernas (RANDALL & MILLS, 1981).

Nos resultados do presente experimento, observou-se maior frequência de desvio medial dos dedos, causando torção dos dedos para dentro, em ambos os tratamentos (Tabela 7), mas, sem efeito significativo.

TABELA 7 Frequência de desvio dos dedos (dedos tortos) com 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Desvio dedos tarsometarso	(N ^o avaliado)		Frequência (%)	
	Controle	25(OH)D ₃	Controle	25(OH)D ₃
Normal	229	228	73,40	71,25
Desvio lateral (fora)	6	12	1,92	3,75
Desvio medial (dentro)	77	80	24,68	25,00
Total	312	320	100,00	100,00

Os resultados estão de acordo com SORENSEN (1992) e THORP (1992) que relacionaram a rotação angular tibial (perna torta) com o desvio dos dedos (dedos tortos) encontrando a prevalência de 25% para essa anormalidade.

De acordo com SORENSEN (1992), aves com angulação do tibiotarso, também, apresentam alterações de desvio nos dedos. Isso se deve ao fato do fêmur e do tibiotarso virarem para fora e o tarsometatarso para dentro, quando se compara o encaixe articular das duas extremidades de um osso. O que ocorre é a tentativa da ave de compensar o desequilíbrio das forças biomecânicas gerada pelo defeito na extremidade óssea, buscando equilibrar os membros e manter-se de pé.

Análise macroscópica das tíbias

Os escores de lesão macroscópico da porção proximal do osso da tibia realizados nas idades de 14, 21, 28 e 35 dias estão apresentados, sob a forma de medida graduada (mm) de espessura (Tabelas 8) e seus correspondentes escores (Tabela 9).

Os escores de lesão macroscópico da porção proximal do osso da tibia realizados nas idades de 14, 21, 28 e 35 dias não apresentaram efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos utilizados no presente experimento (Tabela 9). Embora, as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ terem atingido o menor valor de escore, os resultados não expressaram diferença significativa nessas idades.

Contudo, ao analisar as lesões aos sete dias de idade (Tabela 8), observou-se menor escore de lesão (2,76 mm) para as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ (p<0,05) comparado ao escore do grupo controle (4,70 mm).

TABELA 8 Espessamento da lesão da placa de crescimento (mm) na porção proximal do osso da tíbia, nas idades de 7, 14, 21, 28 e 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Espessamento Lesão (mm)	Tratamentos		P *	CV%
	Controle	25(OH)D ₃		
EL7D	4,70b	2,76a	0,0159	48,06
EL14D	3,09	2,78	0,7677	84,73
EL21D	4,13	5,58	0,4407	92,88
EL28D	4,03	4,05	0,9893	93,07
EL35D	5,86	3,85	0,2733	118,42

*Diferença significativa para o teste de análise de variância (p<0,05).

TABELA 9 Escore de lesão macroscópico do espessamento da placa de crescimento na porção proximal do osso da tíbia, nas idades de 7, 14, 21, 28 e 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Escore lesão macroscópico	Tratamentos		P *
	Controle	25(OH)D ₃	
EL7D	2,09 b	0,66a	0,0181
EL14D	1,08	0,75	0,4689
EL21D	1,08	1,66	0,3794
EL28D	1,58	1,33	0,7505
EL35D	1,33	0,75	0,4060

* Diferença significativa para o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

As lesões macroscópicas do presente experimento enquadram-se na categoria de escore (1) para o grupo inoculado com 25(OH)D₃ e escore (2) para o grupo controle, ao avaliar macroscopicamente o espessamento da placa de crescimento da porção proximal da tíbia.

Análise microscópica das tíbias

Ao comparar os resultados macroscópicos dos escores de lesão com as análises histopatológicas, confirmou-se a presença de discondroplasia tibial (DT) nas idades de 14, 21, 28 e 35 dias. Verificou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) dos tratamentos utilizados no presente experimento (Tabela 10). Embora, as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ terem apresentado, na maioria das idades o menor valor de escore, os resultados não expressaram diferença significativa.

TABELA 10 Escore de lesão microscópico de discondroplasia tibial (DT) na placa de crescimento na porção proximal, nas idades de 7, 14, 21, 28 e 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Escore lesão DT microscópico	Tratamentos		P *
	Controle	25(OH)D ₃	
HL7D	0,00	0,00	-
HL14D	0,50	0,27	0,6073
HL21D	0,67	1,67	0,0941
HL28D	1,00	0,50	0,3288
HL35D	1,25	0,83	0,5272

* Diferença significativa para o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Embora as lesões macroscópicas aos sete dias de idade terem apresentado diferença ($p < 0,05$), obtendo-se o menor escore de lesão (2,76 mm) para as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ em comparação com escore do grupo controle (4,70 mm), os resultados das análises microscópicas não confirmaram a presença de Discondroplasia (DT) aos sete dias.

Provavelmente, o espessamento da placa de crescimento da porção proximal da tíbia nessa idade esteja relacionado ao intenso crescimento da ave jovem. Nessa idade, o osso fica deformado sob estímulos biomecânicos visto que o osso mineralizado, ainda está em formação. Uma das causas é que a atividade dos osteoclastos ainda não tenha sido suprida adequadamente nessa fase, sendo a vitamina D₃, responsável por equilibrar a relação osteoblasto – osteoclasto e

regular a atividade do paratormônio (PTH), que por sua vez controla os níveis plasmáticos de cálcio modulando a biossíntese de vitamina D₃, a absorção intestinal de cálcio e a mobilização osteoclástica de cálcio depositado no osso (ITO et al., 2008). Se houver redução na conversão da vitamina D₃ para a forma ativa 1,25 diidroxicoalciferol por hidroxilação, a mineralização dos ossos ficará prejudicada, fato observado em situações de acidose metabólica (SAUVER & MONGIN, 1974).

Em situações de estresse térmico a ave sofre desequilíbrio metabólico e a quantidade de cálcio livre ionizado diminui (SAHIN et al., 2006) tornando-se insuficiente para deposição óssea (BUSHINSKY & SESSLER, 1992). Segundo BORGES et al. (2004) as alterações no balanço ácido-base das aves provocam diminuição dos níveis de carbonato e de cálcio disponíveis para deposição nos ossos. De acordo com BAINS et al. (1998) as alterações na homeostase da ave, podem provocar lesões de DT devido a resposta adaptativa desencadeada pelo estresse por calor. Dessa forma, o processo de calcificação fica prejudicado, resultando no aumento da massa cartilaginosa devido a não calcificação dos condrócitos, os quais permanecem no estágio pré-hipertróficos, o que caracteriza a DT e uma das causas primárias pode ser o desequilíbrio eletrolítico (JULIAN, 2005).

A frequência de distúrbios esqueléticos em frangos de corte machos foi relatada por McNAMEE et al. (1998) ao comparar os escores de locomoção com as deformidades das pernas e a discondroplasia tibial. Aves, aparentemente normais, com escores de locomoção baixos (entre 1 e 2), apresentaram maiores incidências de discondroplasia tibial no período de 3^a a 5^a semanas. Segundo os autores, para os escores altos de locomoção (entre 3 e 5) as deformidades das pernas foram os distúrbios do esqueleto que mais prevaleceram.

Na presente pesquisa, verificou-se que a deformidade das pernas atingiu alta proporção, mesmo nos escores baixos de locomoção. O fato é que a genética proporciona elevado ganho de peso nos frangos e as ocorrências de problemas locomotores estão mais precoces também. E o aumento de cargas sobre ossos e articulações relativamente imaturos, decorrente da grande deposição muscular tem provocado má formação óssea (SOUZA, 2012).

Houve correlação positiva nas idades de 14, 21 e 28 dias com as variáveis de peso vivo, peso da tíbia, espessura macroscópica da placa de crescimento na porção proximal da tíbia, bem como a classificação do escore ao realizar a análise microscópica da lesão (Tabela 11). Nas idades de um, sete e 35 dias não se constatou correlação entre essas variáveis.

TABELA 11 Resultados de correlações de Pearson para os valores PV: peso vivo (g); PT: peso da tíbia descarnada (g); EM: espessura macroscópica da placa de crescimento (mm); EH: escore histológico lesão de frangos de corte machos, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Correlações	PV	PT	EM	EH
7 dias de idade				
PV	1,0000	0,3140	-0,1008	-
PT		1,0000	0,0963	-
EM			1,0000	-
EH				1,0000
14 dias de idade				
PV	1,0000	0,3922	0,0957	0,2421
PT		1,0000	0,6332*	0,5642*
EM			1,0000	0,5083*
EH				1,0000
21 dias de idade				
PV	1,0000	0,6623*	-0,0387	0,3936*
PT		1,0000	0,4037*	0,6548*
EM			1,0000	0,7707*
EH				1,0000
28 dias de idade				
PV	1,0000	0,4192*	0,1405	0,1607
PT		1,0000	0,4889*	0,3549
EM			1,0000	0,6860*
EH				1,0000
35 dias de idade				
PV	1,0000	0,2195	0,0509	0,1493
PT		1,0000	-0,1018	-0,0716
EM			1,0000	0,4318*
EH				1,0000

(*) Valores de correlação são estatisticamente diferentes de zero, pelo teste t, com nível de significância de 5%.

Com a evolução do peso vivo das aves e principalmente, dos ossos da tíbia observou-se maior espessura da placa de crescimento e elevação dos escores microscópicos de lesão de discondroplasia tibial (DT).

A discondroplasia tibial (DT) pode atingir cerca de 2 a 20% das aves, causando desconforto e claudicações. (RATH, 1998; PRAUL et al., 2000; ALMEIDA PAZ et al., 2005; ALMEIDA PAZ, 2008; BERNARDI, 2011). LEACH Jr. & LIBUM (1992) relataram prevalência da discondroplasia tibial em frangos variando de 1,0 a 2,0%, com incidência entre 40 a 50% em populações severamente afetadas e afirmam que a DT está frequentemente associada com perdas nos abatedouros devido às fraturas dos ossos da tíbia.

Nos resultados desse presente experimento, observam-se incidências maiores para DT em ambos os tratamentos (Tabela 12). Constatou-se histologicamente incidência de 25 a 50% entre os tratamentos, mas sem diferença ($p>0,05$). Tanto a incidência, quanto a severidade aumentaram de acordo com a evolução da idade dos frangos.

Segundo SOLEIMANI et al. (2011), elevadas taxas de crescimento, resultaram em aves menos resistentes aos efeitos do estresse por calor. De acordo com TAO et al. (2006), o estresse pelo calor pode diminuir os níveis dos hormônios tireoidianos, prolongando a fase de remodelação óssea. GONZALEZ ESQUERRA & LEESON (2006) relataram que a severidade do desequilíbrio metabólico é influenciada pela intensidade e duração do estresse, podendo ou não prejudicar a mobilização e deposição de cálcio nos ossos e interromper a maturação dos condrócitos.

MARCHINI (2012), em seus resultados, observou que o estresse cíclico por calor na granja do 16^o ao 42^o dia de idade durante uma hora não influenciou as características macroscópicas ($p=0,30$) e microscópicas da região epifisária ($p=0,06$) da tíbia de frangos machos CobbAvian48. Constatou-se que as aves estressadas por calor cíclico não apresentaram diferença para as avaliações de discondroplasia tibial (DT), visto que elas tiveram oportunidade de recuperar o equilíbrio metabólico nos períodos noturnos quando a temperatura permanecia na faixa termoneutra das aves.

Na situação de incubação, o embrião fica totalmente limitado, sem ter condição de se recuperar do estresse pelo calor, e dessa forma as consequências tornam-se maiores, onde na presente pesquisa, observaram-se incidências de discondroplasia tibial (DT) a partir dos 14º dias de idade, independente do tratamento utilizado (Tabela 12).

TABELA 12 Frequência e severidade de discondroplasia tibial (DT) na placa de crescimento na porção proximal, nas idades de um, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de frangos de corte machos originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Idade (dias)	Tratamentos	DT (%)	Grau de lesão (Escore histológico)				
			0	1	2	3	4
1	Controle	0	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	25(OH)D ₃	0	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
7	Controle	0	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	25(OH)D ₃	0	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
14	Controle	41,66	7/12	0/12	3/12	1/12	1/12
	25(OH)D ₃	25,00	9/12	1/12	0/12	0/12	2/12
21	Controle	25,00	9/12	0/12	1/12	1/12	1/12
	25(OH)D ₃	50,00	6/12	1/12	0/12	1/12	4/12
28	Controle	50,00	6/12	1/12	0/12	2/12	3/12
	25(OH)D ₃	41,66	7/12	1/12	0/12	1/12	3/12
35	Controle	41,66	7/12	1/12	0/12	1/12	3/12
	25(OH)D ₃	25,00	9/12	1/12	0/12	0/12	2/12

BRITO (2008) também registrou a incidência de 45,8 a 64,6% em seus estudos, obtendo resultado significativo quando avaliou o metabólito 25(OH)D₃ em diferentes níveis e associações com vitamina D₃ nas rações de frango de corte, confirmando a efetividade do metabólito em reduzir a incidência de DT.

Análise de resistência óssea das tíbias

Os resultados da resistência óssea da tíbia obtidos nas idades de 14, 21, 28 e 35 dias não apresentaram efeito ($p > 0,05$) nos tratamentos utilizados no presente experimento (Tabela 13).

Em algumas idades, as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃ apresentaram maior valor de carga máxima aplicada, mas os resultados não foram suficientes para expressar uma diferença ($p > 0,05$) para resistência óssea. Ao analisar a resistência óssea da tíbia com um dia de idade (Tabela 13), observou-se maior valor de carga máxima aplicada ($p < 0,05$) para aves originadas de embriões inoculados com 25(OH)D₃ no 19º de incubação em comparação com escoré do grupo controle. Resultado contrário foi observado ao avaliar a resistência óssea aos sete dias de idade, obtendo-se maiores resultados para a variável: carga máxima aplicada para o grupo controle em comparação as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃.

A resistência e força óssea não estão somente relacionadas com o conteúdo de cálcio e fósforo retido nos ossos. O osso é constituído por células vivas envolvidas numa matriz de mineralizada rica em colágeno. A matriz mineral é constituída por cálcio e fósforo, constituindo cerca de 60 a 70% do peso ósseo. Esta matriz inorgânica proporciona ao osso rigidez e resistência à compressão. Por outro lado a matriz orgânica de colágeno suporta a tensão e torção aplicada ao osso (OVIEDO-RONDÓN et al., 2006).

Um estudo realizado HAN et al. (2009) ao avaliarem o efeito da transferência maternal de D₃ e 25(OH)D₃ para sua progênie, os autores constataram diferenças na mineralização óssea em pintos de um dia, provenientes de matrizes alimentadas com diferentes níveis e associações de D₃ com 25(OH)D₃. A mineralização óssea foi melhorada pelo aumento dos níveis de D₃ e ao associar 25(OH)D₃ a baixos níveis de D₃. Além da melhora da mineralização óssea, houve a redução da severidade de discondroplasia tibial (DT), constatando que a suplementação maternal de 25(OH)D₃ é um meio eficaz no fornecimento de vitamina D para o embrião em desenvolvimento. FRASER & EMTRAGE (1976) estudaram a composição de ovos provenientes de matrizes pesadas e encontraram 5% da vitamina D depositada no ovo como 25(OH)D₃, sugerindo que o 25(OH)D₃ pode não estar em quantidade suficiente para atender o fornecimento de vitamina D no embrião em desenvolvimento. ATENCIO et al. (2005) concluíram, em experimentos realizados com reprodutoras, que o efeito do metabólito 25(OH)D₃ em relação à vitamina D₃ depende dos níveis testados e

quando comparada às fontes de vitamina D, o efeito do metabólito 25(OH)D₃ foi maior apenas quando suplementado em baixos níveis.

Ao analisar os dados de peso e medidas de comprimento e espessura mediana da tíbia na presente pesquisa, observou-se que não houve diferença entre os tratamentos nas idades de 1, 7, 14, 21, 28 dias (Tabela 13).

TABELA 13 Resistência óssea, de tíbias de frangos de corte machos proveniente de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Tratamentos	Peso seco	Resistência	Medidas de comprimento e	
	Tíbia (g)	Óssea (N)	espessura óssea (mm)	
	PT	CM	CT	ET
1 dia de idade				
Controle	0,0826	12,94b	26,40	1,72
25(OH)D ₃	0,0855	14,66a	26,17	1,71
P	0,2630	0,0209	0,3784	0,7501
C.V. (%)	10,19	18,15	3,35	5,88
7 dias de idade				
Controle	0,3159	78,46 a	37,15	2,73
25(OH)D ₃	0,3150	64,86 b	36,79	2,78
P	0,9560	0,0128	0,6040	0,5599
C.V. (%)	12,99	16,36	4,54	8,01
14 dias de idade				
Controle	1,1741	193,66	47,45	4,34
25(OH)D ₃	1,2230	231,77	48,86	4,42
P	0,4362	0,1316	0,1436	0,6155
C.V. (%)	12,60	28,03	4,73	9,06
21 dias de idade				
Controle	2,5118	259,11	59,9350	5,7250
25(OH)D ₃	2,5597	253,79	61,0816	5,9216
P	0,6855	0,8428	0,1137	0,3941
C.V. (%)	11,27	25,29	2,82	9,52
28 dias de idade				
Controle	4,2661	224,58	72,4483	6,8625
25(OH)D ₃	4,3607	275,26	72,9033	7,1808
P	0,7068	0,3342	0,6893	0,2861
C.V. (%)	14,10	48,94	3,79	10,16
35 dias de idade				
Controle	6,1386	173,46	84,2300	8,5541a
25(OH)D ₃	6,4966	176,39	84,4592	7,8183b
P	0,5056	0,8854	0,8784	0,0064
C.V. (%)	20,51	28,15	4,3	7,32

*Diferença significativa para o teste F ($p < 0,05$). PT: peso da tíbia (g); CM: carga máxima aplicada (N); CT: comprimento da tíbia (mm) e ET: espessura mediana da tíbia (mm).

Somente, aos 35 dias, maiores resultados de espessura da tíbia, foram encontrados para o grupo controle em comparação as aves originadas de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃.

TABELA 14 Resultados de correlações de Pearson para os valores de PT: peso da tíbia (g); CM: carga máxima aplicada (N); CT: comprimento da tíbia (mm) e ET: espessura mediana da tíbia (mm) de frangos de corte machos, originados de embriões inoculados ou não no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Correlações	PT	CM	CT	ET
1 dia de idade				
PT	1,0000	0,1669	0,1176	0,1750
CM		1,0000	0,0338	0,1651
CT			1,0000	0,1535
ET				1,0000
7 dias de idade				
PT	1,0000	0,1508	0,5983*	0,2640
CM		1,0000	0,1462	0,1175
CT			1,0000	0,1257
ET				1,0000
14 dias de idade				
PT	1,0000	0,5643*	0,4843*	0,8168*
CM		1,0000	0,2261	0,4740
CT			1,0000	0,4208
ET				1,0000
21 dias de idade				
PT	1,0000	0,3391	0,6371*	0,8522*
CM		1,0000	-0,0183	0,4174
CT			1,0000	0,4684
ET				1,0000
28 dias de idade				
PT	1,0000	0,4338*	0,4249*	0,7402*
CM		1,0000	0,0529	0,1201
CT			1,0000	0,1588
ET				1,0000
35 dias de idade				
PT	1,0000	0,2357	0,0200	0,2227
CM		1,0000	-0,0930	0,3354
CT			1,0000	0,3258
ET				1,0000

(*) Valores de correlação são estatisticamente diferentes de zero, pelo teste t, com nível de significância de 5%.

Houve correlação positiva aos 14, 21 e 28 dias com as variáveis da carga máxima aplicada (CM), do comprimento (CT), da espessura mediana (ET) e do peso (PT) da tíbia. Para as tíbias de maior peso, comprimento e espessura foram necessários aplicar maior carga máxima nas provas de resistência óssea. Os resultados nessas idades foram semelhantes, em ambos os tratamentos e sem apresentar diferença ($p>0,05$). Nas idades de um, sete e 35 dias não se constatou correlação entre essas variáveis (Tabela 14).

Análise de densidade mineral óssea das tíbias

Os resultados da densidade mineral óssea (DMO) da tíbia obtidos nas idades de 14, 21, 28 e 35 dias não apresentaram efeito ($p>0,05$) nos tratamentos utilizados no presente experimento (Tabela 15).

TABELA 15 Densidade mineral óssea (DMO) obtida em milímetros de alumínio, de tíbias de frangos de corte machos, provenientes de embriões inoculados no 19º de incubação com 25(OH)D₃

Densidade Mineral Óssea (mmAl)	Tratamentos		P *	CV%
	Controle	25(OH)D ₃		
DMO 14D	1,322	1,337	0,856	15,04
DMO 21D	1,780	1,839	0,532	12,51
DMO 28D	1,860	1,817	0,727	16,30
DMO 35D	1,916	1,849	0,428	10,81

*Diferença não significativa para o teste de análise de variância ($p>0,05$).

A densidade mineral óssea é considerada como um indicador de qualidade óssea. Entretanto, o estado do osso não pode ser descrito apenas por uma propriedade. Estudos recentes têm demonstrado que somente a mineralização óssea não reflete a força de quebra e nem as propriedades mecânicas dos ossos. As ligações e o conteúdo de colágeno ocupam um papel importante na resistência óssea. Se um osso for muito mineralizado vai possuir uma boa rigidez, mas ao mesmo tempo vai ser facilmente quebrável quando sujeito a tensão. Por outro lado ossos pouco mineralizados vão ser menos rígidos, mas mais maleáveis não quebrando com tanta facilidade (OVIEDO-RONDÓN et al., 2006).

TABELA 16 Resultados de correlações de Pearson para os valores de PV: peso vivo (g); PT: peso da tíbia (g); CM: carga máxima aplicada (N); CT: comprimento da tíbia (mm); ET: espessura mediana da tíbia (mm) e DMO: densidade mineral óssea (mmAl) de frangos de corte machos, originados de embriões inoculados ou não no 19^o de incubação com 25(OH)D₃

Correlações	PV	PT	CM	CT	ET	DMO
14 dias de idade						
PV	1,0000	0,4188*	0,1035	0,5666*	0,3717	0,1068
PT		1,0000	0,5643*	0,4843*	0,8168*	0,4712*
CM			1,0000	0,2261	0,4740	0,3816
CT				1,0000	0,4208	0,3045
ET					1,0000	0,1696
DMO						1,0000
21 dias de idade						
PV	1,0000	0,7793*	0,3149	0,6546*	0,5214*	0,2545
PT		1,0000	0,3391	0,6371*	0,8522*	0,4298*
CM			1,0000	-0,0183	0,4174*	0,2688
CT				1,0000	0,4684*	0,2493
ET					1,0000	0,4228*
DMO						1,0000
28 dias de idade						
PV	1,0000	0,4560	-0,0955	0,3863	0,4977*	0,1375
PT		1,0000	0,4338	0,4249*	0,7402*	0,5574*
CM			1,0000	0,0529	0,1201	0,1782
CT				1,0000	0,1588	0,0809
ET					1,0000	0,4810*
DMO						1,0000
35 dias de idade						
PV	1,0000	0,2906	0,2239	0,1789	0,6457*	0,3019
PT		1,0000	0,2357	0,0200	0,2227	0,4842*
CM			1,0000	-0,0930	0,3354	0,1366
CT				1,0000	0,3258	-0,0714
ET					1,0000	0,3025
DMO						1,0000

(*) Valores de correlação são estatisticamente diferentes de zero, pelo teste t, com nível de significância de 5%.

Na presente pesquisa, foi possível observar que a carga máxima aplicada nas provas de resistência óssea não apresentou correlação com a densidade mineral óssea nas idades de 35, 28, 21 e 14 dias, constatando-se que outros fatores relacionados à composição do osso devem ser avaliados, conforme os relatos de OVIEDO-RONDÓN et al. (2006). Os resultados de correlação entre carga máxima aplicada e a densidade mineral óssea foram diminuindo com o avançar da idade da ave, mas não se observou efeito significativo (Tabela 16).

No presente experimento, a densidade mineral óssea apresentou correlação positiva com o peso, comprimento e espessura da tíbia, sendo o peso e a espessura, variáveis com maior correlação nas idades de 21 e 28 dias e o peso e o comprimento, nas idades de 14 e 21 dias.

O que se pode verificar é que existem outros fatores a serem avaliados para determinar uma relação das avaliações de qualidade óssea com a idade da ave, ou seja, as características do esqueleto da ave jovem apresentam respostas diferentes nas avaliações de resistência óssea. Aves jovens apresentam ossos pouco mineralizados, menos rígidos e mais maleáveis. O comportamento biomecânico muda de acordo com composição do osso ao avançar a idade das aves. Então, o conteúdo de colágeno dos ossos nessa idade apresenta um importante papel nas avaliações da qualidade do esqueleto do pintainho. Entretanto, não foi objetivo essa avaliação no presente experimento.

4. CONCLUSÃO

A inoculação de 25(OH)D₃ *in ovo* em embriões no 19º dia de incubação não melhora as características de qualidade óssea em frangos de corte machos.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA PAZ ICL, MENDES AA, TAKITA TS, VULCANO LC, GUERRA PC, WESCHSLER FS, GARCIA, RG, TAKAHASHI, SE, MOREIRA, J, PELÍCIA K, KOMIYAMA CM, QUINTERIO RR. Comparison of techniques of tibial dyscondroplasia assessment in broiler chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n.1, 27-31, 2005.
2. ALMEIDA PAZ, I.C.L. Problemas Locomotores e Técnicas de Mensuração. SIMPOSIO SOBRE BEM-ESTAR DE FRANGOS E PERUS, 2008, Santos (SP). **Anais...** Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. São Paulo: Facta, 2008. p.57-68.
3. ATENCIO, A.; PESTI, G.M; EDWARDS, JR. H.M. Twenty-five hydroxycholecalciferol as a cholecalciferol substitute in broiler breeder hen diets and its effect on the performance and general health of the progeny. **Poultry Science**, v.84, p.1277-1285, 2005.
4. BAINS, B.S.; BRAKE, J.T.; PARDUE, S.L. Reducing leg weakness in commercial broilers. **World Poultry**, v. 14, n 1, p. 24-27, 1998.
5. BERNARDI, R. **Problemas Locomotores em Frango de Corte**. Dourados (MS): UFGD. 62f. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Grande Dourados, 2011.
6. BORGES, S. A.; FISCHER DA SILVA, A. V.; MAJORKA, A.; HOOGE, D. M.; CUMMINGS, K. R. Physiological responses of broiler chicken to heat stress and electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalent per kilogram). **Poultry Science**, v. 83, n. 9, p. 1551-1558, 2004.
7. BRITO, J. A. G. **Vitamina D₃ (Colecalciferol) e 25-Hidroxi-Colecalciferol (25-OHD₃) em Rações de Frangos de Corte**. Lavras (MG): UFLA, 2008. 120p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras, 2008.
8. BUSHINSKY, D. A.; SESSLER, N. E. Critical role of bicarbonate in calcium release from bone. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 262, n. 3, p. 425-431, 1992.
9. CRESPO, R.; SHIVAPRASAD, H. L. Developmental, methabolic and other noninfections disorders. Chapter 31. In: SAIF, Y. M. et al. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11. Ed. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists, Iowa State Press, p. 1055-1102, 2003.
10. DSM NUTRITIONAL PRODUCTS, **Suplemento** - Nutra Notícias – Cálcio e Fósforo em frango de corte – necessidades e relações, fev, 2008. Latin American Feed Industry Disponível em: america-latina.dnp@dsm.com
11. ESTEVEZ, I. Problemas de Mobilidade e Bem-Estar Animal. **Anais...** Conferência APINCO 2010 Ciência e Tecnologia Avícolas. Facta, p. 35-47.

12. FERNANDES, B. C. S; MENDES, A. A.; ALMEIDA PAZ, I. C. L.; MARTINS, M. R. F. B.; KOMIYAMA, C. M. Problemas Locomotores em Frangos de corte e sua relação com o Gait Score. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**, 2012.
13. FRASER, D.R.; EMTAGE, J.S. Vitamin D in the avian egg. Its molecular identity and mechanism of incorporation into yolk. **Biochemistry Journal**, v.160, p. 671-682, 1976.
14. GARNER, J.P.; FALCONE, C.; WAKENELL, P.; MARTIN, M.; MENCH, J.A. Reliability and validity of a modified gait scoring system and its use in assessing tibial dyschondroplasia in broilers. **British Poultry Science**, v. 43, p. 355-362, 2002.
15. GONZALES, E; MENDOÇA JR. C.X. Problemas locomotores em frangos de corte. VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó, SC – Brasil. **Anais...**, p. 79-94, 2006.
16. GONZALES, E.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Editora Facta. Campinas, SP, 2000.
17. GONZALEZ-ESQUERRA, R.; LEESON S. Physiological and metabolic responses of broilers to heat stress - implications for protein and amino acid nutrition. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 2, p. 282-295, 2006.
18. HAN, J.C.; YANG, X.D.; ZHANG, LI, H.; LI, W.L.; ZHANG, Z.Y.; YAO, J.H. Effects of 1 α -hydroxycholecalciferol on growth performance, parameters of tibia and plasma, meat quality, and type IIb sodium phosphate cotransporter gene expression of one-to-twenty-one-day-old broilers. **Poultry Science**, v.88, p.323-329, 2009.
19. ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. **Doenças do Sistema Esquelético em Frangos (Patogênese e Patogenia)**, Ed: DSM NUTRITIONAL PRODUCTS, 2008. p.2-86.
20. JULIAN, R. J. Rapid growth problems: Ascites and skeletal deformities in broilers. **Poultry Science**, v.77, p.1773-1780, 1998.
21. JULIAN, R. Patologias ósseas em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...**, Volume 2, Campinas: FACTA, 2005. p. 107-122.
22. KESTIN, S.C.; KNOWLES, T.G. TINCH, A.E.; GREGORY, N.G. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. **Veterinary Record**, v.131, p. 190-194, 1992.
23. LEACH, R.M.; LIBURIN, M.S. Current Knowledge on the etiology of tibial dyschondroplasia in the avian species. **Poultry Science Review**, v. 82, p. 57-65, 1992.

24. LETERRIER C; NYS Y “Clinical anatomical differences in varus and valgus deformities of chick limbs suggest different aetio-pathogenesis” **Avian Pathology**, v.21, p.429-442, 1992.
25. MARCHINI, C.F.P. **Desempenho, alterações ósseas e intestinais de frangos de corte submetidos ao estresse cíclico por calor**. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, 2012, 110f, 2012.
26. McNAMME, P. T. et al. Study of leg weakness in two commercial broilers flocks. **Veterinary Record**, v. 143, p. 131-135, 1998.
27. OVIEDO-RONDÓN, E, FERKET P, HAVESTEIN G “Understanding long bone development in broilers and turkeys” **Avian and Poultry Biology Reviews**, v.17, n.3, p.77-88, 2006.
28. OVIEDO-RONDÓN, E. “Leg Health in Large Broilers” **NC Broiler Supervisors’ Short Course**, 2008a.
29. OVIEDO-RONDÓN, E. “ Factores que Afectam a Capacidade de Andar em Perus e Frangos” **Aves e Ovos**, p. 14-23, 2008b.
30. PATTISON, M. Impacts of bones problems on the poultry meat industry, Chapter 18. In: WHITEHEAD, C. C. (Ed.). **Bone biology and skeletal disorders in poultry**. Poultry Science Symposium. Carfax Publishing Company, n. 23. p. 329-338, 1992.
31. PRAUL, C. A.; FORD, B. C.; GAY, C. V. Gene expression and tibial dyschondroplasia. **Poultry Science**, v.79, p. 1009-1013, 2000.
32. R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available at < <http://www.R-project.org/> assessed in 2012.
33. RANDALL, C. J.; MILLS, C. P. J. Observations on leg deformity in broilers with particular reference to the intertarsal joint. **Avian Pathology**, v.10, p. 407-431, 1981.
34. RATH, N. C; HUFF, WE.; BAYARI, G. R.; BALOG, J. M. Cell death in avian tibial dyschondroplasia. **Avian Diseases**, v.42 p.72-79. 1998.
35. RIDDELL, C. Non infectious skeletal disorders of poultry: an overview. Chapter 8. In: WHITEHEAD, C. C. (Ed.). **Bone biology and skeletal disorders in poultry**. Poultry Science Symposium. Carfax Publishing Company, n. 23, p. 119-145, 1992.
36. SAHIN, K.; ONDERCI, M.; SAHIN, N.; BALCI, T. A.; GURSU, M. F.; JUTURU, V.; KUCUK, O. Dietary Arginine Silicate Inositol Complex Improves Bone Mineralization in Quail. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 486–492, 2006.

37. SCAHAW - Scientific Committee on Animal Health and Welfare. **The Welfare of Chickens Kept for Meat Production (Broilers) European Commission**, Brussels, Belgium Adopted 21 March 2000.
38. SANOTRA, G.S.; LUND, J.D.; ERSBOLL, A.K. Monitoring leg problems in broilers: a survey of commercial broiler production in Denmark. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.55-69, 2001.
39. SAUVER, B., MONGIN, P. Influence of dietary level of chloride sodium and potassium on chick cartilage abnormalities. In: WORLD POULTRY CONGRESS, 15, 1974, New Orleans. **Anais... WPSA**. 1974 p.180-181.
40. SKKINER-NOBLE, D. O.; TEETER, R. G. An examination of anatomic, physiologic, and metabolic factors associated with well-being of broilers differing field gait score. **Poultry Science**, v.88, p.2-9, 2009.
41. SBCAL/COBEA: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) **Proteção e Bem Estar de Animais de Laboratório**. <http://www.cobea.org.br/>
42. SOLEIMANI, A. F.; ZULKIFLI, I.; OMAR, A. R.; RAHA, A. R. Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1435-1440, 2011.
43. SORENSEN, P. Genetics of leg disorders. Chapter 12. In: WHITEHEAD, C. C. (Ed.). **Bone biology skeletal disorders in poultry**. Poultry Science Symposium. Carfax Publishing Company, n. 23, p. 213- 230, 1992.
44. SOUZA, A. F. G.O. Tecido ósseo em frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 1, p. 1663-1679, 2012. Disponível em:http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/_JAN2012_.pdf.
45. TAKITA, T. S. **Efeito do genótipo, do ambiente e da interação genótipo x ambiente na incidência de discondroplasia tibial em frangos de corte machos**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 43f, 1998.
46. THORP, B.H. Abnormalities in the growth of leg bones. **In Bone Biology and Skeletal Disorders - Poultry Science Symposium Number Twenty-three**. Edit.: C. C. Whitehead. Carfax Publishing Company. 147-166, 1992.
47. TONA, K.; BAMELIS, F.; DE KATELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; MORAES, V.B.M.; BUYSE, J.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of storage time on spread of hatch, chick quality and chick juvenile growth. **Poultry Science** v.82, p.763-741, 2003.
48. WHITEHEAD, C. C. Factores nutricionales que influyen en los problemas óseos actuales de los broilers. **Anais...46 Symposium Científico de Avicultura**, Ed: Asociación Española de Ciencia Avícola WPSA, p 69-80, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O metabólito 25(OH)D₃ tem sido estudado em pesquisas científicas, visto que a forma hidroxilada apresenta maior polaridade em relação à vitamina D₃. Os benefícios do uso desse metabólito na ração já foram relatados por diferentes pesquisadores, e sua ação na incidência de alterações locomotoras, como a discondroplasia tibial (DT) foi constatada, entretanto, poucas pesquisas abordaram o uso do metabólito 25(OH)D₃ *in ovo*, o que se objetivou estudar na presente pesquisa.

A partir dos experimentos realizados, constatou-se que a inoculação do metabólito 25(OH)D₃ *in ovo* no 19º dia de desenvolvimento embrionário associado à vacinação automática nos incubatórios comerciais possui potencial para diminuir a janela de nascimento e aumentar a eclodibilidade dos ovos férteis. É possível inferir que a melhora dessas variáveis influencie na qualidade dos pintainhos quando submetidos à incubação em máquinas de estágio único sob condições normais de temperatura durante o processo de incubação, visto que se constatou redução da mortalidade no campo.

Entretanto, ao estudar as mesmas variáveis, mas em condições de temperaturas elevadas na 3ª semana de incubação em máquinas de estágio único, não foi possível observar melhorias da inoculação do metabólito 25(OH)D₃ *in ovo* no 19º dia de desenvolvimento embrionário. Mesmo assim, constatou-se redução na mortalidade aos 35 dias de idade para o grupo inoculado com 25(OH)D₃, mas sem efeito significativo no desempenho dos frangos. De certa forma, aves inoculadas com 25(OH)D₃ apresentaram maior viabilidade no campo ao comparar com o tratamento controle nas duas condições de temperatura de incubação (normal e stress térmico).

Ao avaliar a qualidade óssea de frangos provenientes de embriões inoculados com 25(OH)D₃ *in ovo* no 19º dia de desenvolvimento embrionário incubados em máquinas de estágio único sob condições de temperaturas elevadas durante a 3ª semana de incubação, verificou-se que a inoculação de 25(OH)D₃ não melhorou a qualidade do esqueleto. O que pode ser observado foi a incidência de discondroplasia tibial (DT) em ambos os tratamentos, mas sem apresentar diferença significativa. Entretanto, a resistência óssea foi melhorada

nos pintainhos com um dia de idade originados dos embriões inoculados com 25(OH)D₃. Mas, essa característica não permaneceu nas idades subsequentes, e até piorou aos sete dias de idade. Sendo assim, serão necessárias, outras avaliações para elucidar esses resultados, já que a densidade mineral óssea não foi avaliada nas idades de um e sete dias de idade.

Seguindo os mesmos critérios de avaliação, porém em períodos distintos de experimento, a avaliação da inoculação de 25(OH)D₃ *in ovo* no 18º dia de desenvolvimento embrionário quando incubados em máquinas de estágio múltiplo sob condições normais de temperatura de incubação não foi eficaz, registrando piores resultados no período de incubação, eclodibilidade dos ovos férteis sem diferença significativa, pior qualidade do neonato e redução do peso aos sete dias de idade para os embriões inoculados com 25(OH)D₃, sendo os machos os mais prejudicados.

Sugere-se que a mensuração dos efeitos da inoculação de 25(OH)D₃ *in ovo* na eclodibilidade dos ovos férteis, mortalidade embrionária, qualidade do neonato, desempenho, mortalidade e qualidade do esqueleto sejam realizados em outras pesquisas. Mas, partindo-se do conhecimento da suplementação de vitamina D nas reprodutoras e do conhecimento da quantidade dessa vitamina presente no ovo, para que seja possível definir com exatidão a dosagem ideal desse metabólito, com o intuito de elucidar melhor os resultados.

A viabilidade econômica da inoculação de 25(OH)D₃ *in ovo* deve ser avaliada criteriosamente, visto que existe grande diversidade nas respostas encontradas, relacionadas à heterogeneidade do conteúdo de vitamina D nas amostras de ovos e dos processos diferenciados de incubações. O fato é que, na presente pesquisa, pode-se observar potencial de melhoria para eclodibilidade, redução da janela de nascimento e redução da mortalidade no campo. Outras avaliações como a resposta imune das aves e qualidade do esqueleto devem ser levadas em consideração com o objetivo de elucidar os baixos índices de mortalidade dos frangos.