



**DANUSA GEBIN DAS NEVES**

**NUTRIÇÃO *IN OVO*: ADIÇÃO DE GLICEROL EM  
OVOS EMBRIONADOS DE FRANGOS DE CORTE**

**LAVRAS - MG  
2015**

**DANUSA GEBIN DAS NEVES**

**NUTRIÇÃO *IN OVO*: ADIÇÃO DE GLICEROL EM OVOS EMBRIONADOS  
DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Não Ruminantes, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientadores

Dr. Édison José Fassani

Dr. Renata Ribeiro Alvarenga

**LAVRAS – MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Neves, Danusa Gebin das.

Nutrição *in ovo*: Adição de glicerol em ovos embrionados de frangos de corte / Danusa Gebin das Neves. – Lavras: UFLA, 2015. 66 p.; il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Bibliografia.

1. Avicultura. 2. Desempenho Pós-eclosão. 3. Desenvolvimento Embrionário. 4. Epitélio Intestinal. 5. Metabolismo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**DANUSA GEBIN DAS NEVES**

**NUTRIÇÃO *IN OVO*: ADIÇÃO DE GLICEROL EM OVOS EMBRIONADOS  
DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Não Ruminantes, para obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 07 de agosto de 2015**

Dr. Adriano Geraldo	IFMG
Dr. Édison José Fassani	UFLA
Dr. Luciano José Pereira	UFLA
Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA

Orientador  
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientadores  
Dr. Édison José Fassani  
Dr. Renata Ribeiro Alvarenga

**LAVRAS – MG  
2015**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pela bênção de cada dia.

Aos meus pais, Sonia e Hélio, por apoio incondicional e por serem meus maiores exemplos. Ao meu irmão, Diogo, aos meus tios e cunhada por todo incentivo e ajuda. Especialmente a minha petítica, Maria Clara, mesmo tendo chegado há pouco tempo me ensinou o sentimento de ser tia, me dando animo e inspiração para continuar com essa etapa.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade concedida para realização do Mestrado em tão renomada instituição. À Capes, pela concessão da bolsa de estudos e ao Cnpq pelo apoio à pesquisa.

À todos os professores que encontrei neste caminho e pude absorver um pouco de seus conhecimentos, em especial a Professora Dr. Renata Ribeiro Alvarenga e ao Professor Dr. Édison José Fassani pela co-orientação e amizade; e ao Professor Dr. Márcio Zangeronimo pela orientação, dedicação e paciência, fazendo com que minha admiração e respeito aumentassem cada vez mais.

Aos Professores Adriano, Raimundo e Luciano que participaram da banca avaliadora contribuindo muito com esse estudo.

Aos funcionários do departamento de Zootecnia e do setor de Fisiologia e Farmacologia, em especial ao Sr. William, braço direito.

Ao NECTA, à equipe de trabalho e amigos que ajudaram nesse projeto em especial ao Alisson, Marcelo, Pâmela, Rogério, Tacyane, Ariane, Maraísa e Edwin, sem vocês seria impossível realizar esse trabalho.

Ao Vinicius pela compreensão, companheirismo, paciência, dedicação e ajuda, mesmo com toda reclamação estando sempre ao meu lado.

À todos que torceram, acompanharam e de alguma forma contribuíram para a realização desta etapa.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação *in ovo* de glicerol no desenvolvimento pós-eclosão de pintos de corte. Um total de 408 ovos férteis foram distribuídos em seis grupos experimentais constituídos por cinco soluções salina 0,9% com diferentes concentrações de glicerol 85% (0,0; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 nmol/mL), mais um grupo controle (sem inoculação). As inoculações foram realizadas aos 17 dias de incubação para avaliações de eclodibilidade, mortalidade embrionária, peso corporal e das vísceras, morfometria do epitélio intestinal, glicemia e atividade da glicerol quinase hepática de pintos ao nascimento e aos sete dias de idade. A inoculação de soluções contendo glicerol não influenciou o peso ao nascimento e os pesos relativos do fígado, pâncreas, intestino e peito. Houve efeito quadrático dos níveis de glicerol sobre os pesos do resíduo vitelínico e da moela e sobre a glicemia e efeito linear crescente nos pesos do baço e do coração, na altura das vilosidades no duodeno e no íleo, na profundidade de criptas no jejuno e no íleo e na atividade da glicerol quinase hepática. Aos sete dias de idade não houve efeito do glicerol no peso corporal e no das vísceras, mas aumentou a altura das vilosidades e a profundidade das criptas no íleo, porém com redução dessa última no jejuno e na glicemia. Conclui-se que o glicerol pode ser utilizado como substrato na nutrição *in ovo* de frangos de corte na dose de 12,5 nmol/mL, por melhorar as condições do epitélio intestinal após a eclosão e as reservas vitelínicas até sete dias após a eclosão.

**Palavras-chave:** Avicultura. Desempenho Pós-eclosão. Desenvolvimento Embrionário. Epitélio Intestinal. Metabolismo. Substrato Energético.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of feeding *in ovo* with glycerol on post-hatch development of broiler chicks. A total of 408 fertile eggs were distributed into six experimental groups consisting of five 0,9% saline solutions with different concentrations of glycerol 85% (0.0, 12.5, 25.0, 37.5 and 50.0 nmol/ml) and a control group (without inoculation). The inoculations were conducted at 17 days of incubation, in order to evaluate hatchability, embryo mortality, body weight and viscera weight, intestinal epithelial morphometry, glycemia and glycerol kinase activity of liver in chicks at hatching and at 7 days of age. The inoculation of solutions with glycerol did not influence the hatching weight and relative weights of the liver, pancreas, intestine and chest. There was quadratic effect of glycerol levels on the weights of yolk residue and gizzard and glycemia; as well as increasing linear effect over the weights of spleen and heart, over at the height of the the villus of the duodenum and the ileum, at the depth of the crypts in the jejunum and ileum, and over hepatic glycerol kinase activity. At seven days of age, there was occurred no effect of glycerol over body weight and viscera weight; However, the height of villus and depth of the crypts in the ileum, with decrease glycemia and of the crypts in the jejunum. We conclude that glycerol can be used as substrate for *in ovo* nutrition of broiler chicks egg at the dose of 12.5 nmol/mL, for improving the conditions of the intestinal epithelial after hatching and yolk reserves in up to seven days after hatching.

**Keywords:** Poultry. Post-hatch Performace. Embryo Development. Intestinal Epithelial. Metabolism. Energy Substrate.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Composição dos grupos experimentais .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 2. Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações para frangos de corte na fase de 1 a 7 dias. ....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 3. Porcentagem de mortalidade embrionária e de eclosão em ovos inoculados aos 17 dias de incubação com soluções contendo diferentes concentrações de glicerol (n = 68).....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 4. Efeito da inoculação de glicerol sobre o peso corporal e das vísceras, morfometria do epitélio intestinal, glicemia e atividade da glicerol quinase hepática (GK) de pintos ao nascimento. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 5. Equações de regressão para os níveis de glicerol inoculados em ovos embrionados de frangos de corte. Variáveis obtidas após a eclosão....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 6. Efeito da inoculação de glicerol sobre o peso corporal e das vísceras, morfometria do epitélio intestinal, glicemia e atividade da glicerol quinase hepática (GK) de pintos aos 7 dias de idade.....</b>	<b>57</b>



## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência pós-eclosão .....	10
2.1.1 Desenvolvimento do trato gastrointestinal antes e após a eclosão .....	12
2.2 A utilização de nutrientes do ovo pelo embrião.....	16
2.3 A nutrição <i>in ovo</i> como alternativa para melhorar o desempenho de frangos de corte.....	18
2.4 O potencial do glicerol como nutriente na nutrição <i>in ovo</i> .....	22
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
REFERÊNCIAS.....	26

### SEGUNDA PARTE

INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS EMBRIONADOS DE FRANGOS DE CORTE .....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	39
<i>Incubação</i> .....	39
<i>Soluções inoculadas e delineamento experimental</i> .....	40
<i>Procedimento experimental e obtenção das amostras</i> .....	40
<i>Análise de glicemia e atividade da glicerol quinase no fígado</i> .....	42
<i>Histologia do intestino delgado</i> .....	43
<i>Análise estatística</i> .....	43
RESULTADOS .....	44
DISCUSSÃO .....	45
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	60

## 1. INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento das aves industriais aliado à redução do tempo de abate fez com que o período de incubação passasse a representar cerca de 30% do ciclo de vida do animal, sendo, portanto, considerado importante. Durante essa fase o embrião utiliza os nutrientes contidos no ovo, porém, esse apresenta pequenas quantidades de carboidratos, cerca de 1% do total de nutrientes. Desse montante, apenas 0,3% é constituído por glicose livre, que é considerada o principal substrato energético para as células, especialmente em condições anaeróbicas.

Nas etapas finais da incubação, há grande demanda de energia para a bicagem da casca. Nesse momento, as células musculares utilizam suas reservas de glicogênio para obtenção da glicose, normalmente em condições de baixas concentrações de oxigênio. Após a eclosão, enquanto a ave não inicia a alimentação exógena, a glicemia é mantida a partir da glicogenólise e da gliconeogênese a partir de aminoácidos no fígado, reduzindo a disponibilidade desses últimos para a síntese proteica no músculo. Como consequência, há redução da taxa de crescimento pós-eclosão.

A presença de nutrientes na gema tem sido associada ao rápido desenvolvimento do trato gastrointestinal após a eclosão, favorecendo a saúde intestinal e os processos digestivos da ave. Dessa maneira, a inoculação *in ovo* de nutrientes pode ser uma alternativa para melhorar o desempenho da ave na granja.

Estudos mostram que o glicerol representa não só uma importante fonte de energia, mas também um importante substrato gliconeogênico, que poderia poupar o uso de aminoácidos necessários para a síntese proteica. Nesse sentido, objetiva-se avaliar o efeito da inoculação *in ovo* de soluções contendo glicerol no desenvolvimento embrionário e pós-eclosão de pintos de corte.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Desenvolvimento embrionário e sobrevivência pós-eclosão**

Ao contrário dos mamíferos, o desenvolvimento embrionário das aves é restringido pelo conteúdo de nutrientes presentes no ovo. Sendo assim, a quantidade e a qualidade nutricional do ovo podem influenciar diretamente a qualidade e a sobrevivência do pinto após a eclosão (Torre et al., 1992).

O desenvolvimento embrionário pode ser dividido em quatro fases: a morfogênese e a organogênese, que ocorrem até o 10º dia de incubação; a fase de integração funcional, quando os órgãos já formados passam a atuar de forma interligada e não independentes; e a fase final, a partir do 14º dia, quando ocorre a maturação embrionária (Willier, 1954). Nessa última fase, o embrião aumenta consideravelmente em tamanho e os tecidos se desenvolvem até o ponto em que a ave está pronta para eclodir, que ocorre após 20 a 21 dias de incubação (Deeming, 2002).

O ovo é composto pela gema, albúmen e pela casca, as quais contêm os nutrientes que serão utilizados pelos embriões durante e logo após a eclosão. A gema representa uma importante fonte de proteínas e lipídeos para o embrião (Gonçalves et al., 2013). Já o albúmen, além de proteger o embrião das infecções microbianas e manter a inércia térmica do ovo, fornece água, minerais e aminoácidos (Sturkie, 1998). A casca, além de ser uma barreira física contra a invasão bacteriana e perda excessiva de água, permite a troca de gases e disponibiliza cálcio para formação e calcificação dos ossos nos estágios mais avançados da embriogênese (Alcroft, 1964).

Durante a incubação, o âmnio, o saco vitelínico e o alantóide participam como estruturas importantes para o desenvolvimento embrionário das aves

(Figura 1). A formação do âmnio inicia-se a partir de 30 horas de incubação com o crescimento da prega cefálica e se completa por volta de 72 horas com a união da prega caudal, originando uma cavidade cheia de líquido. (Freeman & Vince, 1974), com a função de evitar a desidratação do embrião, isolar as oscilações de temperatura, proteger contra choques e evitar a aderência às outras membranas causando malformações (Romanoff, 1960). Por volta do 12º dia de incubação ocorre a transferência de parte das proteínas do albúmen para o fluido amniótico. Durante os próximos dias de incubação, essas proteínas transferidas são ingeridas pela ave e direcionadas até o trato digestório (Deeming, 2002). A outra parte das proteínas do albúmen é absorvida pelo saco vitelínico e incorporada à gema (Gonçalves et al., 2013).

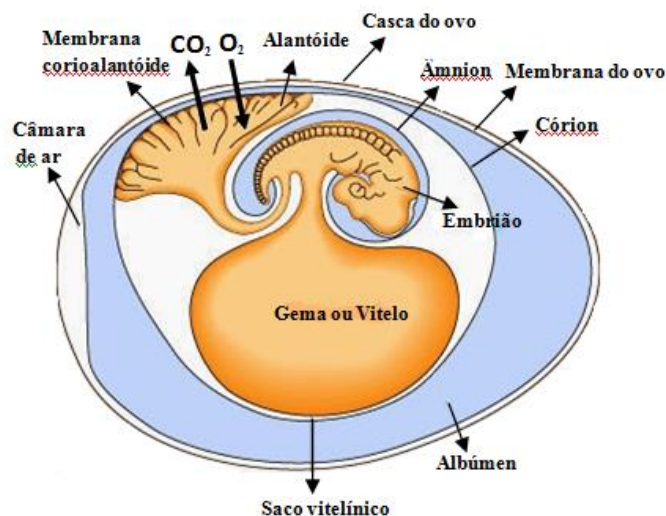


Figura 1. Embrião e seus anexos embrionários.

Fonte: Macari et al. (2013).

O saco vitelínico surge a partir de 48 horas como uma extensão do trato digestório, delimitando a gema. Por volta do 12º dia de incubação é unida ao

intestino delgado na junção do jejuno e do íleo (Deeming, 2002). Durante o desenvolvimento embrionário, os vasos sanguíneos progridem sobre a área vitelínica, de forma que a membrana vitelínica fica totalmente vascularizada. Nesse momento, o papel mais importante da membrana do saco vitelínico é a obtenção de nutrientes para o embrião, atuando como um órgão digestivo e de absorção (Freeman & Vince, 1974). No terço final da incubação, a gema é internalizada na cavidade abdominal da ave e garante o suprimento energético e nutritivo por até 48 horas após a eclosão (Gonçalves et al., 2013).

O alantóide surge por volta de 65 a 69 horas de incubação como uma projeção do intestino grosso. À medida que ocorre o desenvolvimento embrionário o alantóide se une ao córion, uma membrana que circunda o embrião, originando a membrana corioalantóide (Deeming, 2002), que é responsável pelo equilíbrio ácido-base, reabsorção de água e eletrólitos a partir do alantóide, transporte de cálcio da casca para o embrião, além de atuar como órgão respiratório. Também no alantóide, os produtos residuais dos rins são descartados (Gabrielli e Accili, 2010).

Durante a última fase do desenvolvimento embrionário, o trato digestório se desenvolve e passa por alterações drásticas em sua ultraestrutura antes da eclosão. Nesse momento, a ingestão do fluido amniótico representa a primeira refeição de um pintinho (Gonçalves et al., 2013). O fluido amniótico é ingerido por volta do 13º dia de incubação e estendendo-se até o 18º dia, preparando o trato gastrointestinal para a nutrição pós-eclosão (Bohorquez, 2010).

### **2.1.1. Desenvolvimento do trato gastrointestinal antes e após a eclosão**

O desenvolvimento inicial de formação do trato gastrointestinal ocorre nas primeiras 24 horas de incubação. Ao quinto dia de vida embrionária, ocorre

o início da formação da boca, do proventrículo e da moela. No sexto dia, tem-se início a formação do bico. A penetração do intestino na cavidade abdominal acontece no 14º dia e no 17º ocorre a abertura do divertículo de Meckel, com a penetração do saco vitelínico na cavidade abdominal. Nesse momento, inicia-se o mecanismo fisiológico da absorção do saco vitelínico (Maiorka & Rocha, 2009).

No decorrer da incubação, o crescimento do intestino delgado é maior do que os demais órgãos, representado pelo crescimento acelerado da muscular externa e das vilosidades (Uni et al., 2003). Aos 15 dias de incubação as vilosidades são rudimentares, porém, aos 17 dias, podem ser observadas duas fases de desenvolvimento: vilosidades maiores, em forma de pêra e vilosidades menores, mais estreitas e em forma de foguete, representando cerca de 65 % do tamanho das vilosidades maiores. Com 19 ou 20 dias de incubação ocorre crescimento de 30 a 40% das vilosidades (Uni et al., 2003). À medida que o vilo cresce, ocorre o desenvolvimento da cripta, onde são originados os enterócitos que aumentam da superfície absorptiva (Ozaydin & Celik, 2012). Essas mudanças preparam o trato gastrointestinal para o período pós-eclosão.

Durante a incubação, os nutrientes destinados ao embrião são representados pelos lipídios presentes no saco vitelínico e pelas proteínas presentes no albúmen (Santos et al., 2010). Devido ao crescimento do embrião, o aumento da pressão intra-ovo é evitado pela ingestão do fluido amniótico. Com a alimentação do embrião ocorre absorção parcial das proteínas pelos enterócitos durante o trânsito pelo duodeno e jejuno (Sugimoto et al., 1999; Moran Junior, 2007). Nessa etapa que antecede a eclosão ocorre grande gasto energético pelo intestino, em função de alterações morfológicas e fisiológicas como o aumento do comprimento intestinal, do desenvolvimento do epitélio e da camada muscular, aumentando de forma significativa a capacidade de digestão e de absorção do órgão. Também nessa fase, ocorre aumento na produção de enzimas

digestivas pancreáticas e de membrana (Maiorka et al., 2002). Contudo, após a eclosão, o pintinho continua com o seu intestino relativamente subdesenvolvido (Lilburn, 1998).

No momento da eclosão, os pintinhos pesam aproximadamente 45 g com um saco vitelino internalizado que corresponde cerca de 18% do seu peso corporal (Noble & Ogunyemi, 1989). O conteúdo do saco vitelínico representa a principal fonte de energia após o nascimento (Sato et al., 2006; Nangsuay et al., 2011), até a ave ser capaz de utilizar com eficiência os substratos energéticos da ração. Na eclosão, a gema contém aproximadamente 50% de lipídeos, que contribuem para a manutenção da ave jovem durante os primeiros dias após o nascimento (Anthony et al., 1989; Noy et al., 1998). Depois da eclosão, os resíduos da gema são transportados para a circulação via sistema vascular e para o intestino, através do divertículo do saco vitelínico (Esteban et al., 1991; Noy et al., 1998). O tamanho do saco vitelínico diminui exponencialmente após a eclosão, passando de 4,6 g à eclosão (Nitsan et al., 1991) para menos de 1,0 g com 96 horas após o nascimento, quando as células linfóides começam a se reunir, obstruindo o divertículo do saco vitelínico (Olah & Glick, 1984; Noy & Sklan, 1998).

O período imediato após-eclosão é caracterizado por ser de transição entre a utilização do conteúdo do saco vitelínico, rico em lipídeos, para a alimentação exógena, rica em carboidratos e proteínas (Sklan, 2001). Assim como no momento que antecede a eclosão, essa transição é acompanhada pelo rápido desenvolvimento físico e funcional do trato gastrointestinal (Uni et al., 1999), com alterações morfológicas e fisiológicas expressivas como a proliferação, diferenciação e maturação celular, apoptose na mucosa do intestino (Dibner & Richards, 2004). De acordo com Maiorka et al. (2003), esse desenvolvimento pode ser mensurado pelo aumento da altura e quantidade dos

vilos, com o ápice ocorrendo entre o terceiro e o sétimo dia pós-eclosão (Murakami et al., 1992).

O duodeno é o segmento intestinal de maior área de absorção até os 4 dias de idade, uma vez que apresenta maior densidade e altura de vilos comparado ao jejuno e íleo. Em contraste, no jejuno e íleo, o aumento no volume das vilosidade mantem até 10 dias de idade (Uni et al., 1995). Já o aumento na profundidade da cripta é observado em todos segmentos do intestino delgado, com estabilidade aos 14 dias de idade no duodeno e no jejuno e aos 28 dias de idade no íleo (Marchini et al., 2011).

Na prática, com a implantação de sistemas de incubação artificial para a produção de frangos industriais, as aves que eclodem de forma precoce permanecem dentro da incubadora sem acesso à alimentação e à água, dependendo apenas dos nutrientes contidos na gema. Além disso, manejo como determinação de sexo, classificação das aves, vacinação e transporte até as granjas prolongam ainda mais o período de restrição, algumas vezes, por mais de 48 horas. Durante esse tempo, as aves chegam a perder cerca de 4 g de peso corporal a cada 24 horas, decorrente das perdas de umidade bem como a utilização de nutrientes contidos na gema (Noy & Skalan, 1998; Batal & Parsons, 2002; Tweed, 2005). Esse atraso no acesso à alimentação e à água limita o desenvolvimento do trato gastrointestinal nos primeiros dias pós-eclosão das aves (Uni et al., 1998; Halevy et al., 2000), prejudicando a absorção de nutrientes e tornando os pintinhos mais susceptíveis aos agentes patogênicos que prejudicam a saúde intestinal (Dibner et al., 1998). Esses são alguns dos principais problemas que podem limitar o desempenho inicial da ave e comprometer a homogeneidade do lote, o peso de abate e o rendimento dos cortes.



## 2.2 A utilização de nutrientes do ovo pelo embrião

Para que ocorra o crescimento do embrião, alguns substratos metabólicos devem estar disponíveis. O ovo representa uma estrutura suficientemente completa para permitir o desenvolvimento embrionário do pintinho (Shanawany, 1984). Onze por cento do peso do ovo corresponde à casca, 31% à gema e 58% ao albúmen. Entretanto, essas quantidades podem variar em função do tamanho do ovo ou linhagem, idade e nutrição da matriz.

De uma maneira geral, a concentração de carboidratos é considerada baixa, menos de 1% do total de nutrientes, sendo que apenas 0,3% representa glicose livre (Sugino et al., 1996). Sendo assim, durante o desenvolvimento embrionário das aves, a energia utilizada pelo embrião advém dos lipídios presentes no saco vitelínico e das proteínas presentes no albúmen (Santos et al., 2010). Particularmente entre os últimos dois ou três dias de incubação, devido à grande demanda energética para a bicagem da casca e a baixa quantidade de oxigênio disponível, os ácidos graxos não fornecem toda a energia necessária (Moran Júnior, 2007) para a eclosão. Dessa forma, o embrião passa a realizar o catabolismo anaeróbico de glicose (Oliveira et al., 2008). Para manter a glicemia e as reservas glicogênicas embrionárias, o fígado realiza a gliconeogênese a partir de aminoácidos, glicerol e outras substâncias gliconeogênicas (Oliveira et al., 2008; Sunny & Bequette, 2010). As reservas de glicogênio, especialmente a hepática, são importantes, pois preparam o embrião para a eclosão e servem de reserva energética até a obtenção de alimentação exógena (Moran Júnior, 2007). Além disso, a atividade muscular durante o processo de eclosão depende exclusivamente da glicose (Freeman & Vince, 1974). Nesse caso, o aumento da disponibilidade de carboidratos durante a fase final de incubação poderia poupar o uso de aminoácidos para a obtenção de energia.

Também por volta do 14º ou 15º dia de incubação, as proteínas do albúmen contidas no saco amniótico são ingeridas pelo embrião e passam pelo sistema gastrointestinal (Sugimoto et al., 1999), ocorrendo absorção inclusive de proteínas intactas pelos enterócitos (Moran Júnior, 2007). A partir desse momento, o pâncreas começa a secretar enzimas proteolíticas que são, no entanto, inativadas por inibidores de tripsina presentes no albúmen. Esse processo é importante para a absorção de imunoglobulinas, especialmente IgA, conferindo proteção imunológica consistente por volta do 19º dia de incubação. Quando parte dessas proteínas são utilizadas para gliconeogênese, ocorre diminuição das proteínas de defesa, predispondo a ave às infecções pós-eclosão (Muramatsu et al., 1990).

Ainda no período que antecede a eclosão, parte da gema é transportada para o intestino delgado, estimulando a atividade das enzimas pancreáticas e o desenvolvimento das vilosidades. Por cerca de duas semanas pós-eclosão, os enterócitos embrionários são substituídos por novos enterócitos, mais eficazes na digestão e absorção de nutrientes (Uni et al., 2003). O período de transição entre a utilização de nutrientes do saco vitelínico para a alimentação exógena dura aproximadamente dois a cinco dias para ser completado (Vieira, 2004). Dessa forma, o esgotamento do saco vitelínico deve coincidir com a maturidade do trato gastrointestinal, que passa a ser funcional e com capacidade de absover os nutrientes contidos nas rações.

Considerando que a deficiência de nutrientes no âmnio, em especial de carboidratos, pode limitar o desenvolvimento perieclusão, a suplementação destas substâncias diretamente nesse compartimento poderia melhorar o desenvolvimento intestinal e sua capacidade de digerir nutrientes (Uni & Ferket, 2010). Além disso, o fornecimento de rações contendo nutrientes de maior disponibilidade após o nascimento favorece o desenvolvimento do trato gastrointestinal, pelo fato de haver maior disponibilidade de substratos para o

metabolismo celular, além de poupar o uso de lipídeos e proteínas como fontes de energia (Agostinho et al., 2014). Assim, a estratégia de alimentar a ave de forma precoce é vantajosa nessa fase, melhorando também o desempenho ao longo de toda a vida produtiva do animal (Ohta et al, 1999; Tako et al., 2004; Foye et al., 2006a e b).

### **2.3. A nutrição *in ovo* como alternativa para melhorar o desempenho de frangos de corte**

A produção nacional de carne de frango é destaque no cenário nacional, totalizando, em 2014, 12,691 milhões de toneladas, dos quais 4,09 milhões foram destinados à exportação mantendo o Brasil como o maior exportador mundial (ABPA, 2015). Segundo o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA, 2014), o volume exportado pelos cinco maiores exportadores mundiais (Brasil, EUA, União Européia, Tailândia e China) deverá aumentar perto de 23% até 2023, com destaque para o Brasil, que continuará na liderança respondendo por cerca de 40% do total de carne de frango exportada no mundo.

No Brasil, a avicultura é uma atividade que passa por constantes e rápidos avanços, buscando sempre a eficiência produtiva com mínimo custo de produção, aliada ao fornecimento de produtos de qualidade ao consumidor. Devido aos avanços ocorridos no melhoramento genético nas últimas décadas, foi possível obter frangos de corte mais pesados e com reduzido tempo de abate (Belusso & Hespanhol, 2010). Assim, considerando que o tempo de vida da ave em um sistema de produção comercial seja relativamente curto, aproximadamente 42 dias de vida, assume-se que o tempo de incubação entre 20 e 21 dias seja um período relativamente importante dentro do ciclo de produção avícola, já que representa cerca de 30% do ciclo de vida do animal. Além disso, é durante a fase embrionária que ocorre a diferenciação e o desenvolvimento

tecidual e a preparação para a eclosão (Virágha et al., 1989; Davis et al., 1991). Portanto, supõe-se que qualquer limitação durante o desenvolvimento pré-eclosão resulte em baixo desempenho da ave após a eclosão.

Ainda que o ovo seja considerado completo em termos nutricionais, os percentuais de aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e lipídeos, são suficientes no terço inicial da incubação, porém, podem estar aquém dos níveis desejáveis no terço final e durante a eclosão, especialmente em ave com elevado potencial de desempenho (Gonçalves et al., 2013).

Outro problema que tem sido observado em um sistema produtivo é a imaturidade fisiológica do trato digestório das aves nos primeiros dias pós-eclosão (Noy & Uni, 2010). Esse fato limita a disponibilidade de nutrientes para o animal em uma fase considerada importante para desenvolvimento da ave, que é a fase inicial do crescimento. Além disso, a presença de material não digerido no trato gastrointestinal decorrente da alimentação exógena nos primeiros dias de vida estimula a colonização por patógenos (Lan et al., 2005), aumentando a incidência de diarreia e comprometendo o desempenho do animal. Tais características se refletem em aves mais leves ao final do ciclo produtivo. Assim, é desejável que o trato gastrointestinal se torne fisiologicamente maduro o mais cedo possível, ou seja, quanto mais rápido o intestino alcançar sua capacidade funcional, mais cedo o pintinho poderá utilizar os nutrientes da dieta, crescer de acordo com seu potencial genético e ser resistente aos processos infecciosos (Uni et al., 2003).

Uma das formas de estimular o desenvolvimento precoce do trato gastrointestinal é garantir a presença de nutrientes altamente digestíveis antes e imediatamente logo após a eclosão (Noy & Uni, 2010). Isso tem sido obtido com o uso da nutrição pré-alojamento (Peebles et al., 2005; Careghi et al., 2005; Pedroso et al., 2005) ou da nutrição *in ovo* (Grodzik et al., 2013; Leitão et al., 2014). A nutrição *in ovo* é uma prática que consiste no fornecimento de

nutrientes para o pintinho durante o seu desenvolvimento embrionário, ou seja, antes da eclosão, tendo como objetivo melhorar o desenvolvimento do embrião no estágio final de incubação e garantir o fornecimento de nutrientes antes e após a eclosão (Foye et al., 2006a), além de aumentar o desenvolvimento muscular (Moore, 2005; Kornasio et al. 2011), a eficiência alimentar (Kornasio et al. 2011), melhorar a mineralização óssea (De Oliveira, 2007; Yair et al. 2011), fortalecer o sistema imunológico (Azadegan Mehr et al., 2014) e estimular o desenvolvimento das células envolvidas no processo digestivo nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-eclosão do pintinho (Agostinho et al., 2014).

A vantagem da nutrição *in ovo* sobre a alimentação precoce é a possibilidade de auxiliar na eclosão dos pintinhos. Essa técnica não substitui os benefícios da alimentação precoce, mas potencializa seus efeitos se as duas práticas forem combinadas ou, pelo menos, minimiza os efeitos adversos da pós-eclosão (Uni & Ferket, 2004). Como a vacinação *in ovo* está se tornando uma ferramenta popular nos incubatórios, existe também a possibilidade da aplicação da técnica da nutrição *in ovo*. Porém, pouco se sabe acerca das quantidades e dos tipos de nutrientes que podem ser utilizados nessa prática.

Um dos primeiros trabalhos publicados em nutrição *in ovo* foi realizado por Al-Murrani (1982), o qual inoculou no saco vitelínico de ovos embrionados de frangos de corte aos 7 dias de desenvolvimento, uma mistura de aminoácidos idêntica à composição encontrada no ovo. Nesse trabalho, foi obtido maior peso ao nascimento e aos 56 dias de idade das aves. Porém, sua intenção não era fazer nutrição *in ovo*, mas provar que galinhas poedeiras precisavam de proteína adicional em suas dietas. Posteriormente, Ohta et al. (1999) não observaram diferenças ao inocularem um *pool* de aminoácidos em ovos embrionados de frangos de corte, sugerindo que o conteúdo de aminoácidos presentes no ovo é suficiente para o desenvolvimento embrionário.

A maioria dos estudos realizados nas décadas seguintes ao primeiro experimento estavam focados em vacinação *in ovo*, prática que tornou-se amplamente adotada pela indústria avícola (Johnston et al., 1997). A técnica *in ovo* é uma das maiores contribuições da pesquisa com aves, juntamente com sexagem pelas penas, estratégias nutricionais para evitar problemas nas pernas, triagem de sangue para eliminar portadores de patógenos e sequenciamento do genoma (Smith, 2006). Entretanto, somente em 2003 que as pesquisas sobre nutrição *in ovo* foram retomadas (Uni & Ferket, 2004).

Logo após a eclosão, as reservas de glicogênio do pintinho são mínimas, com uma relação inversa com o peso corporal, o que indica uma demanda metabólica da ave por esse substrato (Lilburn, 1998). Embora lipídios e proteínas presentes no saco vitelínico sejam utilizados no metabolismo celular e no atendimento da exigência energética, o enriquecimento do fluido amniótico com carboidratos previamente à eclosão poderia disponibilizar mais energia para o embrião, elevando as reservas de glicogênio e diminuindo o uso das proteínas musculares para essa finalidade, contribuindo para melhor desempenho da ave (Uni et al., 2005).

Diversos estudos mostram que os pintinhos são capazes de utilizar soluções nutritivas antes da eclosão (Pedroso et al., 2005; Grodzik et al., 2013; Leitão et al., 2014). Tako et al. (2004) observaram que a administração de carboidratos (maltose, dextrina e sacarose) *in ovo* promove maior tamanho dos vilos e maior eficiência intestinal, o que favoreceu o desempenho geral dos animais. Isso também foi constatado por Leitão et al. (2014) ao inocularem maltose e/ou sacarose. Entretanto, nesse trabalho, maior tamanho dos vilos foi observado apenas após eclosão, além de atraso no nascimento. Uni et al. (2005) constataram que a administração *in ovo* de sacarose, maltose, dextrina ou  $\beta$ -hidroximetilbutirato foi essencial para suprir o *déficit* energético do embrião no momento da eclosão, resultando em aumento no peso corporal ao nascimento e

maior peso de peito. Campos et al. (2011) verificaram que a inoculação de solução nutritiva contendo 2,5 % de glicose + 3,0 % de sacarose proporciona maior ganho de peso, melhor conversão alimentar, maior rendimento de peito com osso e rendimento de filé de peito de frangos aos 21 dias de idade, entretanto, menor taxa de eclodibilidade associada à mortalidade foi observada. Shafey et al. (2012) encontraram aumento no peso e no teor de glicogênio ao inocularam uma mistura de maltose, sacarose e dextrina em ovos de matrizes de duas idades diferentes (29 e 35 semanas) submetidos a duas temperaturas de incubação (37,5 e 38,5 °C) e também constataram que matrizes mais velhas e ovos incubados em temperaturas elevadas diminuem o teor de glicogênio, assim como o peso ao nascimento.

Atualmente, nutrição precoce é um conceito aceitável, com vantagens claramente reconhecidas. No entanto, a grande questão continua a ser qual a melhor forma de aplicar a técnica de nutrição *in ovo*. Assim, a suplementação alimentar *in ovo* poderia ajudar a diminuir os problemas da alimentação tardia pós-eclosão.

#### **2.4. O potencial do glicerol como nutriente na nutrição *in ovo***

O glicerol ou propano-1,2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool, que se apresenta como líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (IUPAC, 1993). Pode ser proveniente tanto das gorduras animais e dos óleos vegetais, quanto da indústria petroquímica (Schuchardt et al., 1998). Nos animais o glicerol é derivado da lipólise no tecido adiposo, nas lipoproteínas presentes do sangue e da gordura dietética (Lin, 1977).

A absorção do glicerol ocorre nos enterócitos por difusão, por meio de proteínas carreadoras de membrana, as aquaporinas dos tipos 3, 7 e 9, também

denominadas aquagliceroporinas (Roudier et al., 1998; Hara-Chikuma & Verkman, 2006 ). Além de ser absorvido no intestino, sua absorção também acontece no estômago, no entanto, de forma mais lenta (Herting et al., 1956).

Para ser utilizado na produção de energia, o glicerol tem que ser convertido em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima glicerol quinase (GK), presente principalmente no fígado mas também nos rins. Além da GK, mais duas enzimas estão envolvidas no metabolismo do glicerol, a glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica (G3P desidrogenase ou G3P oxiredutase) e a glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (Lin et al., 1976).

A GK, a primeira a participar na metabolização do glicerol, é considerada uma fosfotransferase, pois catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para o glicerol. Essa enzima possui constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de  $3,16 \times 10^{-6} M$ , valor considerado baixo, o que explica a sua alta afinidade pelo glicerol (Robinson & Newsholme, 1969).

A glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica oxida NADH reduzindo a dihidroxiacetona a glicerol 3 fosfato e a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial reduz FAD, que é utilizado pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Robergs & Griffin, 1998). Essas enzimas são moduladas pela insulina, pelos corticosteróides e pelos hormônios da tireóide (Lin, 1977). Dessa forma, a quantidade de glicose gerada depende da quantidade de glicerol consumido. Caso não ocorra a fosforilação do glicerol pela GK, esse não será aproveitado pelo organismo animal e, conseqüentemente, será excretado pelos rins.

A manutenção da síntese de glicogênio no fígado e no músculo e da gliconeogênese no fígado são essenciais para a sobrevivência dos embriões. Esses processos metabólicos, dependem da presença de aminoácidos gliconeogênicos e de lipídeos, que são oxidados para o fornecimento de energia. Dessa forma, além de fonte de energia, o glicerol também pode ter efeito



poupador de aminoácidos, já que é um composto gliconeogênico (Brennan et al., 1975; Chan et al. 1981). De acordo com Cerrate et al. (2006), o glicerol é capaz de inibir a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glutamato desidrogenase, resultando em economia dos aminoácidos gliconeogênicos e favorecendo a deposição de proteína corporal.

Outra característica benéfica do glicerol está associada à reabsorção de água pelos rins e à capacidade de reter líquido pelo organismo (Montner et al., 1999). Atletas ingerindo solução de água e glicerol tiveram aumento na retenção de água algumas horas antes da competição (Kavouras et al., 2006). Com isso, acredita-se que a injeção *intra ovo* de glicerol possa minimizar a desidratação dos pintinhos recém-eclodidos até que tenham o primeiro acesso à água.

Estudos avaliando a inclusão de glicerol ou glicerina na dieta de frangos, também comprovaram benefícios desse substrato no desempenho das aves e no rendimento de carcaça (Simon et al., 1996; Cerrate et al., 2006; Guerra et al., 2011; Silva et al., 2012), aumentando também a atividade da GK no fígado (Bernardino et al., 2014). Como o glicerol é o principal precursor para a gliconeogênese e para a síntese de glicogênio (Sunny & Bequette, 2011), supõe-se que a inoculação *intra ovode* glicerol pode favorecer os reservatórios de glicogênio hepático das aves e disponibilizar aminoácidos para o desenvolvimento do sistema imune ou crescimento muscular. Até o presente momento, não há relatos na literatura comprovando os possíveis benefícios do glicerol no desenvolvimento embrionário e pós-eclosão de frangos de corte.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os conhecimentos sobre a fisiologia digestiva das aves e composição nutricional de substratos exógenos mostram que a capacidade de aproveitamento dos nutrientes pode ser melhorada de maneira prática com a aplicação da

nutrição precoce. O conceito de nutrição *in ovo* é aceitável, com vantagens claramente reconhecidas, porém, a grande questão continua a ser qual a melhor forma de aplicar essa técnica.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, T. S. P. et al. Desenvolvimento de órgãos do trato gastrintestinal e desempenho de frangos de corte arraçoados na fase pré-alojamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 4, p. 1143-1155, out./dez. 2014.

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

ALCROFT, W. M. **Incubation and hatchery practice**. London: Her Majesty's Stationary Office, 1964. 71 p.

ANTHONY, N. B.; DUNNINGTON, E. A.; SIEGEL, P. B. Embryo h of normal and dwarf chickens from and low56-day body weight. **Archiv fur Geflugelkunde**, Berlin, v. 53, n. 3, p. 116-122, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Cenário carnes 2014/2015**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/camaras\\_setoriais/Aves\\_e\\_suinios/25RO/Cen%C3%A1rio%20Carnes%202014%202015.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Aves_e_suinios/25RO/Cen%C3%A1rio%20Carnes%202014%202015.pdf)>. Acesso em: 21 jul. 2015.

AZADEGAN MEHR, M. et al. Effects of *in ovo* injection of conjugated linoleic acid on immune status and blood biochemical factors of broiler chickens. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.12, n. 2, p. 455-461, 2014.

BATAL, A. B.; PARSONS, C. M. Effect of fasting versus feeding oasis after hatching on nutrient utilization in chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, n. 6, p. 853-859, Jun. 2002.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso - NEMO**, Maringá, v.2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BERNARDINO, V. M. P. et al. Content of plasmatic glycerol and activity of hepatic glycerol kinase in broiler chickens fed diets containing different sources and concentrations of glycerine. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 98, n. 2, p. 328-337, Apr. 2014.

BOHORQUEZ, D. V. **Nutricional influences on the ultra-structural development of the small intestinal epithelium of the perinatal turkey embryo and poultry**. 2010. 185 p. Dissertation (Ph.D. of Philosophy) - North Carolina State University, Raleigh, 2010.

BRENNAN, M. F. et al. Glycerol: major contributor to the short term protein sparing effect of fat emulsions in normal man. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 182, n. 4, p. 386-394, Oct. 1975.

CAMPOS, A. M. A. et al. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 8, p. 1712-1717, 2011.

CAREGHI, C. et al. The effects of the spread of hatch and interaction with delayed feed access after hatch on broiler performance until seven days of age. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 8, p. 1314-1320, Aug. 2005.

CERRATE, S. et al. Evaluation of glycerin from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Arkansas, v. 5, n. 11, p. 1001-1007, 2006.

CHAN, P. H.; POLLACK, E.; FISHMAN, R. A. Differential effects of hypertonic mannitol and glycerol on rat brain metabolism and amino acids. **Brain Research**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 143-153, Nov. 1981.

DAVIS, C. A. et al. Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum. **Development**, Cambridge, v. 111, n. 2, p. 287-298, Feb. 1991.

DEEMING, D. C. **Avian incubation:** behaviour, environment, and evolution. Lincoln: Oxford University Press, 2002. 440 p.

DIBNER, J. J. et al. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 7, n. 4, p. 425-43, 1998.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. The digestive system: challenges and opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 13, n. 1, p. 86-93, 2004.

ESTEBAN, S. et al. A role played by the vitelline diverticulum in the yolk sac resorption in young posthatched chickens. **Journal of Computational Physics**, Orlando, v. 160, n. 6, p. 645-648, Nov. 1991.

FOYE, O. T.; UNI, Z.; FERKET, P. Effect of in ovo feeding egg white protein,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1185-1192, July 2006.

FREEMAN, B. M.; VINCE, M. A. **Development of the avian embryo**. London: Chapman and Hall, 1974. 362 p.

GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, Cairo, v. 2010, p. 1-12, Jan. 2010.

GONÇALVES, F. M. et al. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 62, p. 45-55, Sep. 2013.

GRODZIK, M. et al. Nano-nutrition of chicken embryos. the effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and L-Glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 11, p. 23033-23044, Nov. 2013.

GUERRA, R. L. H. et al. Glicerina bruta mista na alimentação de frangos de corte (1 a 42 dias). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 4, p. 1038-1050, out./dez. 2011.

HALEVY, O. et al. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 4, p. 858-864, Apr. 2000.

HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A. S. Physiology roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 12, p. 1386-1392, Jun. 2006.

HERTING, D. C.; EMBREE, N. D.; HARRIS, P. L. Absorption of acetic acid and glycerol from rat stomach. **American Journal Physiology**, Bethesda, v. 187, p. 224-226, 1956.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds**. Oxford, 1993. 1330 p.

JOHNSTON, P. A. et al. Applications in ovo technology. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 165-178, Jan. 1997.

KAVOURAS, S. A. et al. Rehydration with glycerol: endocrine, cardiovascular, and thermoregulatory responses during exercise in the heat. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 100, n. 2, p. 442-450, Feb. 2006.

KORNASIO, R. et al. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 1467-1477, Jul. 2011.

LAN, Y. et al. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 61, n. 1, p. 95-104, Mar. 2005.

LEITÃO, R. A. et al. Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2014.

LILBURN, M. S. Practical aspects of early nutrition in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 7, n. 4, p. 420-424, Apr. 1998.

LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977.

LIN, M. H.; ROMSOS, D. R.; LEVEILLE, G. A. Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acids synthesis in the rat and chicken. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 106, p. 1668-1677, 1976.

MACARI, M. et al. **Manejo de incubação**. 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. 468 p.

MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2002. cap. 8, p. 113-124.

MAIORKA, A.; ROCHA, C. Dietas iniciais, desenvolvimento do trato gastrointestinal e impacto sobre o desempenho de frango de corte. In: **INTESTINAL HEALTH FOOD SAFETY SEMINAR**, 5., 2009. **Anais...**[S.l.], 2009. 1 CD-ROM.

MAIORKA, E. et al. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 12, n. 4, p. 483-492, Jan./Apr. 2003.

MARCHINI, C. F. P. et al. Body weight, intestinal morphometry and cell proliferation of broiler chickens submitted to cyclic heat stress. **International Journal of Poultry Sciences**, Faisalabad, v. 10, n. 6, p. 455-460, 2011.

MONTNER, P. et al. Glycerol hiperhydration alters cardiovascular and renal function. **Journal of Exercise Physiology**, London, v. 2, n. 1, Jan. 1999. Disponível em: <<https://www.asep.org/asep/asep/jan12c.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

MOORE, D. T.; FERKET, P. R.; MOZDZIAK, P. E. The effect of early nutrition on satellite cell dynamics in the young turkey. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 748-756, May 2005.

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

MURAKAMI, H.; AKIBA, Y.; HORIGUCHI, M. Growth and utilization of nutrients in newlyhatched chicks with or without removal of residual yolk. **Growth Development Aging**, Melbourne, v. 56, n. 2, p. 75-84, 1992.

MURAMATSU, T. et al. Importance of albumen content in whole- body protein synthesis of the chicken embryo during incubation. **British Poultry Science**, London, v. 31, n. 1, p. 101-106, Mar. 1990.

NANGSUAY, A. et al. Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 2648-2655, Nov. 2011.

NITSAN, Z. et al. Growth and development of digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, London, v. 32, n. 3, p. 515-523, July 1991.

NOBLE, R. C.; OGUNYEMI, D. Lipid changes in the residual yolk and liver of the chick immediately after hatching. **Biology Neonate**, Basel, v. 56, n. 4, p. 228-236, 1989.

NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilisation in the newly hatched poult. **British Poultry Science**, London, v. 39, n. 3, p. 446-451, July 1998.



NOY, Y.; UNI, Z. Early nutritional strategies. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 66, n. 4, p. 639-646, Dec. 2010.

OHTA, Y. et al. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 1493-1498, Nov. 1999.

OLAH, I.; GLICK, B. Meckelsdiverticulum: 1., extramedullary myelopoiesis in the yolk sac of hatched chickens (*Gallus domesticus*). **Anatomical Record**, New York, v. 208, p. 243-252, 1984.

OLIVEIRA, J. E. de. **Effects of in ovo feeding on turkey embryos development, energy status, intestinal maturation, gene expression and post-hatch development**. 2007. 299 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - North Carolina State University, Raleigh, 2007.

OLIVEIRA, J. E. de; UNI, Z.; FERKET, P. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v.64, n. 4, p. 488-499, Dec. 2008.

OZAYDIN, T.; CELIK, I. Histological, histochemical and immunohistochemical investigations on the developing small intestines of broilers embryos. **Journal of Animal and Veterinary Advanced**, Philadelphia, v. 11, n. 16, p. 2936-2944, 2012.

PEDROSO, A. A. et al. Suplementos utilizados como hidratantes nas fases pré-alojamento e pós-alojamento para pintos recém eclodidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 627-632, jul. 2005.

PEEBLES, E. D.; KEIRS, R. W.; BENNETT, L. Relationships among pre-hatch to post-hatch physiological parameters in early nutrient restricted broilers hatched from eggs laid by young breeder hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 3, p. 454-461, 2005.

ROBERGS, R. A.; GRIFFIN, S. E. Glycerol: biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. **Sports Medicine**, Auckland, v. 26, n. 1, p. 145-167, Jan. 1998.

ROBINSON, J.; NEWSHOLME, E. A. Some properties of hepatic glycerol kinase and their relation to the control of glycerol utilization. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v. 112, n. 4, p. 455-464, Apr. 1969.

ROMANOFF, A. L. **The avian embryo**. New York: The Macmillan, 1960. 1305 p.

ROUDIER, N. et al. Evidence for the presence of Aquaporin-3 in Human red blood cells. **The Journal of Biological Chemistry**, London, v. 273, n. 14, p. 8407-8412, Apr. 1998.

SANTOS, T. T. et al. Influence of in ovo inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 19, n. 1, p. 1-12, Jan./Apr. 2010.

SATO, M.; TACHIBANA, T.; FURUSE, M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 143, n. 3, p. 382-388, Mar. 2006.

SHAFEY, T. M. et al. In ovo feeding of carbohydrates and incubated at a high incubation temperature on hatchability and glycogen status of chicks. **South African Journal of Animal Science**, Hatfield, v.42, n. 3, p. 210-220, 2012.

SHANAWANY, M. M. Inter-relationship between egg weight, parental age and embryonic development. **British Poultry Science**, London, v. 25, p. 449-455, 1984.

SHUCHARDT, U. F.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 199-210, May 1998.

SILVA, C. L. S. et al. Glycerine derived from biodiesel production as a feedstuff for broiler diets. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 193-202, jul./set. 2012.

SIMON, A. Administration of glycerol to broilers in the drinking water. **Landbauforschung Volkenrode**, Braunschweig, v. 169, p. 168-170, 1996.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 57, n. 4, p. 415-428, Dec. 2001.

SMITH, R. Poultry industry must partner with researchers. **Feedstuffs**, Minnetonka, v.78, n. 32, p. 8, Aug. 2006.

STURKIE, P. D. **Sturkie's avian physiology**. 5<sup>th</sup> ed. London: Academic, 1998. 704 p.

SUGIMOTO, Y. et al. Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 16, p. 11030-11037, Apr. 1999.

SUGINO, H.; NITODA, T.; JUNEJA, L. R. General chemical composition of hen eggs. In: YAMAMOTO, T. et al. (Ed.). **Heneggs their basic and applied science**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 13-24.

SUNNY, N. E.; BEQUETTE, B. J. Gluconeogenesis differs in developing chick embryos derived from small compared with typical size broiler breeder eggs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 912-921, Mar. 2010.

SUNNY, N. E.; BEQUETTE, B. J. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 12, p. 3945-3953, Dec. 2011.

TAKO, P.; FERKET, P.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 12, p. 2023-2028, Dec. 2004.

TORRE, B. L. et al. The nutrition of the fetus with intestinal atresia: studies in the chick embryo model. **Journal of Pediatric Surgery**, Kansas, v. 27, n. 10, p. 1325-1328, Oct. 1992.

TWEED, S. **The Hatch Window**: Cobb-Vantress technical focus. Siloam: Springs, 2005. v. 2, 8 p.

UNI, Z. et al. *In ovo* feeding improves energy status of lateterm chicken embryos. **Poultry Science**, Champaign, v.84, n. 5, p. 764-770, May 2005.

UNI, Z. et al. Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 1747-1754, Nov. 2003.

UNI, Z.; FERKET, P. Alimentação in ovo: impacto sobre o desenvolvimento intestinal, teor corporal de energia e desempenho. In: CONFERÊNCIA FACTA 2010 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2010, Santos. **Anais...** Santos, 2010. p. 109-122.

UNI, Z.; FERKET, R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 60, n. 1, p. 101-111, Mar. 2004.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy- and light-strain chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 1622-1629, 1995.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 1, p. 215-222, 1999.

UNI, Z.; PLATIN, R.; SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v.168, n. 4, p. 241-247, May 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA agricultural projections to 2023**: interagency agricultural projections committee. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/noticias/index.php?codnoticia=14980>>. Acesso dia: 28 abr. 2014.

VIEIRA, S. L. Digestão e utilização de nutrientes após a eclosão de frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 5., 2004, Chapecó. **Anais...** Chapecó, 2004. p. 26-41.

VIRÁGHA, S. Z.; SZABÓÁ, E.; CHALLICE, C. E. Formation of the primitive myo- and endocardial tubes in the chicken embryo. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Manchester, v. 21, p. 123-137, 1989.

WILLIER, B. H. Phases in embryonic development. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, Amsterdam, v.43, p. 307-317, 1954.

YAIR, R.; UNI, Z. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 1523-1531, Jul. 2011.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**Inoculação de glicerol em ovos embrionados de frangos de corte**

D.G. Neves, M. G. Zangeronimo‡, et al.

†Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Brasil 37200-000.

‡Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil 37200-000.

Este artigo foi redigido de acordo com as normas para submissão na revista  
Poultry Science

## 1       **INTRODUÇÃO**

2

3           O desenvolvimento embrionário das aves é limitado pelo conteúdo de  
4 nutrientes presentes no ovo, principalmente no terço final da incubação e durante  
5 a eclosão (Gonçalves et al., 2013). Esse fato torna-se ainda mais importante se  
6 considerar o potencial genético de desempenho das aves de interesse zootécnico  
7 como frangos de corte.

8           No período que antecede a eclosão, o embrião passa a realizar  
9 catabolismo anaeróbico de glicose (Oliveira et al., 2008), especialmente porque  
10 a demanda energética para a bicagem da casca é grande e a tensão de oxigênio é  
11 baixa (Moran Júnior, 2007). Como a concentração de carboidratos no ovo é  
12 considerada baixa, menos de 1% do total de nutrientes (Sugino et al., 1996),  
13 nesse momento, a glicemia e as reservas glicogênicas embrionárias são mantidas  
14 através da gliconeogênese a partir de aminoácidos, glicerol e outros compostos  
15 gliconeogênicos (Oliveira et al., 2008; Sunny & Bequette, 2010). Dessa maneira,  
16 a injeção desses substratos diretamente no âmnion poderia melhorar o  
17 desenvolvimento do embrião no estágio final de incubação.

18           Outro problema que tem sido observado nos atuais sistemas de criação é  
19 a imaturidade fisiológica do trato digestório das aves nos primeiros dias pós-  
20 eclosão (Noy & Uni, 2010). Além de limitar a disponibilidade de absorção de  
21 nutrientes necessários para o crescimento inicial, a presença de material não  
22 digerido no trato gastrointestinal permite a colonização por patógenos (Lan et  
23 al., 2005), aumentando a incidência de diarreia e comprometendo ainda mais o  
24 desempenho dos animais. Uma das formas de estimular o desenvolvimento  
25 precoce do trato gastrointestinal é garantir a presença de nutrientes altamente  
26 digestíveis antes e imediatamente após a eclosão (Noy & Uni, 2010). Isso tem  
27 sido obtido com o uso da nutrição pré-alojamento (Careghi et al., 2005) ou da  
28 nutrição *in ovo* (Grodzik et al., 2013).

29 O glicerol ou propano-1,2,3-triol que é um composto orgânico  
30 pertencente à função álcool, que se apresenta como líquido à temperatura  
31 ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (IUPAC,  
32 1993). Estudos avaliando a inclusão desse composto na dieta de frangos  
33 comprovaram incremento no desempenho das aves e no rendimento de carcaça.  
34 Sendo o glicerol o principal precursor para a gliconeogênese e para a síntese de  
35 glicogênio (Sunny & Bequette, 2011), supõe-se que a inoculação de glicerol  
36 *intra ovo* possa favorecer as reservas de glicogênio, poupar aminoácidos para o  
37 crescimento muscular e desenvolvimento do sistema imune e estimular a  
38 maturidade intestinal de frangos de corte. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o  
39 efeito da inoculação *in ovo* de glicerol no desenvolvimento pós-eclosão de  
40 pintos de corte.

41

42

## MATERIAL E MÉTODOS

43

### *Incubação*

44

45

46 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais  
47 da Universidade Federal de Lavras, sob o protocolo nº 049/14. Os ovos foram  
48 obtidos de matrizes com 54 semanas de idade da linhagem Cobb®, pertencentes  
49 a um matrizeiro comercial. Após a chegada, um total de 480 ovos foram  
50 selecionados, descartando-se aqueles trincados, pesados ( $69,31 \pm 12,6g$ ) e  
51 individualmente identificados.

52

53 Após os procedimentos iniciais, os ovos foram pré-aquecidos a 26 °C  
54 por 8 horas e distribuídos aleatoriamente nas 6 bandejas da chocadeira  
55 automática (Luna 480, Chocmaster, Piraquara, Brasil), fumigados com formol  
37% e permanganato de potássio (2:1) e incubados na temperatura de  $37,5 \pm 0,6$



56 °C e  $60 \pm 1,4\%$  de umidade (Cobb, 2008). Aos 12 dias de incubação foi  
57 realizada ovoscopia para a retirada dos ovos inférteis. Os ovos remanescentes  
58 (férteis) foram aleatoriamente distribuídos nos 6 tratamentos, de forma que em  
59 cada bandeja da chocadeira tivesse todos os tratamentos, totalizando 68 ovos  
60 para cada grupo experimental. Durante todo o período de incubação, a sala onde  
61 estava localizada a chocadeira teve a temperatura mantida a  $20,9 \pm 1,4$  °C e  
62 umidade relativa do ar de  $79 \pm 5,8\%$ .

63 As etapas desenvolvidas no decorrer do período experimental estão  
64 apresentadas na Figura 1.

65

#### 66 *Soluções inoculadas e delineamento experimental*

67

68 Os grupos experimentais foram constituídos por 5 soluções salina 0,9%  
69 com diferentes concentrações de glicerol (Glycerol 85%, Merck Millipore,  
70 Darmstadt, Alemanha) (0; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 nmol/mL), mais um grupo  
71 controle (sem inoculação). O pH e a osmolaridade das soluções foram avaliadas  
72 por pHmetro (TEC-11, Tecnal, Piracicaba, Brasil) e osmômetro (VAPRO 5520,  
73 Wescor, Logan, EUA) (Tabela 1). Previamente à inoculação, as soluções foram  
74 aquecidas a 30 °C.

75 O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5  
76 tratamentos (+ 1 controle) em dados desbalanceados, com um ovo por unidade  
77 experimental.

78

#### 79 *Procedimento experimental e obtenção das amostras*

80

81 No 17º dia de incubação, um volume de 0,5mL das soluções testadas  
82 foram inoculados no âmnion utilizando uma agulha descartável de 13,0 x 0,3mm

83 conectada a uma seringa de 1,0mL. Para certificar-se do local de inoculação  
84 (âmion), cinco ovos-teste embrionados foram inoculados com um corante  
85 solúvel em água, e em seguida, quebrados para a averiguação do local atingido.  
86 Previamente à inoculação, os ovos foram higienizados com álcool iodado a 2%  
87 na região de inserção da agulha.

88 A perfuração do ovo foi feita com o auxílio da ovoscopia. Após a  
89 inoculação, o orifício perfurado na casca foi vedado com parafina fundida  
90 (Gonzales et al., 2013). Antes dos ovos serem devolvidos à incubadora,  
91 individualmente, foram colocados em saquinhos de filó, para que, ao nascerem,  
92 os pintos pudessem ser identificados de acordo com cada grupo experimental  
93 (Pedroso et al., 2006). Todo o processo foi realizado em sala higienizada com  
94 amônia quaternária mantida a temperatura média de 30 °C e o tempo de  
95 permanência dos ovos fora da incubadora não ultrapassou 1 hora.

96 Após a eclosão e com a secagem das plumas foi averiguado o momento  
97 da eclosão e as aves foram individualmente pesadas para determinação do peso.  
98 A taxa de eclodibilidade foi obtida pela relação número de ovos eclodidos com  
99 pintos viáveis por número de ovos férteis. Ao final de 25 dias de incubação, os  
100 ovos não eclodidos foram abertos e o período da mortalidade do embrião  
101 classificado antes da inoculação e após inoculação pelo embriodiagnóstico.

102 Logo após a pesagem, seis aves de cada grupo experimental foram  
103 eutanasiadas por deslocamento cervical e a colheita de sangue com EDTA  
104 realizada durante a sangria. Em seguida, os animais foram dissecados para a  
105 retirada das vísceras, que foram pesadas, e o fígado foi colocado em saco  
106 plástico, congelado mediante mergulho em nitrogênio líquido por alguns  
107 segundos e armazenados em congelador (-20 °C) para posterior análise (Lana et  
108 al., 2000). Também foram coletadas amostras de aproximadamente 1,5 cm do  
109 duodeno, do ponto médio entre a porção proximal descendente e a distal  
110 ascendente da alça intestinal; do jejuno, do ponto médio entre a saída do ducto

111 biliar e o divertículo de Meckel; e do íleo, do ponto médio entre o divertículo de  
112 Meckel e a junção íleo-cecal. As amostras foram imersas em solução fixadora de  
113 Bouin, onde permaneceram por 24 horas, e então colocadas em álcool 70%  
114 (Vieira et al., 2006).

115 As aves remanescentes e viáveis foram alojadas em gaiolas com  
116 dimensões 50 cm de largura x 70 cm de profundidade x 25,5 cm altura em  
117 galpão de alvenaria, onde permaneceram até atingirem a idade de sete dias.  
118 Antes da chegada das aves, o ambiente foi pré-aquecido com lâmpadas  
119 infravermelho e o monitoramento das condições de ambiente durante a  
120 permanência das aves ( $32 \pm 2,4$  °C) foi realizado através do termômetro de globo  
121 negro localizado dentro do galpão. Para que as aves fossem submetidas a um  
122 mesmo período de jejum pós-eclosão, as que nasceram no período da manhã  
123 foram alojadas no final da tarde do mesmo dia, e as que nasceram no período da  
124 tarde foram alojadas na manhã do dia seguinte. No galpão experimental, todas as  
125 aves receberam água e ração à vontade, formulada a base de milho e de farelo de  
126 soja, seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011) (Tabela 2). Com sete  
127 dias de idade, as aves dos grupos controles (sem inoculação ou solução salina) e  
128 do grupo que recebeu 12,5 nmol/mL de glicerol foram eutanasiadas seguindo o  
129 mesmo procedimento descrito para as aves de um dia. Os grupos experimentais  
130 foram definidos com base no melhor resultado de eclosão.

131

### 132 *Análise de glicemia e atividade da glicerolquinase no fígado*

133

134 Após a colheita, o sangue foi centrifugado (2.000g por 5 minutos) e  
135 armazenado a -20 °C até o dia das análises. A glicemia foi determinada por teste  
136 enzimático colorimétrico (Bioliqid glicose, Laborclin, Pinhais, Brasil),  
137 seguindo as recomendações do fabricante.

138 A atividade da glicerol quinase no fígado foi avaliada com adaptações  
139 da metodologia apresentada por Bernardino et al. (2014). Para isso, 0,5g de  
140 tecido hepático congelado foi macerado em Turrax (Ultra-Turrax, T-25 basic,  
141 IKA-Werke, Staufen, Alemanha) com 1,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05M e pH  
142 8,0. Após completa maceração e homogeneização do tecido, a amostra foi  
143 centrifugada (15.000g por 20 minutos a 5°C) sendo o sobrenadante recolhido. A  
144 determinação da atividade enzimática foi realizada segundo metodologia  
145 utilizada por Kihara et al. (2009).

146

#### 147 *Histologia do intestino delgado*

148

149 As amostras do intestino foram submetidas aos procedimentos  
150 histológicos de rotina, sendo desidratadas em soluções de concentração  
151 crescente de etanol, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina,  
152 microtomizadas a 4,0µm, dispostas em lâminas de vidro silanizadas, secas em  
153 estufa a 37°C *overnight* e coradas por hematoxilina/eosina (Bancroft et al.,  
154 2008). Para cada segmento intestinal foram efetuados dois cortes de regiões  
155 diferentes, cujas imagens digitalizadas foram analisadas em microscópio  
156 Olympus CX31 (Olympus, Tokyo, Japão) acoplado à câmera digital Altra SC30  
157 (Olympus, Tokyo, Japão) usando o programa Axio Vision (Carl Zeiss,  
158 Oberkochen, Alemanha) em aumento de 100x para o duodeno e de 200x para o  
159 jejuno e íleo. Foram realizadas 10 leituras por lâmina, mensurando-se, ao acaso,  
160 a altura da vilosidade e a profundidade das criptas.

161

#### 162 *Análise Estatística*

163

164 Os dados foram submetidos à análise de variância após o teste de  
165 normalidade (Shapiro Wilk). Modelos de regressão polinomial foram utilizados

166 para avaliar os níveis de glicerol e o teste Dunnett a 5% usado para comparar o  
167 grupo controle (sem inoculação) aos demais. O teste SNK foi utilizado para  
168 comparar os níveis de glicerol quando  $R^2$  foi menor que 0,5. Toda análise  
169 estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Action 2.9, com  $\alpha =$   
170 0,05.

171

172

## RESULTADOS

173

174 A inoculação de soluções com diferentes concentrações de glicerol  
175 aumentou as taxas de mortalidade após a inoculação reduzindo o número de aves  
176 eclodidas (Tabela 3).

177

178 A inoculação de glicerol não influenciou o peso a eclosão e os pesos  
179 relativos do fígado, pâncreas e do intestino, bem como o rendimento do peito  
180 das aves (Tabela 4). No entanto, houve efeito quadrático dos níveis de glicerol  
181 sobre o resíduo vitelínico e sobre a moela e efeito linear sobre o baço e coração  
182 (Tabela 5). Também houve efeito linear sobre a altura das vilosidades no  
183 duodeno e no íleo, bem como na profundidade de criptas do jejuno e do íleo.  
184 Com relação aos parâmetros bioquímicos analisados, observou-se efeito  
185 quadrático na glicemia e linear na atividade da glicerol quinase hepática.  
186 Quando comparado ao controle (sem inoculação), o nível 50 nmol/mL de  
187 glicerol promoveu atraso na eclosão (Figura 2) e aumentou os pesos relativos do  
188 coração e do baço, enquanto que as doses de 25,0, 37,5 e 50,0 nmol/mL de  
189 glicerol proporcionaram aumento na altura de vilosidades no duodeno e íleo e a  
190 profundidade das criptas no jejuno e íleo. A adição de glicerol também  
191 promoveu aumento da atividade da glicerol quinase hepática e queda na  
192 glicemia quando comparado ao controle.

192

193 Aos 7 dias de idade, observou-se que o glicerol não influenciou o peso  
corporal e o peso das vísceras, mas aumentou a altura das vilosidades e a

194 profundidade das criptas no íleo mas reduziu essa última variável no jejuno  
195 (Tabela 6). Além disso, reduziu a glicemia das aves. Comparado ao controle, o  
196 glicerol aumentou as reservas do resíduo vitelínico e o peso relativo do intestino  
197 grosso e reduziu a altura de vilosidades no duodeno e jejuno.

198

199

## DISCUSSÃO

200

201 A técnica da nutrição *in ovo* vem alcançando resultados promissores na  
202 tentativa de melhorar o desempenho de frangos de corte (Campos et al., 2011;  
203 Leitão et al., 2014). No entanto, não há um consenso sobre os melhores  
204 substratos e suas concentrações a serem utilizados. Na literatura, poucos  
205 trabalhos fazem menção aos efeitos do glicerol, este estudo é o primeiro que  
206 relaciona o glicerol ao desenvolvimento embrionário. Sabe-se que esse  
207 composto é um importante precursor gliconeogênico, poupando o uso de  
208 aminoácidos para essa finalidade (Chan et al. 1981).

209 No presente estudo, a redução da taxa de eclosão observada com os ovos  
210 inoculados pode estar relacionada ao processo manual de inoculação. Menores  
211 taxas de eclosão também foram verificadas por Leitão et al. (2010) e Pedroso et  
212 al. (2006) ao inocularem soluções com diferentes concentrações de carboidratos.

213 Embora o glicerol inoculado tenha sido utilizado pelas aves, fato esse  
214 comprovado pelo aumento da atividade da glicerol quinase hepática (Bernardino  
215 et al., 2014), os efeitos poupadores de aminoácidos propiciados pelo glicerol e  
216 os benefícios sobre o rendimento de cortes não puderam ser evidenciados no  
217 presente estudo, uma vez que não houve diferenças entre os grupos  
218 experimentais sobre os rendimentos de peito e coxa + sobrecoxa. De acordo com  
219 Cerrate et al. (2006), o glicerol é capaz de inibir a atividade das enzimas  
220 fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glutamato desidrogenase, resultando em  
221 economia dos aminoácidos gliconeogênicos que seriam destinados ao

222 crescimento muscular. Além disso, houve queda linear da glicemia pós-eclosão  
223 de acordo com o aumento dos níveis de glicerol inoculados. Esse resultado pode  
224 estar relacionado ao atraso da eclosão quando o nível de 50 nmoL/mL de  
225 glicerol foi utilizado. De acordo com Prado-Rebolledo et al. (2009), o atraso na  
226 eclosão reduz o índice glicêmico, uma vez que a elevada atividade física  
227 muscular para a bicagem da casca aliada à baixa tensão de oxigênio até o início  
228 da respiração pelos sacos aéreos demanda maior aporte de glicose para obtenção  
229 de energia. Ademais, o maior nível de glicerol testado parece ser considerado  
230 tóxico, uma vez que reduziu de forma bastante expressiva a taxa de eclosão das  
231 aves (Tabela 3).

232         Embora não tenha sido observado diferenças no desempenho aos 7 dias  
233 de idade, o fornecimento do glicerol *in ovo* promoveu maior desenvolvimento do  
234 epitélio intestinal pós-eclosão, com aumento linear na altura dos vilos no  
235 duodeno e no íleo e da profundidade das criptas no jejuno e no íleo das aves.  
236 Uma das formas de estimular o desenvolvimento intestinal é garantir a presença  
237 de substratos energéticos, em especial carboidratos, antes da eclosão (Smirnov et  
238 al., 2006). Entretanto, resultados opostos foram observados aos 7 dias de idade,  
239 quando se observou redução da altura das vilosidades e da profundidade das  
240 criptas no duodeno e no jejuno. Esses achados também foram observados por  
241 Leitão et al. (2014) em aves com dez dias de idade suplementadas *in ovo* com  
242 maltose e/ou sacarose. De acordo com Tako et al. (2004), o efeito da  
243 alimentação *in ovo* no desenvolvimento morfológico do intestino delgado é  
244 máximo até 48 horas após a inoculação.

245         A inoculação *in ovo* de glicerol não influenciou o peso das vísceras, com  
246 exceção o peso do baço, coração e moela. O baço e o coração são vísceras que  
247 estão relacionadas ao sistema vascular e, portanto, à volemia. Relatos na  
248 literatura mostram que o glicerol está relacionado ao processo de hidratação  
249 corporal (Reynolds et al., 2012) e aumento da volemia (Schott et al., 1999). Tais

250 efeitos estão relacionados ao aumento da expressão de aquaglicerolporinas  
251 (AQP), principalmente a AQP7, fazendo com que ocorra maior reabsorção de  
252 água e glicerol nos túbulos renais, expandindo os fluídos corporais (Hibuse et  
253 al., 2009). Esse resultado sugere que o glicerol possa minimizar a desidratação  
254 das aves recém-eclodidas, especialmente aquelas provenientes de incubatórios  
255 comerciais onde passam por uma série de manejos como classificação, sexagem,  
256 vacinação e transporte até a granja, onde terão o primeiro acesso à água. Durante  
257 esse tempo, as aves chegam a perder cerca de 4 g de peso corporal a cada 24  
258 horas, decorrente não só das perdas de nutrientes contidos na gema, mas também  
259 da umidade (Batal & Parsons, 2002; Tweed, 2005).

260 Com relação ao resíduo vitelínico, soluções contendo glicerol  
261 aumentaram de maneira significativa ao nascimento e também aos 7 dias de  
262 idade. Momentos antes da eclosão e após o nascimento, os resíduos da gema são  
263 transportados para a circulação via sistema vascular do saco vitelínico e para o  
264 intestino através do divertículo do saco vitelínico (Noy et al., 1998). O resultado  
265 do presente estudo sugere que o glicerol tenha contribuído para aumentar as  
266 reservas energéticas do embrião.

267 Aos 7 dias de idade, maior peso do intestino grosso foi observado no  
268 grupo de aves que foram inoculadas com soluções contendo ou não glicerol,  
269 sugerindo que esse resultado esteja relacionado à técnica de inoculação

270 O presente estudo mostrou que o glicerol pode ser efetivo em melhorar  
271 parâmetros morfológicos do epitélio intestinal após a eclosão, as condições de  
272 hidratação das aves, além de assegurar as reservas vitelínicas por mais tempo.  
273 Embora nenhum efeito no desempenho até os 7 dias tenha sido observado,  
274 conclui-se que o glicerol pode ser utilizado como substrato na nutrição *in ovo* de  
275 frangos de corte. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para se  
276 estabelecer uma dose ideal a ser utilizada nessa técnica.

277



278       **REFERÊNCIAS**

279

280 Bancroft, J. D., and M. Gamble. 2008. Theory and Practice of Histological  
281 Techniques. 4 th .ed. Els. Hea. Sci. London, Churchill Livingstone.

282

283 Batal, A. B., and C. M. Parsons. 2002. Effect of fasting versus feeding oasis  
284 after hatching on nutrient utilization in chicks. Poul. Sci. 81:853-859.

285

286 Bernardino, V. M. P., P. B. Rodrigues, L. P. Naves, P. V. Rosa, M. G.  
287 Zangeronimo, E. M. Gomide, M. M. Saldanha, and R. R. Alvarenga. 2014.  
288 Content of plasmatic glycerol and activity of hepatic glycerol kinase in  
289 broiler chickens fed diets containing different sources and concentrations of  
290 glycerine. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 98:328–337.

291

292 Campos, A. M. A., H. S. Rostagno, P. C. Gomes, E. A. Silva, L. F. T Albino,  
293 and E. T. Nogueira. 2011. Effect of in ovo inoculation of nutritious solutions  
294 on the hatchability and performance of broiler chickens. Br. J. Anim Sci.  
295 40:1712-1717.

296

297 Careghi, C., K. Tona, O. Onagbesan, J. Buyse, E. Decuyper, and V.  
298 Bruggeman. 2005. The effects of the spread of hatch and interaction with  
299 delayed feed access after hatch on broiler performance until seven days of  
300 age. Poul. Sci. 84:1314-1320.

301

302 Cerrate, S., F. Yan, Z. Wang, C. Coto, P. Sacakli, and P. W. Waldroup. 2006.  
303 Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for  
304 broilers. Int. J. Poul. Sci. 5:1001-1007.

305

306 Chan, P. H., E. Pollack, and R. A. Fishman. 1981. Differential effects of  
307 hypertonic mannitol and glycerol on rat brain metabolism and amino acids.  
308 Brain. Res. 225:143-153.

309

310 Cobb. 2008. Cobb hatchery management guide. Cobb-Vantress. Siloam Springs.  
311 Arkansas, USA. 38p.

312

313 Gonçalves, F. M., V. L. Santos, C. L. Contreira, G. Farina, B. S. Kreuz, F. P.  
314 Gentilini, M. A. Anciuti, and F. Rutz. 2013. In ovo nutrition: Strategy for  
315 precision nutrition in poultry industry. Arch. Zootec. 62:45-55.

316

317 Gonzales, E., C. P. Cruz, N. S. M. Leandro, J. H. Stringhini, and A. B Brito.  
318 2013. In ovo supplementation of 25(OH)D<sub>3</sub> to broiler embryos. Br.J. Poul.  
319 Sci. 15:199-202.

- 320  
321 Grodzik, M., F. Sawosz, E. Sawosz, A. Hotowy, M. Wierzbicki, M. Kutwin, S.  
322 Jaworski, and A. Chwalibog. 2013. Nano-nutrition of chicken embryos. The  
323 effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and l-glutamine on  
324 molecular responses in chicken embryo pectoral muscles. *Int. J. Mol. Sci.*  
325 14:23033-23044.  
326
- 327 Hibuse, T., N. Maeda, H. Nakatsuji, Y. Tochino, K. Fujita, S. Kihara, T.  
328 Funahashi, and I. Shimomura. 2009. The heart requires glycerol as an energy  
329 substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator. *Cardiovasc. Res.* 83:34-  
330 41.  
331
- 332 IUPAC. International Union of Pure And Applied Chemistry. 1993. A Guide to  
333 IUPAC Nomenclature of Organic Compounds. ed. Blackwell Sci. Pub. Ltd.,  
334 Oxford.  
335
- 336 Kihara, F., K. Itoh, M. Iwasaka, T. Niimi, O. Yamashita, and T. Yaginuma.  
337 2009. Glycerol kinase activity and *glycerol kinase-3* gene are up-regulated by  
338 acclimation to 5°C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect*  
339 *Biochem. and Mol. Biol.* 39:763-769.  
340
- 341 Lan, Y., M. W. A. Verstegen, S. Tamminga, and B. A. Williams. 2005. The role  
342 of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's*  
343 *Poul.Sci. J.* 61:95-104.  
344
- 345 Leitão, R. A., N. S. M. Leandro, J. H. Stringhini, M. B. Café, and M. A.  
346 Andrade. 2010. Effect of maltose, sucrose and glucose supplementation in  
347 embryonated low-weight eggs. *Acta Sci. Anim. Sci.*32:93-100.  
348
- 349 Leitão, R. A., N. S. M. Leandro, J. H. Stringhini, M. B. Café, and M. A.  
350 Andrade. 2014. Effect of Maltose and Sucrose Supplementation on  
351 Embryonic Light Eggs. *Bra. Anim. Sci.* 15: 55-63.  
352
- 353 Moran Junior, E. T. 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling.  
354 *Poul. Sci.* 86:1043-1049.  
355
- 356 Noy, Y., and D. Sklan. 1998. Yolk utilisation in the newly hatched poult. *Br.*  
357 *Poul. Sci.* 39:446-451.  
358
- 359 Noy, Y., and Z. Uni. 2010. Early nutritional strategies. *World's Poul.Sci. J.*  
360 66:639-646.  
361

- 362 Oliveira, J. E., Z. Uni, and P. Ferket. 2008. Important metabolic pathways in  
363 poultry embryos prior to hatch. *World's Poul.Sci. J.* 64:488-499.  
364
- 365 Pedroso, A. A., L. S. Chaves, K. L. A. M. Lopes, N. S. M. Leandro, M. B. Café,  
366 and J. H. Stringhini. 2006. Nutrient inoculation in eggs from heavy breeders.  
367 *Br. J. Anim. Sci.* 35:2018-2026  
368
- 369 Prado-Rebolledo, O. F., B. J. E. Morales, L. J. A. Quintana, A. M. J. González,  
370 and M. J. Arce. 2009. Additional oxygen in incubation of broiler chickens.  
371 *Arch. Zootec.* 58:85-91.  
372
- 373 Reynolds, A. J., K. Sneddon, G. A. Rheinhardt, K. W. Hinchcliff, and R. A.  
374 Swenson. 1998. Hydration strategies for exercising dogs. Pages 248-249 in  
375 *Recent Advances in Canine and Feline Nutrition.* G.A. Rheinhardt, and D.P.  
376 Carey, 2th. Iams Nutr. Symp. Proc. Orange Frazer Press, Ohio.  
377
- 378 Rostagno, H.S., L.F.T. Albino, J.L. Donizete, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C.  
379 Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, R. F. Euclides, 2011. *Tabelas*  
380 *Brasileiras para Aves e Suínos - Composição de Alimentos e Exigências*  
381 *Nutricionais de Aves e Suínos .3ª ed., Viçosa: UFV, 252 p.*  
382
- 383 Schott, H. C., K. F. Düsterdieck, S. W. Eberhart, K. A. Woody, K. R. Refsal,  
384 and M. Coenen. 1999. Effects of electrolyte and glycerol supplementation on  
385 recovery from endurance exercise. *Equine Vet. J. Suppl.* 31:384-393.  
386
- 387 Smirnov, A., E. Tako, P. R. Ferket, and Z. Uni. 2006. Mucin gene expression  
388 and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo  
389 feeding of carbohydrates. *Poul. Sci.* 85:669-673.  
390
- 391 Sugino, H., T. Nitoda, and L. R. Juneja. 1997. General chemical composition of  
392 hen eggs. Pages 13-24 in *Hen Eggs: Their Basic And Applied Science.* T.  
393 Yamamoto, L. R Juneja, H. Hatta, M. Kim, eds CRC Press, New York.  
394
- 395 Sunny, N. E., and B. J. Bequette. 2010. Gluconeogenesis differs in developing  
396 chick embryos derived from small compared with typical size broiler breeder  
397 eggs. *J. Anim. Sci.* 88:912-921.  
398
- 399 Sunny, N. E., and B. J. Bequette. 2011. Glycerol is a major substrate for glucose,  
400 glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken  
401 embryos. *J. Anim. Sci.* 89:3945-3953.  
402

- 403 Tako, P., P. Ferket, Z. Uni, 2004. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and  
404  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on the development of chicken intestine. Poul.  
405 Sci. 83: 2023–2028.  
406
- 407 Tweed, S. 2005. The Hatch Window. Cobb-Vantress Technical Focus. 2th.  
408 Siloam, Springs. 2:8.  
409
- 410 Vieira, B.S., D. E. Faria Filho, K. A .A. Torres, D. M. Borges, P. S. Rosa, R. L  
411 Furlan. 2006 *In Ovo* Administration of Glutamine and Lysine on the  
412 Development of Intestinal Mucosa of Broiler Chickens on the First Week  
413 After Hatching. Ars Vet. 22: 242-247.  
414  
415

416 **Tabela 1.** pH e osmolaridade das soluções utilizadas.

Soluções	pH	Osmolaridade (mOsm)
Sem inoculação	-	-
Solução salina 0,9%	6,96	322
12,5 nmol/mL de glicerol em solução salina 0,9%	6,99	325
25,0 nmol/mL de glicerol em solução salina 0,9%	7,00	327
37,5 nmol/mL de glicerol em solução salina 0,9%	7,05	333
50,0 nmol/mL de glicerol em solução salina 0,9%	7,09	342

417

418 **Tabela 2.** Composição centesimal e níveis nutricionais calculados das rações  
 419 para frangos de corte na fase de 1 a 7 dias.

Ingrediente	Quantidade (%)
Milho	55,489
Farelo de soja	38,163
Óleo de soja	2,056
Fosfato bicálcico	1,908
Calcário calcítico	0,507
Sal comum	0,359
DL-Metionina (99%)	0,289
L-Lisina (78%)	0,114
L-Treonina (99%)	0,050
Salinomicina	0,050
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	0,050
Suplemento mineral <sup>2</sup>	0,050
Cloreto de colina (60%)	0,050
Avilamicina	0,005
<b>TOTAL</b>	<b>100,0</b>
Composição nutricional calculada	
Energia metabolizável, kcal/kg	2950
Proteína bruta, %	22,20
Cálcio, %	0,920
Fósforo disponível, %	0,470
Lisina digestível, %	1,310
Metionina + Cistina digestível, %	0,944
Treonina digestível, %	0,852
Sódio, %	0,220

420 1. Fornecimento por kg de produto: 12.500UI de vitamina A; 5.760.000UI de vitamina  
 421 D3; 150.000 mg de vitamina E; 4.000 mg de vitamina K3; 3.000 mg de vitamina B1;  
 422 9.000 mg de vitamina B2; 6.000 mg de vitamina B6; 40.000 mcg de vitamina B12; 300  
 423 mg de biotina; 2.000 mg de ácido fólico; 80.000 mg de ácido. nicotínico; 18.000 mg de  
 424 ácido. pantotênico; 100.000 mg de vitamina C; 300 mg de selênio.

425 2. Fornecimento por kg de produto: 160.000 mg de manganês; 100.000 mg de ferro;  
 426 100.000 mg de zinco; 20.000 mg de cobre; 2.000 mg de cobalto; 2.000 mg de iodo.

427 **Tabela 3.** Mortalidade embrionária e taxa de eclosão de ovos inoculados com  
428 soluções contendo diferentes concentrações de glicerol (n = 68).

Glicerol (nmol/mL)	Mortalidade após a inoculação (%)	Taxa de eclosão (%)*
0,0	44,1	55,9
12,5	41,2	58,8
25,0	48,5	51,5
37,5	32,3	67,7
50,0	48,5	51,5
Sem inoculação	-	72,1

429 \* Número de ovos eclodidos/número de ovos inoculados

430 **Tabela 3.** Efeito da inoculação de glicerol *in ovo* sobre o peso corporal e das  
 431 vísceras, morfometria do epitélio intestinal, glicemia e atividade da glicerol  
 432 quinase hepática (GK) de pintos de corte ao nascimento.

Variáveis	Sem inoculação	Glicerol (nmol/mL)					CV (%)
		0,0	12,5	25,0	37,5	50,0	
Peso a eclosão, g	50,1	50,0	50,1	50,9	50,8	48,9	6,09
Resíduo vitelínico, %	15,2	15,3 <sup>‡</sup>	18,4	16,9	17,0	16,7	16,15
Fígado, %	2,22	2,55	2,31	2,21	2,44	2,43	14,12
Baço, %	0,03	0,05 <sup>†</sup>	0,05	0,06	0,05	0,09*	25,53
Coração, %	0,72	0,73 <sup>†</sup>	0,71	0,77	0,71	0,99*	15,85
Pâncreas, %	0,08	0,09	0,09	0,09	0,1	0,1	16,52
Moela, %	4,50	4,42 <sup>‡</sup>	4,36	4,24	4,32	5,07	13,39
Intestino, %	2,94	3,18	2,87	2,84	2,9	3,14	9,39
Intestino Grosso, %	1,03	1,03	0,94	0,90	0,90	0,90	10,02
Intestino Delgado, %	2,02	2,15	1,83	1,85	1,87	1,97	9,78
Duodeno, %	0,53	0,59	0,57	0,58	0,59	0,6	10,21
Jejuno, %	0,64	0,57	0,52	0,61	0,61	0,6	12,18
Íleo, %	0,43	0,40	0,36	0,32	0,41	0,43	15,03
Peito, %	2,85	3,16	3,17	3,01	3,05	3,12	8,36
Altura de vilosidades							
Duodeno, µm	356	369 <sup>†b</sup>	375 <sup>b</sup>	390 <sup>*b</sup>	392 <sup>*b</sup>	420 <sup>*a</sup>	16,98
Jejuno, µm	215	227	224	221	223	225	17,26
Íleo, µm	161	165 <sup>†c</sup>	178 <sup>c</sup>	184 <sup>*b</sup>	190 <sup>*b</sup>	227 <sup>*a</sup>	13,06
Profundidade das criptas							
Duodeno, µm	53,9	55,4	63,5*	67,7*	58,0	72,1*	17,34
Jejuno, µm	42,8	43,5 <sup>†</sup>	43,3	52,1*	52,1*	65,9*	15,88
Íleo, µm	46,1	46,2 <sup>†c</sup>	51,0 <sup>c</sup>	57,2 <sup>*b</sup>	59,6 <sup>*b</sup>	67,9 <sup>*a</sup>	17,58
Glicemia, mg/dL	195	171 <sup>†*</sup>	184	181	178*	149*	7,80
Atividade GK (x10 <sup>-11</sup> )	5,38	7,67 <sup>‡</sup>	7,96*	9,27*	12,22*	13,93*	12,98

433 \* Diferem do controle (sem inoculação) pelo teste Dunnett (P<0,05).

434 † Regressão linear para níveis de glicerol (P<0,05)

435 ‡ Regressão quadrática para níveis de glicerol (P<0,05)

436 <sup>a,b,c</sup> Para níveis de glicerol inoculado, médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05)

437



438 **Tabela 4.** Equações de regressão para os níveis de glicerol inoculados em ovos  
 439 embrionados de frangos de corte. Variáveis obtidas após a eclosão.

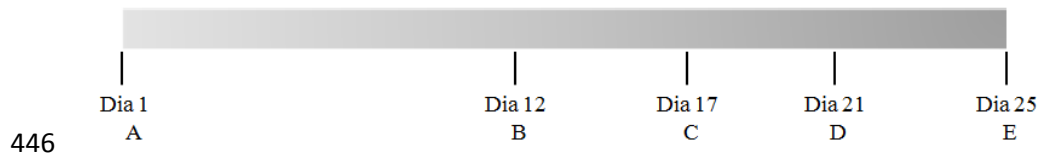
Variáveis	Equação	R <sup>2</sup>
Resíduo vitelínico, %	$y = -0,0054x^2 + 0,2276x + 15,62$	0,86
Baço, %	$y = 0,0006x + 0,047$	0,64
Coração, %	$y = 0,0042x + 0,697$	0,44
Moela, %	$y = -0,0008x^2 - 0,0314x + 4,50$	0,85
Altura de vilosidades		
Duodeno, $\mu\text{m}$	$y = 0,259x + 339,2$	0,136
Íleo, $\mu\text{m}$	$y = 0,925x + 164,1$	0,093
Profundidade das criptas		
Jejuno, $\mu\text{m}$	$y = 0,356x + 41,53$	0,139
Íleo, $\mu\text{m}$	$y = 0,400x + 46,16$	0,107
Glicemia, mg/dL	$y = -0,0382x^2 + 1,5064x + 170,60$	0,95
Atividade GK ( $\times 10^{-11}$ )	$y = 0,1341x + 6,86$	0,93

441 **Tabela 5.** Efeito da inoculação de glicerol *in ovo* sobre o peso corporal e das  
 442 vísceras, morfometria do epitélio intestinal, glicemia e atividade da glicerol  
 443 quinase hepática (GK) de pintos de corte aos 7 dias de idade.

Variáveis	Sem inoculação	Glicerol (nmol/mL)		CV (%)
		0,0	12,5	
Peso, g	104,3	81,5	98,7	18,8
Resíduo vitelínico, %	0,27	0,65	0,83 *	33,86
Fígado, %	3,54	3,5	3,81	12,41
Baço, %	0,08	0,07	0,08	21,86
Coração, %	0,96	0,98	1,03	16,68
Pâncreas, %	0,45	0,47	0,47	10,91
Moela, %	6,1	6,68	6,35	8,35
Intestino, %	7,9	8,42	8,03	12,27
Intestino Grosso, %	1,61	2,30 *	2,39 *	8,98
Intestino Delgado, %	5,68	6,64	5,73	13,01
Duodeno, %	1,82	2,05	1,93	13,29
Jejuno, %	2,64	3,07	2,55	15,58
Íleo, %	1,18	1,08	1,28	16,58
Peito, %	11,78	11,47	10	21,16
Coxa e Sobrecoxa, %	17,05	13,65 *	15,41	12,11
Altura de vilosidades				
Duodeno, µm	597	479 *	446*	20,72
Jejuno, µm	444	382*	360*	22,46
Íleo, µm	355	260*†	325	22,52
Profundidade das criptas				
Duodeno, µm	112,2	90,6*	101,3	28,08
Jejuno, µm	109,6	69,0*†	59,2*	24,89
Íleo, µm	77,8	73,1†	84,8	26,43
Glicemia, mg/dL	139,3	134,7†	84,80 *	7,88
Atividade GK (x 10 <sup>-11</sup> )	9,65	8,83	15,04	25,32

444 \* Diferem do controle (sem inoculação) pelo teste Dunnett (P<0,05).

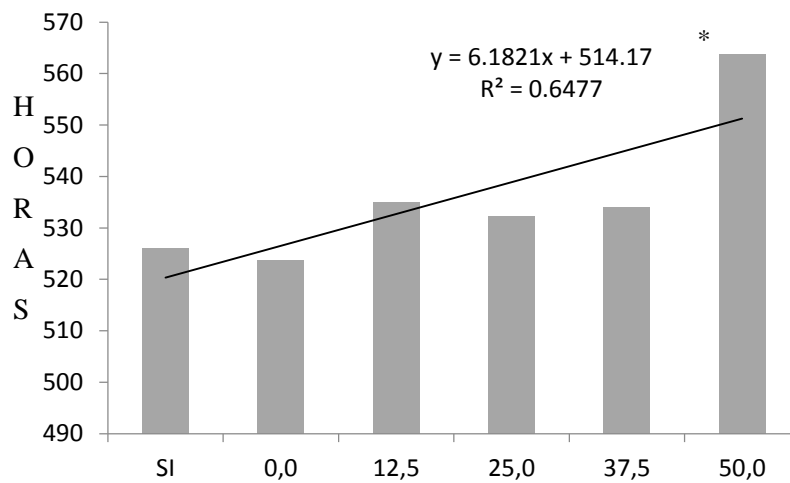
445 † Níveis de glicerol diferem pelo teste F (P<0,05).



446

447 **Figura 1.** Fluxograma do experimento. A – seleção, pré-aquecimento e incubação dos  
448 ovos; B – ovoscopia, retirada dos ovos inférteis e distribuição dos ovos férteis nos  
449 grupos experimentais; C – Inoculação *in ovo* das soluções; D e E – eclosão dos ovos,  
450 pesagem dos pintinhos, eutanásia e coleta das amostras; E – embriodiagnóstico.

451



452

453 **Figura 2.**Tempo (horas) para a eclosão dos pintos (média  $\pm$  DP) provenientes de ovos  
454 inoculados ou não com soluções contendo diferentes níveis de glicerol.

455 \* Difere do grupo controle (sem inoculação – SI) pelo teste Dunnett.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Análise de variância para peso de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	19,51	4,88	0,52	0,72
Adicional	1	1,03	1,03	0,11	0,74
Erro	110	1029,21	9,36		

**Anexo 2.** Análise de variância para glicemia de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	4616,78	1154,19	5,94	0,0006
Adicional	1	3646,50	3646,50	18,77	0,0001
Erro	46	8935,95	194,26		

**Anexo 3.** Análise de variância para glicerol quinase de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	4,08	1,02	6,90	0,00035
Adicional	1	4,28	4,28	28,92	0,00001
Erro	34	5,03	0,15		

**Anexo 4.** Análise de variância para peso do resíduo vitelínico de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	56,65	14,16	1,98	0,11
Adicional	1	25,66	25,66	3,59	0,06
Erro	52	372,08	7,16		

**Anexo 5.** Análise de variância para peso da moela de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	2,56	0,64	1,83	0,14
Adicional	1	0,06	0,06	0,18	0,67
Erro	55	19,28	0,35		

**Anexo 6.** Análise de variância para peso do fígado de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,59	0,15	1,34	0,27
Adicional	1	0,31	0,31	2,77	0,10
Erro	49	5,43	0,11		

**Anexo 7.** Análise de variância para peso do baço de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,03	0,01	1,85	0,13
Adicional	1	0,01	0,01	4,22	0,04
Erro	54	0,19	0,00		

**Anexo 8.** Análise de variância para peso do pâncreas de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,006	0,00	0,62	0,65
Adicional	1	0,006	0,01	2,48	0,12
Erro	53	1,29	0,00		

**Anexo 9.** Análise de variância para peso do coração de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,11	0,03	6,01	0,0005
Adicional	1	0,005	0,01	1,26	0,27
Erro	48	0,22	0,00		

**Anexo 10.** Análise de variância para peso do peito de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,18	0,04	0,17	0,95
Adicional	1	0,59	0,59	2,26	0,14
Erro	49	12,79	0,26		

**Anexo 11.** Análise de variância para peso do intestino de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,08	0,02	0,75	0,56
Adicional	1	0,001	0,00	0,06	0,81
Erro	49	1,27	0,03		

**Anexo 12.** Análise de variância para peso do intestino grosso de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,03	0,01	0,91	0,47
Adicional	1	0,01	0,02	1,58	0,21
Erro	48	0,46	0,01		

**Anexo 13.** Análise de variância para peso do duodeno de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,002	0,00	0,08	0,99
Adicional	1	0,01	0,01	2,22	0,14
Erro	51	0,30	0,01		

**Anexo 14.** Análise de variância para peso do jejuno de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,03	0,008	0,90	0,47
Adicional	1	0,01	0,011	1,32	0,26
Erro	52	0,45	0,009		

**Anexo 15.** Análise de variância para peso do íleo de pintos ao nascimento.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,04	0,009	1,06	0,38
Adicional	1	0,1	0,01	1,47	0,23
Erro	55	0,47	0,009		

**Anexo 16.** Análise de variância para peso do intestino delgado de pintos ao nascimento

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	4	0,09	0,02	1,25	0,30
Adicional	1	0,006	0,00	0,35	0,56
Erro	48	0,89	0,2		

**Anexo 17.** Análise de variância para peso de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	1,83	1,83	2,28	0,16
Adicional	1	1,32	1,32	1,64	0,23
Erro	14	9,83	0,80		

**Anexo 18.** Análise de variância para glicemia de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	5533,73	5533,73	62,03	0,00
Adicional	1	3776,05	3776,05	42,33	0,00
Erro	12	1070,48	89,21		

**Anexo 19.** Análise de variância para atividade da glicerol quinase de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	2,00	2,00	3,01	0,11
Adicional	1	0,35	0,35	0,53	0,48
Erro	10	6,65	0,66		



**Anexo 20.** Análise de variância para peso do resíduo vitelínico de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,01	0,01	0,27	0,62
Adicional	1	0,47	0,47	8,78	0,02
Erro	9	0,48	0,05		

**Anexo 21.** Análise de variância para peso da moela de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,26	0,26	0,93	0,35
Adicional	1	0,58	0,58	2,06	0,18
Erro	12	3,40	0,28		

**Anexo 22.** Análise de variância para peso do coração de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,008	0,008	0,30	0,59
Adicional	1	0,008	0,009	0,31	0,59
Erro	14	0,38	0,03		

**Anexo 23.** Análise de variância para peso do fígado de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,22	0,22	1,10	0,31
Adicional	1	0,08	0,08	0,42	0,53
Erro	13	2,64	0,20		

**Anexo 24.** Análise de variância para peso do baço de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,00	0,00	0,08	0,79
Adicional	1	0,00	0,00	0,00	1,00
Erro	13	0,00	0,00		

**Anexo 25.** Análise de variância para peso do pâncreas de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,00	0,00	0,00	0,94
Adicional	1	0,00	0,00	0,34	0,57
Erro	10	0,03	0,00		

**Anexo 26.** Análise de variância para peso do peito de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	1,56	1,56	0,28	0,61
Adicional	1	3,35	3,35	0,61	0,45
Erro	12	66,37	5,53		

**Anexo 27.** Análise de variância para peso do intestino de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,41	0,41	0,42	0,53
Adicional	1	0,37	0,37	0,37	0,55
Erro	14	13,82	0,99		

**Anexo 28.** Análise de variância para peso do intestino grosso de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,05	0,05	1,52	0,25
Adicional	1	1,67	1,67	51,85	0,00
Erro	10	0,32	0,03		

**Anexo 29.** Análise de variância para peso do duodeno de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,04	0,04	0,58	0,46
Adicional	1	0,08	0,08	1,27	0,28
Erro	12	0,78	0,06		

**Anexo 30.** Análise de variância para peso do jejuno de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,65	0,65	3,63	0,08
Adicional	1	0,04	0,04	0,25	0,63
Erro	12	2,15	0,18		

**Anexo 31.** Análise de variância para peso do fêo de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	0,00	0,00	0,00	0,95
Adicional	1	0,02	0,02	0,46	0,51
Erro	11	0,43	0,04		

**Anexo 32.** Análise de variância para peso do intestino delgado de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	1,98	1,97	3,29	0,09
Adicional	1	0,56	0,560,60	0,93	0,35
Erro	14	7,21			

**Anexo 33.** Análise de variância para peso da coxa+sobrecoxa de pintos aos 7 dias.

<i>FV</i>	<i>G.L.</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Glicerol	1	7,43	7,43	2,11	0,17
Adicional	1	18,22	18,22	5,18	0,04
Erro	12	42,21	3,52		