

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA IDADE DE MATRIZ E DA EXPOSIÇÃO
GRADUAL AO CO₂ NA PRIMEIRA FASE DE INCUBAÇÃO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in ovo* E DESEMPENHO DE
FRANGOS DE CORTE**

Wedson Carlos Lima Nogueira

Engenheiro Agrônomo

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA IDADE DE MATRIZ E DA EXPOSIÇÃO
GRADUAL DE CO₂ NA PRIMEIRA FASE DE INCUBAÇÃO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in ovo* E DESEMPENHO DE
FRANGOS DE CORTE**

Wedson Carlos Lima Nogueira

Orientador: Prof. Dr. Renato Luis Furlan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

2013

Nogueira, Wedson Carlos Lima
N778e Efeito da idade de matriz e da exposição gradual ao CO_2 na primeira fase de incubação sobre o desenvolvimento *in ovo* e desempenho de frangos de corte / Wedson Carlos Lima Nogueira. – Jaboticabal, 2013
v, 75 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Renato Luis Furlan

Banca examinadora: Lizandra Amoroso, Silvana Martinez Baraldi Artoni, Daniel Emygdiode Faria Filho, Jose Fernando Machado Menten

Bibliografia

1. CO_2 . 2. Embrião. 3. Hipercapnia. 4. Idade de matriz. 5. Membrana corioalantóide. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.5:636.082.47



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DA IDADE DA MATRIZ E DA EXPOSIÇÃO GRADUAL AO CO₂ NA PRIMEIRA FASE DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in ovo* E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

AUTOR: WEDSON CARLOS LIMA NOGUEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO LUIS FURLAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RENATO LUIS FURLAN

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. DANIEL EMYGDIO DE FARIA FILHO

Universidade Federal de Minas Gerais / Montes Claros/MG

Prof. Dr. JOSE FERNANDO MACHADO MENTEN

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 07 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Wedson Carlos Lima Nogueira - filho de Roberto Rodrigues Nogueira e Maria da Glória Lima Nogueira, nasceu em Rio Novo - MG, em 10 de Outubro de 1979. Concluiu o curso técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba. Em março de 2002, ingressou no curso de Engenharia Agrônoma da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foi bolsista de extensão durante três anos e seis meses, exercendo atividades de pesquisa, ensino e extensão. Ao longo da graduação desenvolveu pesquisas na área de produção vegetal sob orientação do Prof. Dr. Cândido Alves da Costa. Graduou-se em Agronomia em Fevereiro de 2007. Em março de 2007, iniciou o Curso de Mestrado em Ciências Agrárias na Universidade do Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Emygdio de Faria Filho, concluindo o mesmo em Fevereiro de 2009. Em março de 2009, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Renato Luis Furlan. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE/CAPES, desenvolvendo pesquisas junto ao Prestage Department of Poultry Science – North Carolina State University, EUA, de 20 de Junho a 04 de Dezembro de 2012, sob orientação do Prof. Dr. Edgar O. Oviedo-Rondón.

DEDICO

Aos meus pais Roberto Rodrigues Nogueira e Maria da Glória Lima Nogueira, onde o meu ninho sempre está cheio de amor e compreensão.

Aos meus irmãos Cláudio Moisés Lima Nogueira e José Roberto Lima Nogueira e aos meus sobrinhos Alerrando, Bernardo e Dhyullia.

OFEREÇO

A minha esposa Cleusa Lopes pelo
amor incondicional na minha
caminhada do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus antepassados, minha razão de existir.

A Deus, pela fé, saúde e coragem, para vencer os desafios.

À minha família por compreender e ajudar na realização de um sonho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, por se transformar em minha casa e ambiente de realizações.

Aos colegas de pós-graduação em especial (Raquel Lunedo, Fernando Augusto, Fabrício Hada, Daniel Mendes, Paula Toro, Miguel Frederico, Lílian Arantes, Paulo Carneiro, Lívia Pergoraro, Carlos Stefenson, João Paulo Ramos, Felipe kroetz e Leandro Galzerano) e aos demais colegas pelos momentos de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Marcos Macari, pelas orientações e apoio na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal e do Setor de Avicultura, em especial ao Euclides Secatto, Orandir Mateus, Damares, Dr. Robson, Izildo e Vicente pela amizade e apoio nas análises e momentos de reflexão.

À Prof^a Luciane Helena, pelo apoio e orientação nos projetos.

Ao prof. Dr. Edgar O. Oviedo-Rondón, pela oportunidade de vivenciar a experiência internacional junto de sua equipe na condução de pesquisas e enriquecimento profissional e cultural.

Ao amigo Daniel Gama, pelo grande apoio e pelas sábias palavras “never give up”, e incentivo nesta grande vitória.

À CASP pela assistência técnica das incubadoras e capacitação profissional.

À PERDIGÃO pela doação dos ovos férteis e apoio técnico.

Ao CNPQ, pela bolsa de estudo durante o doutorado em favor da valorização dos recursos humanos.

À CAPES, pela bolsa de doutorado no exterior – PDSE, por garantir novas experiências para o avanço da ciência.

À banca de qualificação: Profa. Dra Silvana Baraldi, Profa. Dra Isabel Boleli, Prof. Dr. Marcos Macari e Prof. Dr. Newton La Scala Jr., pelas sugestões e apontamentos críticos.

I would like to thank Dr. Oviedo's work team from the Prestage Department of Poultry Science. Especially, Wilmer Pacheco, Manuel Da Costa, José Guilherme, Prof. Dr. Carlos Bôa-Viagem, Profa. Dra. Lying Wu.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho e foram importantes para o meu aprendizado.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Uso do CO ₂ na incubação	2
2.2. Idade da Matriz	5
3. OBJETIVO GERAL.....	6
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA IDADE DA MATRIZ E DA CONCENTRAÇÃO AO CO₂ SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE FRANGOS DE CORTE	10
RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4. CONCLUSÃO.....	32
5. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 3 – INFLUENCIA DA IDADE DA MATRIZ E DA CONCENTRAÇÃO AO CO₂ NO DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E ÍNDICE CARDÍACO DE FRANGOS DE CORTE	37
RESUMO	37
ABSTRACT.....	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44

4. CONCLUSÃO.....	56
5. REFERÊNCIAS.....	56

CAPÍTULO 4 - INFLUENCIA DO CO₂ DURANTE OS PRIMEIROS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO NA ANGIOGÊNSE DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE E NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE FRANGO DE CORTE	59
RESUMO	59
ABSTRACT.....	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4. CONCLUSÃO.....	72
5. REFERÊNCIAS.....	73



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010665/11 do trabalho de pesquisa intitulado "Efeitos da concentração de CO₂ e da idade da matriz no desenvolvimento embrionário de frangos de corte", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Renato Luis Furlan está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

EFEITO DA IDADE DE MATRIZ E DA EXPOSIÇÃO GRADUAL AO CO₂ NA PRIMEIRA FASE DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – O fornecimento de CO₂ durante as primeiras 240 horas de incubação melhora os resultados de incubação e pós-eclosão, porém o seu uso em diferentes idades de matriz é pouco compreendido. Portanto, foram realizados três experimentos com os seguintes objetivos: O primeiro objetivo foi avaliar o efeito de duas idades de matriz (36 e 55 semanas) e três concentrações de CO₂ (controle, 1,0% e 1,4%) durante as primeiras 240 horas de incubação sobre o desenvolvimento embrionário de frangos de corte. O segundo objetivo foi avaliar o desempenho, rendimento de órgãos, morfologia intestinal, rendimento de carcaça e índice cardíaco de frangos de corte oriundos de duas idades de matriz e três concentrações de CO₂. Finalmente, o objetivo do terceiro estudo foi avaliar os efeitos da incubação com CO₂ (aumento gradual até 1,5%) durante 10 dias (0 - 240 horas de incubação) na vascularização da membrana corioalantóide (CAM), nas variáveis sanguíneas do embrião e pós-eclosão e nos resultados de incubação de frangos de corte. Os resultados mostraram que a exposição ao CO₂ promoveu alterações no desenvolvimento embrionário e na qualidade pós-eclosão. A idade de matriz deve ser considerada no processo de incubação com CO₂. A idade de matriz e a exposição ao CO₂ nas primeiras 240h de incubação exerceram influencia no desempenho pós-eclosão. A exposição gradual de 1,5% de CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação aumenta a vascularização da CAM, altera as variáveis sanguíneas, influencia negativamente o desenvolvimento embrionário e o metabolismo pós-eclosão. Em conclusão, a interação idade de matriz e concentração de até 1,4% de CO₂, na primeira fase de incubação afeta o metabolismo embrionário, principalmente em matriz com idade de 55 semanas. A exposição a 1,5% CO₂ aumenta a vascularização da CAM, mas afeta negativamente o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: CO₂, embrião, hipercapnia, idade de matriz, membrana corioalantóide

EFFECT OF BREEDER AGE AND EXPOSURE TO INCREASING GRADUAL CO₂ CONCENTRACION DURING THE FIRST PHASE OF INCUBATION ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT, AND PERFORMANCE OF BROILER

ABSTRACT – Supplementing CO₂ during the first 240 hours of incubation has been proposed for improving incubation and post hatch performance, but its use on eggs coming from breeders of different ages needs to be better understood. Therefore, three experiments were carried out with the following objectives: The first objective was to evaluate the effects of two breeder ages (36 and 55 weeks) and three concentrations of CO₂ (control, 1,0% and 1,4%) during the first 240 hours of incubation on the embryonic development of broilers. The second objective was to evaluate the performance, organ performance, intestinal morphology, carcass yield, and cardiac index of broilers from two breeder ages and three CO₂ concentrations. Finally, the objective of the third experiment was to evaluate the effects of incubation with increasing CO₂ concentration up to 1,5% for 240 hours of incubation on the vascularization of the chorioallantoic membrane (CAM) in embryogenic and post-hatch blood parameters, and the results of chickens at post hatch. The results showed that exposure to CO₂ promoted changes in embryonic development and post-hatching quality. The old breeder must be considered in the process of incubation with CO₂. The breeder ages and exposure to CO₂ in the first 240h incubation exert influence in post-hatching performance. The gradual exposure of 1,5% of CO₂ in the first incubation phase (240 hours) increased vascularization of the CAM, altered blood parameters, adversely influenced embryonic development and metabolism post-hatching. In conclusion, the interaction of breeder age and CO₂ concentration up to 1,4% in the first stage of incubation affects the embryonic metabolism, especially in a old breeder at 55 weeks of age. The exposure to 1,5% CO₂ increases vascularization of CAM and negatively affects embryonic development.

Keywords: CO₂, embryo, hypercapnia, breeder age, chorioallantoic membrane

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, alguns autores demonstraram que o aumento gradual de níveis de CO₂ até o 10º dia (0 a 240 horas) de desenvolvimento aumenta o peso do embrião, estimula a eclosão precoce (BRUGGEMAN et al., 2007), aumenta a eclodibilidade (DE SMIT et al., 2006, 2008; KROETZ NETO, 2010), diminui a mortalidade embrionária e influencia positivamente no desempenho dos frangos (KROETZ NETO, 2010). Porém, estes estudos na sua maioria ainda não são conclusivos sobre a melhor concentração de CO₂ e a fase embrionária para se assegurar do seu uso prático nas condições de campo. Além disso, a idade da matriz deve ser considerada nesse processo, pois influencia diretamente o peso do embrião e seu desenvolvimento durante a incubação (SHANAWANY, 1984). A espessura da casca diminui com o avançar da idade da ave (NORTH e BELL, 1990; LOURENÇO DA SILVA, 1994; WILSON, 1997). Igualmente, o metabolismo do embrião durante o processo de incubação varia entre aves de diferentes idades (CHRISTENSEN et al., 1995; O'DEA et al., 2004; HAMIDU et al., 2007). De acordo com RAJU et al. (1997), existe uma correlação positiva entre peso do ovo, peso do pintainho ao nascer e desenvolvimento pós-eclosão.

Portanto, são necessários mais estudos para elucidar os efeitos da combinação do CO₂ e da idade da matriz nos resultados de incubação e na fase pós-eclosão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Uso do CO₂ durante a incubação

Desde o início da avicultura industrial, as variáveis físicas da incubação continuaram as mesmas, apresentando algumas alterações na forma de monitorar a viragem, ventilação, umidade e temperatura e a relevância de cada uma dessas variáveis. Porém, o êxito do processo de incubação envolve outros fatores que também interferem de forma significativa no desenvolvimento do embrião *in ovo*. Dentre eles estão a idade da matriz e a concentração de CO₂ na incubadora. Recentemente, a utilização do CO₂ foi adicionada ao rol de necessidades do embrião e ainda é motivo de controvérsias entre pesquisadores e fabricantes de equipamentos (CALIL, 2007). Verifica-se a necessidade de mais estudos para apontar os efeitos da exposição elevada e gradual de CO₂ sobre o desenvolvimento do embrião e no desempenho pós-eclosão.

É sabido que tanto o O₂ quanto o CO₂ são essenciais para o adequado desenvolvimento embrionário. Usualmente, o controle desses gases é mantido para que no ambiente de incubação situem-se em aproximadamente 21% O₂ e 0,5% CO₂. Na prática, algumas empresas têm sugerido níveis mais altos de CO₂ nos primeiros dias da incubação artificial de ovos de aves domésticas, superiores a 0,5%, considerados padrão. Pois, tem se percebido com esse manejo benefícios no desenvolvimento do embrião, na eclodibilidade e nas primeiras semanas pós-eclosão (DE SMITH et al., 2006; TONA et al., 2006; KROETZ NETO, 2010). Sendo dependente de um ajuste de tempo de exposição e da concentração.

Durante a incubação, 21 dias, o ovo de galinha de 60 g capta aproximadamente 6 litros de O₂, elimina 4,5 L de CO₂ e 11 L de vapor de água. Devido à perda de água nesse período, o ovo pesará aproximadamente 51 g no final da incubação (LA SCALA Jr., 2003). Portanto, o ambiente da incubadora deve permitir que neste período, tais condições como temperatura do embrião, perda de umidade e ventilação se aproximem do ideal para que as trocas gasosas ocorram.

O controle do CO₂ tem correlação direta com a fisiologia embrionária, influenciando o pH do albúmen do ovo. No momento da postura o pH do albúmen e gema estão próximos ao fisiológico (6,5) e com o passar do tempo aumentam para níveis próximos de 9 no albúmen (LAPÃO et al., 1999) e 6,8 na gema (BAKST e HOLM, 2003), considerados ótimos para o adequado desenvolvimento embrionário. A alcalinidade do albúmen é responsável por facilitar a circulação de nutrientes para o blastoderme e a difusão de gases (MEURER e BAUMANN, 1988; MEIJERHOF, 1994; BRAKE, 1996). De acordo com TONA et al. (2006), a utilização de níveis relativamente altos de CO₂ nos períodos iniciais de incubação é capaz de estimular o desenvolvimento do sistema circulatório durante a sua fase de diferenciação e formação (24 h a 96 h de desenvolvimento embrionário). O que pode explicar a melhoria na qualidade do neonato alcançada com a adoção dessa técnica. Além disso, para a redução da ocorrência de doenças metabólicas, como a ascite, tem se sugerido níveis mais altos de dióxido de carbono durante a incubação por melhorar o desenvolvimento do sistema circulatório, preparando desde a vida de embrião para os desafios durante a incubação e na vida pós-eclosão.

Por muito tempo, pensava-se que níveis superiores a 1% de CO₂ tinham efeito deletério em embriões de aves (OWEN, 1991), prejudicando assim a eclodibilidade dos ovos. No entanto, em outros estudos, foi verificado que dependendo do tempo de exposição e a idade do embrião, as respostas eram variadas. Estudos de TAYLOR et al. (1956) relataram que níveis de CO₂ até 1% durante as primeiras 96 horas de incubação não foi considerada perigosa para o desenvolvimento embrionário. No entanto, quando os ovos foram incubados e expostos ao nível elevado de 5% de CO₂ entre o 9º e o 12º dia, ocorreu redução na eclodibilidade (TAYLOR e KREUTZIGER, 1966). HOGG (1997) observou aumento de 2% na eclodibilidade quando os embriões foram expostos a concentração de 1,5% de CO₂ até o 10º dia de incubação. Em estudo mais recente, DE SMIT et al. (2006) demonstraram que níveis de 1,5% de CO₂ até o 10º dia melhoraram o crescimento do embrião, estimularam a eclosão precoce e aumentaram a eclodibilidade. GILDERSLEEVE E BOESCHEN (1983) encontraram menor mortalidade embrionária, menor mal-posicionamento e alta eclodibilidade de ovos de peruas expostos ao nível de 0,3% de CO₂ nos dez

primeiros dias de incubação. Entretanto, quando expuseram os ovos dessas aves ao CO₂ nos primeiros cinco dias de incubação, verificaram diminuição na eclodibilidade.

Efeitos na eclodibilidade podem ser observados mesmo quando a concentração de CO₂ está abaixo de 0,5% ou acima de 2%, com resultados negativos na eclosão (DECUYPERE et al., 2003). DE SMIT et al., (2008) estudaram o efeito da ausência de ventilação nos primeiros dias de incubação sobre o desenvolvimento embrionário, utilizando níveis de até 0,7% de CO₂, em duas linhagens de frangos com diferente susceptibilidade à ascite. Os autores verificaram que a não ventilação estimulou o desenvolvimento embrionário e resultou em embriões com maior peso corporal e eclosão precoce. Mostraram ainda, que o grupo com susceptibilidade à ascite obteve eclodibilidade superior a 10%.

De acordo com apresentado até este momento, percebe-se que a técnica da utilização do CO₂ nos primeiros dias de incubação tem apresentado resultados expressivos do ponto de vista técnico. Mostra ainda que, com o passar dos anos os embriões têm adquirido maior tolerância, o que pode ser verificado com os aumentos consideráveis das concentrações de CO₂ em momentos distintos da incubação. Os ovos respiram por um processo espontâneo, devido à diferença de concentração das moléculas, por meio de milhares de poros microscópicos presentes em sua casca, capturando O₂ e liberando CO₂ pela difusão molecular, sendo influenciado intensamente pela geometria dos poros (comprimento e área), bem como os números de poros na casca que varia de acordo com as espécies de aves (LA SCALA Jr., 2003).

A discordância entre os autores sobre a melhor concentração e idade do embrião ao CO₂ precisa ser esclarecida. Até o momento enfocamos uma discussão entorno da utilização do gás na primeira fase de incubação. Entretanto, na segunda fase da incubação os estudos são mais desafiadores quanto às concentrações em que os embriões são expostos. EVERAERT et al., (2007) expuseram embriões de frangos a concentrações elevadas de CO₂ durante a segunda fase de incubação, iniciando com 2% no 11^o dia, alcançando 4% no 12^o dia e mantendo essa concentração até o 18^o dia. Avaliaram os parâmetros de incubação, tempo de bicagem interna, externa e eclosão. Verificaram que o

crescimento do embrião não foi reduzido e não houve redução na eclodibilidade do grupo exposto ao gás, demonstrando, a hipótese que os embriões podem tolerar altas concentrações de CO₂ na segunda fase de incubação. Esses mesmos autores, criando as aves até o 7º dia de vida e avaliando o crescimento relativo dos pintainhos não tiveram diferenças entre os grupos tratados ou não tratados com o gás na incubação. Ainda, avaliaram os níveis hormonais e perceberam maior concentração de corticosterona e tiroxina no grupo de pintos submetidos ao CO₂ aos sete dias de idade. Sugeriram maiores investigações para a tolerância aos altos níveis de CO₂ nesta fase.

2.2. Idade da Matriz

A a idade da matriz exerce grande influência no tamanho do ovo e conseqüentemente no tamanho do embrião, originando um pintainho maior e de melhor qualidade. Muitos estudos demonstram que as matrizes mais velhas produzem ovos mais pesados (SOONCHARENYING, 1989; NOVO et al., 1997; SUAREZ et al., 1997), a gema maior e pequeno incremento do albúmen (BURNHAM et al., 2001). Uma das consequências do aumento do tamanho do ovo com o avanço da idade da matriz é a diminuição da espessura da casca (NORTH e BELL, 1990; LOURENÇO DA SILVA, 1994). É esperado que matrizes pesadas, ao atingir 60-64 semanas, um aumento de 45-50% do peso de um ovo produzido com peso inicial de 52 g provocando inabilidade da ave em aumentar a deposição de cálcio na casca do ovo de forma a compensar esse ganho de peso (LOURENÇO DA SILVA, 1994).

De acordo com SHANAWANY (1984), a idade da matriz exerce amplo efeito sobre o peso do embrião e seu desenvolvimento durante a incubação. Em seu experimento, matrizes com idade mais avançada produziram ovos maiores que, por sua vez, resultaram em embriões mais pesados. Quando comparados ovos de mesmo tamanho, mas provenientes de matrizes com diferentes idades, o autor ainda observou desenvolvimento mais rápido e eclosão precoce naqueles embriões provenientes de matrizes mais velhas. Entretanto, LIMA et al., (2000) trabalhando com ovos provenientes de matrizes de 27, 40 e 59 semanas de idade e com peso médio variando de 55 a 70 g, afirmaram que ovos de menor peso,

independente da idade da matriz, apresentaram taxas de eclosão maiores com períodos mais curtos de incubação.

RAJU et al., (1997) incubando ovos de diferentes faixas de peso, verificaram que ovos de menor peso apresentaram maior eclodibilidade e menor peso do pintainho ao nascer. Os pintainhos provenientes de ovos mais pesados resultaram em aves também mais pesadas com 6 semanas de idade, indicando correlação positiva entre peso do ovo, peso do pintainho ao nascer e desenvolvimento pós-eclosão. No entanto, PEEBLES et al., (2001), ao compararem o desenvolvimento de embriões provenientes de matrizes com 27 e 36 semanas de idade encontraram menor taxa relativa de acúmulo de matéria-seca nos ovos das matrizes mais velhas. Esse resultado foi associado à diminuição da quantidade de água no embrião e da taxa de absorção da gema.

A importância da casca do ovo está associada ao fato de que, além de fornecer cálcio para o embrião em desenvolvimento, serve como uma barreira natural do embrião contra danos físicos e contaminação ambiental, regulando assim as trocas gasosas, calóricas e a perda de água pelo embrião. A redução da espessura da casca é associada com a desidratação do embrião devido ao aumento de porosidade da casca (WILSON, 1997).

3. OBJETIVO GERAL

A presente pesquisa foi desenvolvida para verificar se o aumento gradual CO₂ nos primeiros 10 dias (0 - 240 horas) de incubação é capaz de influenciar o desenvolvimento embrionário e o desempenho de 1 a 42 dias de idade de frangos de corte oriundos de duas idades de matriz.

4. REFERÊNCIAS

BAKST, M. R.; HOLM, L. Impact of egg storage on carbonic anhydrase activity during early embryogenesis in the turkey. **Poultry Science**, 82: 1193-1197, 2003.

BRAKE, J. T. Optimization of egg handling and storage. **World Poultry Missed**, 12(9):33 – 39. 1996.

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

BRUGGEMAN, V.; WITTERS, A.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; EVERAERT, N.; KAMERS, B. Acid-base balance in chicken embryos (*Gallus domesticus*) incubated under high CO₂ concentrations during the first 10 days of incubation. **Respiratory physiology and Neurobiology**, 2007; 159:147-154.

CALIL, T. A. C. Princípios básicos da incubação. In: Anais simpósio sobre incubação. **Conferência Apinco**, 2007. p. 19-47.

CHRISTENSEN, V.L.; DONALDSON, W.E.; NESTOR, K.E. Incubation temperature effects on metabolism and survival of turkey embryos. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 9., 1994, Glasgow. *Proceedings...* Glasgow: **World's Poultry Science Association**, 1994. v.2, p.399-402.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; TONA, J. K.; DEBONNE, M.; ONAGBESAN, O.; ARCKENS, L.; DE BAERDEMAKER, J.; DECUYPERE, E. Embryonic developmental plasticity of the chick: increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 145 (2006): 166-175.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; DEBONNE, M.; TONA, J. K.; KAMERS, B.; EVERAERT, N.; WITTERS, A.; ONAGBESAN, O.; ARCKENS, L.; DE BAERDEMAEKER, J.; DECUYPERE, E. The effect of nonventilation during early incubation on the embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. **Poultry science**, 87: 551-1560. 2008.

DECUYPERE, E.; MALHEIROS, D. R.; MORAES, V. M. B.; BRUGGEMANN, V. Fisiologia do embrião. In: **Manejo da Incubação**. FACTA, p. 65-94, 2003.

EVERAERT, N.; KAMERS, B.; WITTERS, A.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. 2007. Effect of Four Percent Carbon Dioxide During the Second Half of Incubation on Embryonic Development, Hatching Parameters, and Posthatch Growth. **Poultry Science**, 86:1372–1379.

GILDERSLEEVE, R. P., BOESCHEN, D. P. The effects of incubator carbon dioxide level on turkey hatchability. **Poultry Science**, 62:779-7784. 1983.

- HAMIDU, J. A.; FASENKO, G. M.; FEDDES, J. J. R.; O'DEA, E. E.; OUELLETTE, C. A.; WINELAND, M. J.; CHRISTENSEN, V. L. The effect of broiler breeder genetic strain and parent flock age on eggshell conductance and embryonic metabolism. **Poultry Science**, 86:2420–2432. 2007.
- HOGG, A. 1997. Single stage incubation trials. **Poultry and Avian Biology Review**, 8:168.
- KROETZ NETO, F. L. Eclodibilidade, qualidade dos neonatos e desempenho pós natal de frangos de corte originados de ovos embrionados submetidos a altos teores de CO₂ no período inicial de incubação. 103 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, Faculdade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2010.
- LAPÃO, C.; GAMA, L. T.; CHAVEIRO SOARES, M. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. **Poultry Science**, 78: 640-645, 1999.
- LIMA, A. R., VIEIRA, S. L., CORTELINE, J. SNIZEK Jr., P. N. Eclodibilidade de ovos oriundos de matrizes com extremos em idade e de peso distintos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. (Suplemento) 2:1. 2000.
- LOURENÇO DA SILVA, P. R. Influência do manejo na qualidade da casca dos ovos de reprodutoras pesadas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, 1994. **Anais...** Campinas:FACTA. 1994, 23-34.
- MEIJERHOF, R. The storage of hatchings eggs: First Int. Incubation Conference. p. 2 - 5. The Netherlands, 1994.
- MEURER, H. J.; BAUMAN, R. Oxygen pressure in intra and extraembryonic blood vessels of early chick embryo. **Respiration Physiology**, 71:331 – 342, 1988.
- NOVO, R. P., GAMA, L. T., CHAVEIRO SOARES, M. Effects of oviposition time, hen age, and extra dietary calcium on egg characteristics and hatchability. **Journal of Applied Poultry Research**, 6:335-343. 1997.
- NORTH, M. O., BELL, D. D. Commercial chicken production manual. Chapman eHall: New York, p. 103-134. 1990.
- O'DEA, E. E.; FASENKO, G. M.; FEDDES, J. J. R.; ROBINSON, F. E.; SEGURA, J. C.; OUELLETTE, C. A.; VAN MIDDELKOOP, J. H. Investigating the eggshell conductance and embryonic metabolism of modern and unselected domestic avian genetic strains at two flock ages. **Poultry Science**, 83:2059–2070, 2004.
- OWEN, J. Principles and problems of incubator design. In: **Avian Incubation**. S. G. Tullet, ed. Butter-worth-Heinemann, London, UK. p. 205-224, 1991.
- PEEBLES, E. D., DOYLE, S. M., ZUMWALT, P. D., GERARD, P. D., LATOUR, M. A., BOYLE, A. R., SMITH, T. W. Breeder age influences embryogenesis in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, 80:272-277. 2001.

RAJU, M. V. L. N., CHAWAK, M. M., PRAHARAJ, N. K., RAO, S. V. R., MISHRA, S. K. Interrelationships among egg weight, hatchability, chick weight, post-hatch performance and rearing method in broiler breeders. **Indian Journal of Animal Sciences**, 67(1):48-50. 1997.

SAS INSTITUTE. SAS[®] user's guide: statistics. Cary: SAS Institute INC., Cary, 2002.

SCALA JR., N. La. Aspectos físicos da incubação. In: **Manejo da Incubação**. FACTA, p. 97-124, 2003.

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

SOONCHARENYING, S., EDWARDS, H. M. Modelling the relationships of egg weight, specific gravity, shell calcium, and shell thickness. **British Poultry Science**, 30:623-631, 1989.

SUAREZ, M. E., WILSON, H. R., MATHER, F. B., WILCOX, C. J., MCPHERSON, B. N. Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. **Poultry Science**, 76:1029-1036. 1997.

TAYLOR, L. W.; SJODIN, R. A.; GUNNS, C. A. 1956. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability 1. Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the first four days of incubation upon hatchability. **Poultry Science**, 35:1206–1215.

TAYLOR, L. W.; G. O. KREUTZIGER. 1966. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability 3. Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the period of the ninth through the twelfth days of incubation. **Poultry Science**, 45:867–884.

TONA, K., ONAGBESAN, O., BRUGGEMAN, V., DE SMIT, L., FIGUEIREDO, D., DECUYPERE, E. Non-ventilation during early incubation in combination with dexamethasone administration during late incubation 1. Effects on physiological hormone levels, incubation duration and hatching events. **Domestic Animal Endocrinol**, 2006.

WILSON, H. R. Effects of maternal nutrition on hatchability. **Poultry Science**, 76:134-143. 1997.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DA IDADE DA MATRIZ E DA CONCENTRAÇÃO GRADUAL AO CO₂ SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o aumento gradual das concentrações de CO₂ durante os 10 primeiros dias (0 - 240 horas) de incubação sobre o desenvolvimento embrionário de frangos de corte de duas idades de matriz. Ovos de matrizes da linhagem Cobb 500 foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 com duas idades de matriz (36 e 55 semanas) e três concentrações de CO₂ (controle ($\leq 0,05\%$), 1,0% e 1,4%). Após este período os ovos permaneceram sob condição padrão de incubação até o momento do nascimento. A incubação foi realizada em incubadora automática, com capacidade para 8.000 ovos, mantendo a temperatura média de 37,5°C, a umidade relativa média de 60% e viragem a cada hora de 90°. As concentrações de CO₂ dentro das incubadoras foram monitoradas com o auxílio de sensores. Durante a incubação avaliou-se a perda de peso do ovo, a concentração de gás na câmara de ar, a eclosão e eclodibilidade, o peso do embrião, duração da incubação, qualidade ao nascimento e embriodiagnóstico. Houve redução na eclosão e eclodibilidade para os ovos oriundos de matriz velha. Os embriões de ambas as idades de matriz ativaram mecanismos fisiológicos para compensar a exposição ao CO₂, pois apresentaram baixa concentração de CO₂ na câmara de ar aos 18 dias de incubação. Os embriões foram mais pesados na concentração de 1,0% de CO₂. Porém, evidenciou-se efeito negativo no desenvolvimento do embrião de matriz velha quando expostos a concentração de 1,4% de CO₂. As concentrações de 1,0% e 1,4% de CO₂ ampliaram a janela de nascimento, com maior número de nascidos precoces e tardios. A qualidade do pinto de um dia foi pior nos grupos tratados com CO₂, sendo mais exarcebada na matriz velha. Recomendam-se mais pesquisas para o uso efetivo na incubação e no desempenho pós-eclosão de frangos de corte. A exposição de embriões de diferentes idades de matriz ao aumento gradual da concentração de CO₂, 10 primeiros dias de incubação melhora o desenvolvimento embrionário.

Palavras chaves: concentração de CO₂, embrião de frango de corte, idade da matriz.

CHAPTER 2 - EFFECTS OF BREEDER AGE AND INCREASING GRADUAL CO₂ CONCENTRATION ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF BROILERS

ABSTRACT – The objective of this study was to assess the effects of three CO₂ concentrations during the first 240 hours of incubation on eggs coming from breeders of 36 and 55 weeks. The Cobb 500 eggs were distributed in a completely randomized design in a 2 x 3 factorial design with two breeder ages and three concentrations of CO₂ (control ($\leq 0,05\%$), 1,0% and 1,4%) as main factors. After this period, all eggs remained under standard conditions of incubation until hatch. The incubation was performed in a automatic incubator with a capacity for 8.000 eggs, keeping average temperature of 37,5° C, relative humidity average of 60% and a 90° turn every hour. The CO₂ concentration of in the incubators was monitored by sensors. The following parameters were evaluated during incubation, egg weight loss, gas concentration in the egg air chamber, hatching and hatchability, embryo weight, length of incubation, chick quality at hatch, and embryo mortality. There was a reduction in hatchability and hatching eggs that came from the old breeder age. Embryos of both ages activated physiological mechanisms for compensating the CO₂ exposure because it had a low concentration of CO₂ in the air chamber at 18 days of incubation. The embryos were heavier at a concentration of 1,0% CO₂. However, there was a negative effect on embryo development from old breeders when exposing eggs to the high CO₂ concentration. Concentrations of 1,0% and 1,4% CO₂ increased the hatch window, with the largest number of early and late hatch. Chick quality was worse in the groups treated with CO₂, and more negative effects were observed in the old breeders. It is concluded that the exposure of embryos from different breeder ages to gradual increase of CO₂ concentration during the first 10 days of incubation, improves embryo development. Further research is recommended for effective use in hatching and post-hatching performance of broilers.

Keywords: CO₂ concentration, embryo broiler, breeder age.

1. INTRODUÇÃO

Fornecer condições adequadas durante o processo de incubação, para o bom desenvolvimento embrionário, deve ser prioridade na obtenção de pintos de qualidade, ainda mais se considerarmos que mais de 1/3 da vida do frango até a idade de abate se passa dentro da incubadora (HULLET, 2007). Além disso, é evidente que devido à intensificação da produção avícola e do melhoramento das aves, novas pesquisas devem ser realizadas a fim de aperfeiçoar o processo de incubação para atender os requerimentos fisiológicos do embrião durante a incubação como: temperatura, umidade, viragem e ventilação (MOLENAAR et al., 2010).

Dentre o rol de mudanças na incubação moderna que possivelmente podem ser adotados, o fornecimento de CO₂ durante a incubação tem apresentado potencial de uso, uma vez que melhora alguns índices de produção como, por exemplo, a eclosão. Recentemente, alguns autores demonstraram que o aumento gradual de níveis de CO₂ até o 10º dia (0 a 240 horas) de desenvolvimento embrionário afeta positivamente o peso do embrião e estimula a eclosão precoce (BRUGGEMAN et al., 2007), aumenta a eclodibilidade (DE SMIT et al., 2006, 2008; KROETZ NETO, 2010), diminui a mortalidade embrionária e influencia positivamente no desempenho dos frangos (KROETZ NETO, 2010).

Além disso, a idade da matriz influencia diretamente o peso do embrião e seu desenvolvimento durante a incubação SHANAWANY (1984), diminui a espessura da casca (NORTH e BELL, 1990; LOURENÇO DA SILVA, 1994; WILSON, 1997) e o metabolismo do embrião durante o processo de incubação (CHRISTENSEN, 1995). De acordo com RAJU et al. (1997), existe uma correlação positiva entre peso do ovo, peso do pintainho ao nascer e desenvolvimento pós-eclosão.

Foi verificado na literatura que os estudos com CO₂, normalmente, adotam apenas uma idade de matriz e que essas geralmente estão próximas ao pico de produção com idades entre 30 e 40 semanas. Porém, questiona-se da exposição ao CO₂ com diferentes idades e seu impacto sobre o desenvolvimento embrionário.

O objetivo do presente estudo foi de avaliar o aumento gradual das concentrações de CO_2 durante os 10 primeiros dias (0 - 240 horas de incubação) sobre o desenvolvimento embrionário de frangos de corte de duas idades de matriz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental e incubação

Um total de 6.000 ovos férteis de matrizes da linhagem Cobb - 500, classificados de acordo com o peso, $60,0 \pm 0,5\text{g}$ e $66,0 \pm 0,5\text{g}$, provenientes de matrizes de 36 e 55 semanas, respectivamente, foram incubados. Os ovos foram estocados por três dias em uma sala climatizada a uma temperatura de 20°C . Após esse período, os ovos foram pré-aquecidos durante oito horas em uma sala com temperatura ambiente de 30°C e umidade relativa de 60%. Os ovos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×3 com duas idades de matriz (36 e 55 semanas) e três concentrações de CO_2 (controle $\leq 0,05\%$), 1,0% e 1,4%) na primeira fase de incubação (0 a 240h). Após este período os ovos permaneceram sob condição padrão de incubação até o momento da transferência. Os ovos foram distribuídos em bandejas com capacidade de 150 ovos. Os espaços vazios foram completados com bandejas, para garantir o fluxo de ar dentro da incubadora. Cada tratamento foi distribuído em incubadora automática CASP¹, com capacidade para 8.000 ovos, mantendo a temperatura média de $37,5^\circ\text{C}$, a umidade relativa média de 60% e a viragem automática de 90° a cada hora. As concentrações de CO_2 dentro das incubadoras foram monitoradas com o auxílio de sensores². As concentrações de CO_2 foram injetadas gradualmente de acordo com a idade do embrião (Figura 1; Tabela 1). Para atender as concentrações de CO_2 desejadas nos tratamentos, para cada dia, a injeção foi realizada através de válvulas com solenóides acopladas ao sistema de sensores e aos cilindros contendo o gás.

¹ Incubadora CASP Mg 62 “i”®

² Vaisala – 19222GM Calibration Software Kit.

Nos ovos do tratamento controle, não foi alterada a atmosfera de CO₂, sendo as condições da incubação semelhantes à de incubatórios comerciais.

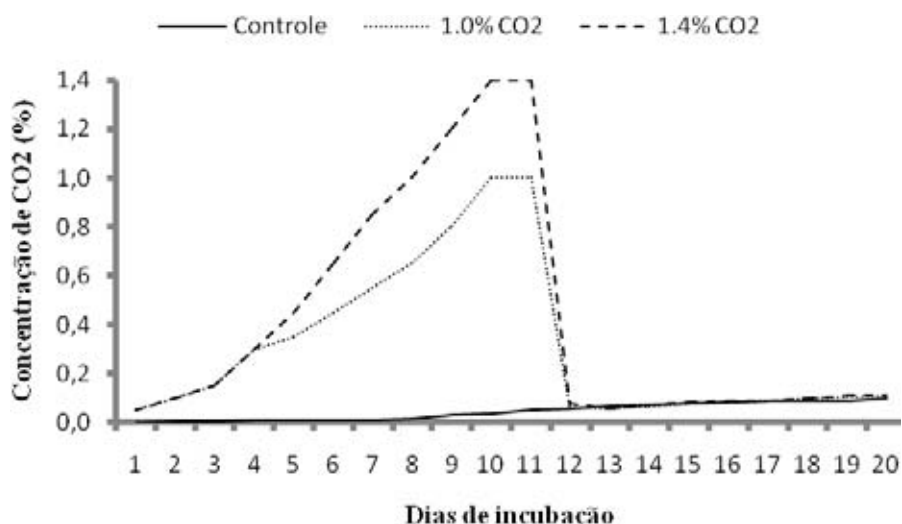


Figura 1 – Concentrações de CO₂ durante o período experimental.

2.1.2. Variáveis de incubação

Os ovos foram pesados e identificados antes da incubação, sendo as variáveis físicas controlados diariamente conforme o desenvolvimento embrionário (Tabela 1). Aos 19 dias de incubação, os ovos foram transferidos para bandejas de nascimento e separados individualmente em caixas com divisórias para fins de avaliação. Após a transferência para as bandejas, os ovos permaneceram na mesma incubadora até o nascimento. Foram monitorados: (1) perda de peso do ovo na transferência (%), (2) eclosão e eclodibilidade (%), (3) duração da incubação (horas), (4) concentração gás na câmara de ar do ovo (mM), (5) peso do embrião (g), (6) qualidade ao nascimento, (7) embriodiagnóstico.

Tabela 1 – Variáveis físicas da incubação durante o período experimental.

Incubação (dias)	Incubação (horas)	Temperatura -----°C-----	Umidade ¹	Renovação de ar ²		Concentração de CO ₂ (%) ²		
				Mínima	Máxima	Controle	1,0	1,4
1	0	37.9	29.4	0	0	0.000	0.050	0.050
2	24	37.9	29.4	0	0	0.004	0.100	0.100
3	48	37.9	29.4	15	15	0.005	0.150	0.150
4	72	37.7	28.9	15	15	0.006	0.300	0.300
5	96	37.7	28.9	18	18	0.008	0.350	0.450
6	120	37.7	28.3	18	18	0.008	0.450	0.650
7	144	37.6	28.1	20	20	0.010	0.550	0.850
8	168	37.6	28.1	20	20	0.014	0.650	1,000
9	192	37,5	27.8	25	35	0.029	0.800	1.200
10	216	37,5	27.8	25	45	0.035	1,000	1,400
11	240	37.4	27.5	25	45	0.050	1,000	1,400
12	264	37.4	27.5	25	45	0.058	0.060	0.075
13	288	37.4	27.2	25	55	0.067	0.058	0.056
14	312	37.4	27.2	25	55	0.074	0.067	0.071
15	336	37.3	26.9	25	65	0.077	0.078	0.082
16	360	37.3	26.9	25	65	0.083	0.084	0.088
17	384	37.3	26.7	40	80	0.085	0.089	0.090
18	408	37.3	26.7	40	80	0.085	0.096	0.100
19	432	36.9	29.4	20	75	0.086	0.105	0.107
20	456	36.9	28.3	20	75	0.099	0.107	0.109
21	504	36.9	28.3	20	75	.	.	.

¹ Temperatura do bulbo úmido; ² Renovação de ar, abertura do damper em graus, para ambos tratamentos; ³ Controle = sem adição de CO₂; as concentrações 1,0% e 1,4% de CO₂ foram adicionadas gradualmente nos 10 primeiros dias de desenvolvimento embrionário.

2.1.3. Perda de peso do ovo na transferência

No momento da transferência aos 19 dias, os ovos foram pesados para a determinação da perda de peso durante a incubação em relação ao peso dos ovos no início da incubação. Utilizou-se uma balança de precisão com divisão de 0,001g.

2.1.4. Eclosão e eclodibilidade

A eclosão foi calculada pela relação do número de pintos nascidos/número total de ovos incubados x 100. A eclodibilidade foi calculada

através da relação número de pintos nascidos/número de ovos férteis x 100. Os ovos inférteis foram determinados pelo embriodiagnóstico.

2.1.5. Duração da incubação

A partir de 464h de incubação (19,3 dias), 100 ovos/tratamento previamente separados, individualmente em bandejas com divisórias, foram vistoriados a cada 4 horas e os nascimentos registrados. Considerou-se o período de incubação total de 504 horas, quando as incubadoras foram desligadas.

2.1.6. Concentração de gás da câmara de ar do ovo

A amostragem de seis ovos/tratamento foi realizada no 10^o, 13^o, 16^o e 18^o dia de desenvolvimento embrionário. A câmara de ar foi selada com silicone e, após a secagem (10 minutos), foi perfurado com uma agulha de (8.0 mm x 0.3 mm) e uma alíquota 0.5mL de ar foi aspirado com uma seringa³, imediatamente, foi injetado em um analisador de gases⁴ para a leitura das concentrações. O analisador equipado com detector de ionização de chama, utilizando o argônio como gás de arraste com fluxo de 25 mL/min e a temperatura do forno foi de 70°C. A calibração foi realizada com uma mistura padrão de gases metano e carbônico. As áreas dos picos foram integradas utilizando o software Chromquest 5.0⁵.

2.1.7. Peso do embrião

Amostragens de 10 embriões por tratamento foram realizadas no 5^o, 7^o, 10^o, 13^o, 16^o e 18^o dia de desenvolvimento embrionário. Os ovos foram abertos e os embriões eutanasiados pela secção da medula e pesados sem os anexos embrionários, para a determinação do peso relativo ao do ovo.

³ Seringa 1 mL BD ultra-fine™ (São Paulo, Brasil).

⁴ cromatógrafo gasoso Trace GC Ultra da Thermo Scientific.

⁵ ChromQuest 5.0 Chromatography Data System (Cambridge, UK).

2.1.8. Qualidade ao nascimento

Ao final da incubação (504h) os pintos previamente separados para o monitoramento da duração da incubação foram amostrados para a qualidade ao nascimento. Foi avaliado o peso ao nascer (g), atividade, penugem, olhos, umbigo, membrana remanescente, abdômen, pernas, canelas e comprimento. Foram atribuídos escores de qualidade de acordo com a análise geral de cada pintainho, adaptado de Tona et al., (2003). Os escores foram assim determinados: ótimo para escore (=100) nota 1, moderado para escore ($90 \geq$ 100) nota 2 e ruim para escore (< 90) nota 3.

2.1.9. Embriodiagnóstico

O embriodiagnóstico foi realizado no final da incubação, quando todos os ovos não eclodidos foram abertos e analisados para a identificação do momento da morte do embrião. A mortalidade embrionária foi classificada em três classes: Precoce 0 - 4 dias, intermediária 5 – 17 dias, e tardia 18 – 21 dias. Os ovos bicados vivo e morto foram considerados como tardios e os ovos inférteis foram usados para o cálculo da eclodibilidade.

2.2. Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto ao atendimento das pressuposições de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros estudentizados. Em seguida foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (General Linear Models) do programa SAS[®] (SAS institute, 2000) e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), certificado pelo protocolo nº 010665/11 e o mesmo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Qualidade da incubação

3.1.2. Perda de peso do ovo na transferência

Não houve diferença significativa na perda de peso dos ovos para as diferentes idades de matrizes e concentrações de CO₂ (Tabela 2). Os resultados do presente estudo estão de acordo com a literatura, que considera a perda de peso excelente na faixa de 11 a 14% (MAUDIN, 1993; ROSA et al., 2002; MACARI e GONZALES, 2003). Desvios na perda de peso, devido à idade de matriz, devem ser considerados durante o desenvolvimento embrionário, uma vez que apresentam qualidade de casca diferenciada como maior porosidade, o que pode levar a uma maior perda de peso durante a incubação (MACARI e GONZALES, 2003). Extremos de perda de água durante a incubação prejudicam o desenvolvimento embrionário e a qualidade do pinto de um dia.

Segundo CAMPOS (2003), a perda de peso do ovo é influenciada pela idade da matriz. Tal fato é explicado pela condutância da casca ser elevada em matrizes novas (até 40 semanas) devido à espessura da casca, enquanto que matrizes velhas apresentam condutância baixa. Este autor argumenta que é necessário ajustar a incubadora considerando os aspectos físicos da casca devido a idade de matriz.

3.1.3. Eclosão e eclodibilidade

Houve diferença significativa para os resultados de eclosão e eclodibilidade nos ovos provenientes de idades de matrizes de 36 e 55 semanas (Tabela 2). A eclosão do total dos ovos incubados de matriz nova foi superior, quando comparada com a matriz velha. Quando foi avaliado a eclodibilidade, número de pintos nascidos em relação aos ovos férteis, os ovos de matrizes novas apresentaram maior eclodibilidade 2,7% em comparação com a matriz velha. Esses resultados, estão de acordo com ROSA et al. (1999), que ao compararem

matrizes de 36 e 62 semanas de idade, reportaram que os ovos de matrizes jovens apresentaram maior eclodibilidade.

A eficiência reprodutiva é reduzida com o avanço da idade da matriz. Na literatura, diversos autores (ROSA et al. 2002; ELIBOL et al. 2002; ZAKARIA et al. 2005), reportaram que independente da linhagem, das condições de estocagem e de incubação, observou-se maior eclodibilidade em ovos provenientes de lotes de matrizes mais novas, 31 a 39 semanas, em comparação aos de matrizes mais velhas 52 a 63 semanas. Ainda, de acordo com ROSA et al. (2002) a piora nos resultados de incubação podem estar diretamente relacionados com a piora na qualidade de casca e a correlação positiva do tamanho do ovo com a idade da matriz.

Não foi observada diferença significativa para os resultados de eclosão e eclodibilidade nos ovos expostos aos tratamentos com CO₂ (Tabela 2). Estes dados sugerem que, a exposição de embriões de matrizes mais velhas a adição ao CO₂ deva ser criteriosa, uma vez que reduziu o número de nascimentos. Esse resultados estão de acordo com BRUGGEMAN et al., (2007) que expuseram gradualmente embriões a concentrações de 1,5% de CO₂ e verificaram que não houve melhoria na eclodibilidade. BARROTT (1937) enfatizou que há impactos negativos na eclodibilidade quando a concentração de CO₂ na incubadora é superior a 1%, nos primeiros dias de incubação. Entretanto, a literatura reporta aumentos significativos na eclodibilidade. Conforme verificado por HOGG (1997) que obteve aumento de 2% na eclodibilidade quando os embriões foram expostos a concentrações de 1,5% de CO₂ na primeira fase de incubação. Em uma pesquisa mais recente de KROETZ NETO (2010) que ao estudar os impactos da exposição gradual de 0.08% de CO₂ na fase inicial de incubação (240h), verificou uma maior eclodibilidade.

Os resultados das pesquisas com CO₂ sustentam a idéia de benefícios para o desenvolvimento do embrião. Entretanto, estes resultados são dependentes das diferenças genéticas e da idade da matriz, que afetam a taxa metabólica do embrião (CHRISTENSEN, 1995; DE SMIT et al., 2008; WITTERS, 2009).

TAYLOR et al. (1956) e TAYLOR e KREUTZIGER (1965, 1966) relataram que concentrações de CO₂ maiores que 1% até 96h, 3% entre 72 a 120h, 6%,

entre 216 a 288h, 8% entre 312 a 384h ou maior que 7% entre 408 a 480h de incubação resultaram em diminuição na eclodibilidade. Necessitando assim, determinar o melhor momento a aplicar o CO₂ na incubadora para melhorar os índices de eclodibilidade.

Tabela 2 – Efeito da idade de matriz Cobb 500 e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a qualidade da incubação

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	Perda peso ¹	Eclusão ²	Eclodibilidade ³	Incubação ⁴
		------(%)-----			(horas)
36		12.9 ± 0.1	88.4 ^a ± 0.7	93.4 ^a ± 0.5	486.1 ^b ± 0.3
55		12.9 ± 0.1	78.1 ^b ± 0.7	90.4 ^b ± 0.5	488.3 ^a ± 0.4
	Controle	13.2 ± 0.1	82.7 ± 0.9	92.4 ± 0.7	486.4 ^b ± 0.4
	1,0	12.8 ± 0.1	83.2 ± 0.9	91.8 ± 0.6	489.3 ^a ± 0.4
	1,4	12.8 ± 0.1	84.1 ± 0.9	91.7 ± 0.6	486.5 ^{ab} ± 0.4
36	Controle	13.4 ± 0.2	88.0 ± 1.2	92.7 ± 0.9	484.0 ± 1,0
	1,0	12.6 ± 0.2	87.0 ± 1.2	93.2 ± 0.9	488.1 ± 1,0
	1,4	12.9 ± 0.2	90.2 ± 1.2	94.2 ± 0.9	486.0 ± 1,0
55	Controle	13.0 ± 0.2	76.7 ± 1.3	91.9 ± 1,0	487.2 ± 1,0
	1,0	12.9 ± 0.2	79.5 ± 1.2	90.5 ± 0.9	490.5 ± 1,0
	1,4	12.7 ± 0.2	78.0 ± 1.2	89.2 ± 0.9	486.0 ± 1,0
CV (%)		7.78	4.22	2.77	1.15
Fonte de variação		-----P- value-----			
Idade da matriz (IM)		0.431	<0.001	<0.001	<0.001
Concentração de CO ₂		0.069	0.385	0.774	<0.001
IM x CO ₂		0.186	0.144	0.093	0.074

¹ Expresso como o percentual de perda de peso durante a incubação.

² Expresso como percentual do total de ovos incubados (n=800).

³ Expresso como o percentual dos ovos férteis.

⁴ Nascimentos a partir da transferência a cada 4 horas.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

3.1.4. Duração da incubação

A duração da incubação foi influenciada significativamente pela idade da matriz e pela concentração de CO₂ (Tabela 2), sendo verificada diferença de 2h entre os nascimentos das diferentes idades. Os resultados do presente estudo contrariam os observados por REIS et al. (1997) que não identificaram diferenças entre a duração da incubação entre matrizes de 32 – 34 semanas em comparação com as de 48 – 50 semanas de idade e ressalta ainda que há diferença entre machos e fêmeas no tempo de nascimento. As diferenças entre os

nascimentos e janela de nascimento podem estar relacionados com as características físicas do ovo e como o peso nas diferentes idades (DECUYPERE et al. 2001) que, neste experimento, foi evidenciado ao longo do período de incubação (Tabela 2). De acordo com MOLENAAR et al. (2010), o atraso na maturação dos órgãos, confirmado pelo maior tempo para os nascimentos, é causado pelo maior peso inicial. Tal fato foi verificado no presente estudo e pode ser influenciado pela idade da matriz.

Observou-se que os primeiros nascimentos, 464h e 472h, aconteceram nos grupos expostos a 1,0% de CO₂ e no grupo exposto a 1,4% CO₂, respectivamente. Porém, evidenciou-se que os tratamentos com CO₂ ampliaram a curva de nascimento, conforme verificado pela diferença entre o primeiro nascido e o último que foi de 20h para o tratamento controle, 40h para os tratamentos de 1,0% e de 28h 1,4% de CO₂. KROETZ NETO (2010) observou uma melhor distribuição dos nascimentos, quando incubou ovos com aumento gradual até 0.7% de CO₂ nos 10 primeiros dias de incubação, porém, não observou diferença na duração dos nascimentos quando comparado ao controle. O rápido desenvolvimento embrionário com a adição gradual de 0,7% a 1,5% de CO₂ na primeira fase de incubação foi relatado em pesquisas (DE SMIT et al., 2006, 2008; BRUGGEMAN et al., 2007).

A redução da janela de nascimento é preferida, uma vez que há uniformidade do lote no momento do alojamento, com consequente qualidade do pinto de um dia e menor tempo para acesso à água e alimento, influenciando no desempenho inicial (GONZALES et al., 2003). Porém, nossos resultados demonstram um efeito prejudicial na janela de nascimento. De fato, a exposição ao CO₂ na primeira fase de incubação, pode estimular a eclosão precoce e a redução da janela de nascimento (DE SMIT et al., 2006, 2008; BRUGGEMAN et al., 2007; KROETZ NETO, 2010; MOLENAAR et al., 2010). Observou-se no presente estudo que, a maior janela de nascimento, 8.2% e 8.0% de nascidos tardios para o grupo com 1,0% e 1,4% CO₂, respectivamente, comparados com o grupo controle. O deslocamento da curva de nascimento para direita, maior número de nascidos tardios, implica em menor tempo para ao acesso a água e ao alimento, porém, repercutiu em menor qualidade do pinto, principalmente o umbigo mal cicatrizado (Tabela 5).

3.1.5. Concentração de gás na câmara de ar do ovo

Aos 10 dias de desenvolvimento embrionário, a concentração de CO₂ na câmara de ar foi influenciada pela idade da matriz e a concentração de CO₂ na incubadora (Tabela 3). Ovos de matrizes mais velhas apresentaram elevada concentração de CO₂ na câmara de ar. No entanto, os ovos incubados no tratamento com 1,4% de CO₂ apresentaram menor valor para a concentração de CO₂ na câmara de ar quando comparado à concentração de 1,0% de CO₂ e ao controle. Aos 13 dias de incubação, foi observado efeito significativo da concentração de CO₂ na incubadora sobre a concentração de CO₂ na câmara de ar. Aos 16 dias de incubação, foi observada interação entre a idade da matriz e o CO₂, na concentração de CO₂ e de O₂, na câmara de ar do ovo. Aos 18 dias de incubação, verificou-se efeito significativo dos tratamentos com CO₂ na incubadora sobre a concentração de CO₂ na câmara de ar do ovo.

A idade da matriz é um fator importante a ser considerado no processo de incubação, uma vez que, influencia no metabolismo embrionário e no aporte de oxigênio (CHRISTENSEN, 1995). Além disso, BRAKE (1995) cita que a condição de manejo das matrizes, como a dieta rica em proteína na fase inicial de postura melhora a qualidade do albúmen e retarda o intercâmbio de oxigênio para o embrião. O aumento gradual das concentrações de CO₂ na fase inicial de incubação promoveu adaptação do embrião, maior vascularização da CAM (ver capítulo 4) e alteração na duração da incubação (Tabela 2). As respostas dos embriões de ambas as idades de matrizes foram semelhantes, mostrando que os efeitos nas concentrações de gases na câmara de ar obedecem ao mesmo padrão durante a incubação.

Os resultados observados no 16º dia de desenvolvimento embrionário podem estar relacionados com o momento em que a membrana corioalantóide (CAM) se encontra com o máximo crescimento, correspondendo à máxima taxa de crescimento do embrião, permitindo com que o embrião consiga ativar mecanismos metabólicos para reduzir os efeitos da hipercapnia (ROMANOFF, 1967; DIETZ et al., 1998). Neste mesmo período, o fluxo sanguíneo e a afinidade ao O₂ sanguíneo são aumentados (TAZAWA, 1980). Aos 16 dias de incubação, ovos de matriz velha expostos a concentração de 1,4% de CO₂ apresentaram baixas concentrações de CO₂ na câmara de ar. Estes resultados contrariam

aqueles encontrados por BRUGGEMAN et al. (2006), que reportaram altas concentrações de CO₂ na câmara de ar no grupo incubado com aumento gradual até 1,5% CO₂ na primeira fase de incubação (0 a 240h). Porém, AR e MEIER (1994) afirmaram que o teor de gás na câmara de ar não reflete o total das trocas gasosas. Estas variações no teor de gases na câmara de ar podem ser devidas a idade da matriz, genética, estocagem, concentrações de CO₂ e outros.

Aos 18 dias de incubação, ovos expostos a 1,4% de CO₂ apresentaram baixa concentração de CO₂ na câmara de ar. Esses resultados sugerem que a exposição ao CO₂ nas primeiras 240 horas foi capaz de promover alterações fisiológicas ou maior tolerância durante a fase estudada. Em seus estudos, BRUGGEMAN et al. (2006) sugerem que a tolerância dos embriões ao CO₂ pode ser parcialmente explicada pelos mecanismos de tamponamento ativados que minimizam os efeitos da hipercapnia. De acordo com LA SCALA JR. (2003), com o desenvolvimento embrionário, as concentrações dos gases na câmara de ar se modificam. No momento da bicagem interna, que ocorre por volta do 18º dia, pose-se encontrar valores de 15% de pO₂, 5% de pCO₂ e 45% umidade relativa. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, evidenciou-se que o comportamento dos gases manteve um padrão, independentemente da idade da matriz nas idades de 10, 13 e 18 dias de incubação e da concentração de CO₂, sendo observada maior concentração de O₂ e menor concentração de CO₂, conforme descrito por (BURTON, 1989). Através das concentrações CO₂ e O₂ na câmara de ar, pode se determinar o cociente metabólico por meio da relação entre o CO₂ produzido/O₂ consumido; que neste experimento foi de 0.50 e 0.62 para ovos de matriz nova e velha aos 18 dias de incubação, respectivamente. Esses resultados ficaram abaixo do ideal que é de 0.78, conforme citado por AR (1991).

Tabela 3 - Efeito da idade de matriz Cobb 500 e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a concentração de gases na câmara de ar do ovo

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	10 dias		13 dias		16 dias		18 dias		
		CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	
36		3.6 ^b ± 0.4	16.3 ± 0.2	12.9 ± 1.1	12.6 ± 0.4	11.1 ± 0.8	12.8 ± 0.5	7.3 ± 0.5	14.5 ± 0.4	
55		4.8 ^a ± 0.4	15.9 ± 0.2	12.6 ± 1.2	12.5 ± 0.4	10.8 ± 0.7	13.2 ± 0.4	8.5 ± 0.5	13.7 ± 0.4	
	Controle	4.9 ^a ± 0.4	16.1 ± 0.2	14.0 ^{ab} ± 1.4	12.3 ± 0.5	12.2 ± 0.9	12.2 ± 0.5	8.1 ^{ab} ± 0.6	13.9 ± 0.5	
	1,0	5.1 ^a ± 0.5	15.7 ± 0.2	15.1 ^a ± 1.5	11.9 ± 0.5	14.1 ± 1.0	12.3 ± 0.6	9.2 ^a ± 0.6	13.7 ± 0.4	
	1,4	2.6 ^b ± 0.5	16.4 ± 0.2	9.3 ^b ± 1.3	13.4 ± 0.5	6.6 ± 0.9	14.4 ± 0.5	6.5 ^b ± 0.6	14.7 ± 0.5	
36	Controle	4.4 ± 0.6	16.1 ± 0.3	15.2 ± 2.0	11.9 ± 0.7	9.5 ^b ± 1.4	13.2 ^a ± 0.8	7.7 ± 0.9	14.2 ± 0.7	
	1,0	4.4 ± 0.6	15.9 ± 0.3	15.5 ± 2.0	11.8 ± 0.7	14.7 ^a ± 1.5	12.3 ^b ± 0.8	8.4 ± 0.8	14.2 ± 0.6	
	1,4	2.1 ± 0.8	16.8 ± 0.4	8.1 ± 1.8	14.0 ± 0.7	9.1 ^b ± 1.2	12.9 ^{ab} ± 0.7	5.8 ± 0.9	15.2 ± 0.7	
55	Controle	5.4 ± 0.6	16.1 ± 0.3	12.8 ± 2.0	12.6 ± 0.7	14.9 ^a ± 1.2	11.3 ^b ± 0.7	8.4 ± 0.9	13.6 ± 0.7	
	1,0	5.8 ± 0.8	15.5 ± 0.4	14.7 ± 2.2	12.0 ± 0.7	13.4 ^a ± 1.2	12.3 ^b ± 0.7	10.0 ± 0.8	13.2 ± 0.6	
	1,4	3.1 ± 0.6	16.0 ± 0.3	10.5 ± 2.0	12.9 ± 0.7	4.1 ^c ± 1.4	15.9 ^a ± 0.8	7.2 ± 0.8	14.3 ± 0.6	
CV (%)		35.9	4.4	34.9	12.9	27.7	13.6	25.4	10.9	
Fonte de variação		-----P-value-----								
Idade da Matriz (IM)		0.043	0.147	0.866	0.926	0.797	0.530	0.096	0.123	
Concentração de CO ₂		<0.001	0.118	0.014	0.107	<0.001	0.012	0.014	0.259	
IM x CO ₂		0.948	0.470	0.453	0.406	0.002	0.011	0.850	0.941	

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

3.1.6. Peso do embrião

Os tratamentos não influenciaram ($P > 0.05$) os resultados de peso relativo dos embriões no 5º, 7º e 13º dia de desenvolvimento embrionário (Tabela 4). Entretanto, no 10º, dia quando cessou a exposição ao gás, observou-se diferença significativa para ambos os fatores. O peso relativo do embrião foi significativamente influenciado pela idade de matriz, uma vez que, o peso do ovo foi de $60.0 \pm 0.5g$ e $66.0 \pm 0.5g$, para matriz nova e velha, respectivamente. Os resultados expressos em percentual, desconsiderando os anexos embrionários, evidenciam que houve influência da idade da matriz no tamanho do ovo e seus constituintes, peso do saco de vitelo e anexos embrionários, afetando o peso relativo do embrião.

O peso relativo do embrião aos 10 dias de incubação foi influenciado, significativamente pelas concentrações de CO_2 . Embriões expostos à concentração de 1,0% de CO_2 foram mais pesados quando comparados com o controle e o grupo de 1,4% CO_2 , respectivamente. A redução no peso embrionário pode ser devido ao maior gasto de energia do embrião para minimizar os efeitos da alta concentração do CO_2 na primeira fase da incubação.

Aos 16 dias de incubação, houve efeito significativo da idade de matriz sobre o peso relativo do embrião. Os embriões oriundos de matrizes velhas foram significativamente mais pesados ($22.3 \pm 0.2g$), quando comparado com os de matrizes novas ($21,5 \pm 0.2g$), respectivamente.

O peso relativo do embrião aos 18 dias de incubação foi influenciado pela idade da matriz e da concentração de CO_2 . O peso do embrião teve efeito linear durante o desenvolvimento embrionário, influenciado pela idade da matriz, sendo que os embriões apresentaram ganho de peso de ($27.7g$ e $26.6g$) para matriz velha e nova, respectivamente, do 10º ao 18º dia de incubação. Observou-se ainda que os embriões do tratamento controle e 1,0% de CO_2 foram significativamente mais pesados ($31.6 \pm 0.4g$ e $30.4 \pm 0.2g$), comparados com aqueles expostos a 1,4% de CO_2 ($29.3 \pm 0.2g$). Porém, se a exposição ao CO_2 for realizada por período curto, 24h na primeira fase de incubação, promove aumento de 10% no peso dos embriões, conforme (HARING et al., 1970). Entretanto, observaram alta mortalidade embrionária para esta idade. De acordo com WITTERS (2009) a idade de matriz afeta a taxa metabólica do embrião. Outro fato importante a ser destacado na presente pesquisa, é que o aumento gradual das concentrações de CO_2 pode ter sido exagerado nas

primeiras 48h de desenvolvimento embrionário (ver Figura 1), e que refletiu no menor peso ao longo da incubação.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os relatados na literatura que afirmam que os embriões se tornam menos sensíveis aos altos níveis de CO₂ com decorrer do desenvolvimento embrionário (LUNDY, 1969; TAYOR et al., 1971). Explicando em parte o menor ganho de peso do embrião quando exposto a altas concentrações de CO₂ na primeira fase de incubação. Contudo, os resultados do presente trabalho contrariam os da literatura que, reportaram que o uso de altas concentrações de CO₂ resulta em maior peso do embrião (HOGG 1997; DE SMIT et al., 2006, 2008; BRUGGEMAN, 2007). Esses autores verificaram efeito positivo no desenvolvimento do embrião quando foram expostos à concentração de 1,5% de CO₂ na primeira fase de incubação.

As respostas ao CO₂ no desenvolvimento do embrião são variadas, considerando que a idade da matriz exerce grande influência devido às características físicas do ovo, como espessura, porosidade e condutância, bem como o metabolismo do embrião nas diferentes idades (WITTERS, 2009). Conseqüentemente o atendimento aos requerimentos fisiológicos do embrião durante as diferentes fases de desenvolvimento favorece o sucesso da incubação (MOLENAAR et al., 2010).

Tabela 4 – Efeito da idade de matriz Cobb 500 e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre o peso relativo do embrião¹

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	Idade do embrião (dias)							P- value
		5	7	10	13	16	18		
36	Controle	0,48 ± 0,01	1,49 ± 0,05	5,60 ^a ± 0,07	19,54 ± 0,31	37,86 ^a ± 0,48	54,00 ^a ± 0,44	-----	
		0,44 ± 0,01	1,40 ± 0,05	5,05 ^b ± 0,08	19,41 ± 0,33	35,67 ^b ± 0,55	50,64 ^b ± 0,64		
55	Controle	0,51 ± 0,02	1,48 ± 0,05	5,29 ^{ab} ± 0,09	19,44 ± 0,39	36,55 ± 0,60	54,47 ^a ± 0,73	-----	
		0,44 ± 0,02	1,41 ± 0,05	5,55 ^a ± 0,09	19,36 ± 0,38	37,97 ± 0,64	52,67 ^{ab} ± 0,50		
36	Controle	0,44 ± 0,02	1,45 ± 0,05	5,15 ^b ± 0,10	19,66 ± 0,41	36,25 ± 0,67	50,87 ^b ± 0,53	-----	
		0,51 ± 0,02	1,47 ± 0,07	5,39 ± 0,12	19,37 ± 0,54	38,32 ± 0,80	55,58 ± 0,78		
55	Controle	0,47 ± 0,03	1,50 ± 0,07	5,95 ± 0,12	19,53 ± 0,54	38,58 ± 0,84	54,12 ± 0,71	-----	
		0,45 ± 0,03	1,50 ± 0,07	5,43 ± 0,13	19,74 ± 0,54	36,64 ± 0,84	52,26 ± 0,78		
36	Controle	0,50 ± 0,03	1,50 ± 0,07	5,18 ± 0,13	19,53 ± 0,57	34,33 ± 0,89	51,88 ± 0,25	-----	
		0,40 ± 0,03	1,34 ± 0,07	5,10 ± 0,13	19,18 ± 0,54	37,18 ± 0,95	51,21 ± 0,71		
55	Controle	0,43 ± 0,03	1,37 ± 0,07	4,83 ± 0,14	19,57 ± 0,61	35,68 ± 1,03	49,71 ± 0,71	-----	
		8,62	8,28	3,72	4,43	4,16	2,13		
Fonte de variação		-----							
Idade da matriz (IM)		0,118	0,138	<0,001	0,849	0,005	<0,001	-----	
Concentração de CO ₂		0,095	0,803	0,023	0,854	0,137	0,021	-----	
IM x CO ₂		0,489	0,602	0,074	0,921	0,228	0,649	-----	

¹ Expresso como o percentual de peso do embrião, sem os anexos embrionários, em relação ao peso do ovo (n=10).

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05).

3.1.7. Qualidade ao nascimento

As características de qualidade do pinto ao nascimento foram influenciadas pela idade da matriz e pela concentração de CO₂ (Tabela 5). Além disso, houve interação significativa da idade da matriz e da concentração de CO₂ para o peso ao nascimento dos pintos. Quando se desdobrou a interação, verificou-se que os pintos oriundos de matriz velha foram mais pesados que os de matriz nova. O comprimento, a qualidade do umbigo e o escore dos pintos foram influenciados pela idade da matriz, sendo maiores naqueles de matriz velha. Segundo HILL (2001), matriz velha resulta em pintos de maior comprimento. Embriões expostos a 1,0% de CO₂ apresentam menor comprimento. A qualidade do umbigo foi pior em pintos de matriz velha e no tratamento a 1,0% de CO₂.

De acordo com os critérios adotados para a qualidade do pinto nesta pesquisa, percebeu-se que os grupos com CO₂ obtiveram os piores escores. Pode ser observado ainda que, devido à ampliação da janela de nascimento (Tabela 2), a qualidade do umbigo foi prejudicada, principalmente no grupo com a concentração de 1,0% CO₂. Observou-se ainda maior percentual de pintos considerados com escore ruim (37.8%) no grupo com 1,0% CO₂, frente a (16.3% e 14.7%) do grupo de 1,4% e do controle, respectivamente. Contudo, os resultados do presente estudo contradizem aos da literatura que sugerem que altas concentrações de CO₂ resultam em pintos de melhor qualidade (TONA et al., 2006; DE SMIT et al., 2008).

Os efeitos das altas concentrações de CO₂ na qualidade dos pintos, ainda não estão completamente compreendidos (MOLENAAR et al., 2010). Além disso, de acordo com o verificado no presente trabalho, o rápido desenvolvimento embrionário com a eclosão precoce quando da exposição gradual ao CO₂, levou a uma pior qualidade dos pintos, uma vez que o grupo controle apresentou um maior percentual de pintos considerados excelentes (55.8%).

A janela de nascimento está diretamente ligada à qualidade dos pintos, conforme verificado nestes resultados, uma vez que os nascimentos tardios foram determinantes na piora dos parâmetros de qualidade.

Baseado nestes resultados, para o uso prático do CO₂ objetivando pintos com a máxima qualidade, a idade da matriz deve ser considerada quando da aplicação na primeira fase de incubação, visto que as trocas gasosas e o metabolismo dos embriões são influenciados pela idade da matriz (WITTERS, 2009).

Tabela 5 – Efeito da idade de matriz Cobb 500 e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a qualidade ao nascimento¹

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Umbigo ²	Escore ³
36		44.3 ± 0.2	19.0 ^b ± 0.0	1.3 ^b ± 0.0	1.8 ^b ± 0.0
55		49.1 ± 0.2	19.2 ^a ± 0.0	1.6 ^a ± 0.0	1.9 ^a ± 0.0
	Controle	46.7 ± 0.3	19.3 ^a ± 0.0	1,4 ^b ± 0.1	1.7 ^b ± 0.1
	1,0	46.9 ± 0.3	18.8 ^b ± 0.0	1.6 ^a ± 0.1	2.0 ^a ± 0.1
	1,4	46.6 ± 0.3	19.3 ^a ± 0.0	1,4 ^b ± 0.1	1.8 ^b ± 0.1
36	Controle	44.8 ^b ± 0.4	19.2 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1
	1,0	44.2 ^b ± 0.4	18.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1
	1,4	44.0 ^b ± 0.4	19.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1
55	Controle	48.6 ^a ± 0.4	19.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.1
	1,0	49.6 ^a ± 0.4	18.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1
	1,4	49.2 ^a ± 0.4	19.4 ± 0.1	1,5 ± 0.1	1.8 ± 0.1
CV (%)		4.48	2.12	49.7	43.7
Fonte de variação	-----P- value -----				
Idade da matriz (IM)		<0.001	<0.001	<0.001	0.035
Concentração de CO ₂		0.693	<0.001	<0.001	<0.001
IM x CO ₂		0.053	0.397	0.067	0.482

¹ n=100 por tratamento.

² Escore da condição do umbigo dos pintos 1, 2 ou 3; onde 1= ótimo, 2 = moderado e 3= ruim.

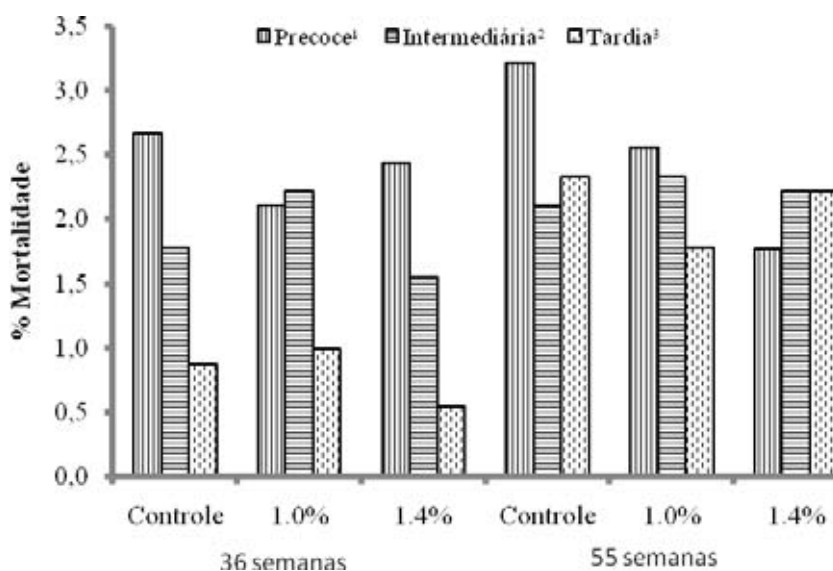
³ Escore da condição geral dos pintos 1, 2 ou 3; onde 1= ótimo, 2 = moderado e 3= ruim.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

3.1.8. Embriodiagnóstico

Os resultados do embriodiagnóstico não foram influenciados significativamente ($P > 0.05$) pela idade da matriz e pela concentração de CO₂ (Figura 2). De forma geral, a literatura apresenta o embriodiagnóstico dividido em três classes de acordo com o período mais crítico de mortalidade: inicial (0 - 4 dias), intermediário (5 – 17 dias) e tardio (18 – 21 dias). No presente trabalho, em ambas as classes de mortalidade embrionária, resultados apresentados em percentual, mostram que a mortalidade inicial está abaixo daquela aceitável citada na literatura que é aproximadamente 5% (BOLELI, 2003). Porém, ao analisar os tratamentos com CO₂ na idade de matriz nova, percebeu-se maior mortalidade nas fases inicial e intermediária. Esse fato pode estar relacionado com a difusão do O₂ e nutrientes para o embrião (BRAKE, 1995; BRUGGEMAN et al., 2006), que pode ter sido dificultada com a maior altura do albúmen. A fase intermediária é considerada crítica, pois há o crescimento do órgão respiratório (alantóide) e a mudança da dieta a base de carboidratos para proteínas e

lipídeos. De acordo com ALDA (2003), falhas na incubação, condições do ambiente, nesta fase podem levar o embrião à morte, conforme verificado mortalidade (2.2% e 1.6%) nos grupos de 1,0% e 1,4% de CO₂, respectivamente. KROETZ NETO (2010) não observou diferença entre as classes de mortalidade para embriões expostos a 0.8% de CO₂ na primeira fase de incubação. Além disso, observou menor mortalidade devido ao mal posicionamento do embrião, no tratamento com CO₂. TAYLOR et al. (1971) sugerem que os embriões se tornam menos sensíveis ao CO₂ com o aumento da idade, fato este que pode explicar a menor mortalidade nas demais classes com 1,4% de CO₂.



¹ Percentual de mortalidade precoce de 0 a 4 dias;

² Mortalidade intermediária de 5 a 17 dias;

³ Mortalidade tardia de 18 a 21 dias

Figura 2 – Efeito da idade de matriz Cobb 500 e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a mortalidade embrionária

Já em ovos de matriz de 55 semanas verificou-se maior mortalidade tardia (2.2%) no tratamento com 1,4 % de CO₂, sugerindo que a maior concentração de CO₂ promoveu rápido desenvolvimento da CAM, favorecendo a ativação dos mecanismos metabólicos para reduzir os efeitos da hipercapnia (ROMANOFF, 1967; DIETZ et al., 1998). BRUGGEMAN et al. (2006) sugerem que o aumento de 1,5% de CO₂ nas primeiras 96 h de desenvolvimento embrionário aumenta a tolerância do embrião ao

CO₂. Explicando assim a menor mortalidade encontrada nesta fase no presente experimento.

4. CONCLUSÃO

Os embriões são tolerantes à exposição ao CO₂ nas primeiras 240h de incubação devido à baixa mortalidade embrionária e ao aumento da eclosão dos ovos de matrizes de 36 semanas. Entretanto, a qualidade ao nascimento dos pintainhos e a janela de nascimento são influenciados pela idade de matriz e concentração de CO₂.

5. REFERÊNCIAS

ALDA, T. R. B. L. Embriodiagnóstico. In: GONZALES, E.; MACARI, M. **Manejo da incubação**. Campinas: Facta, 2^aed. p.500-514, 2003.

AR, A. Egg water movement during incubation. In: TULLETT, S. G. (ed). **Avian Incubation**. London: Butterworth-Heinemann, p.157-173, 1991.

AR, A.; MEIR, M. Egg air cell gas pressures - what do they represent? *Proceedings of the 31st Annual convention of Israeli Branch of the WPSA*, p.72, 1993.

AR, A.; RAHN, H. Pores in avian egg shells: gas conductance, as exchange and embryonic growth rate. **Respiratory Physiology**, 61: 1–20, 1985.

BOLELI, I. C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: GONZALES, E. MACARI, M. **Manejo da incubação**. Campinas: Facta, 2^aed. p.395 – 421, 2003.

BARROT, H. G. Effect of temperature, humidity, and other factors on hatch of hens' eggs and on energy metabolism of chick embryos. **USDA Technical Bulletin**, 553: 1-45, 1937.

BRAKE, J. T. Pontos importantes de manejo no incubatório para uma boa eclosão. In: Conferência Apinco'95 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Curitiba. **Anais...**, p. 33-50, 1995.

BRUGGEMAN, V.; SMIT, L. DE; TONA, K.; EVERAERT, N.; WITTERS, A.; DEBONE, M.; DEGRAEVE, P.; GARAIN, P.; DECUYPERE, E. Changes in albumen pH due to higher CO₂ concentrations during the first ten days of incubation. *World's Poultry Science Association (WSPA), Beekbergen, Netherlands, 12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 2006.*

BRUGGEMAN, V.; WITTERS, A.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; EVERAERT, N.; KAMERS, B. Acid-base balance in chicken embryos (*Gallus domesticus*) incubated under high CO₂ concentrations during the first 10 days of incubation. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, 159:147-154, 2007.

BURTON, G. F.; STEVENSON, J. M.; TULLETT, S. G. The relationship between eggshell porosity and air space gas tensions measured before and during the parafoetal period and their effects on the hatching process in the domestic fowl. **Respiration Physiology**, 77: 89-100, 1989.

BURTON, F. G.; TULLETT, S. G. A comparison of the effects of eggshell porosity on the respiration and growth of domestic fowl, duck and turkey embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 75A: 167-174, 1983.

CAMPOS, E. J. O efeito de linhagens sobre o desenvolvimento embrionário. In: GONZALES, E. MACARI, M. **Manejo da incubação**. Campinas: Facta, 2^aed. p. 354 – 358, 2003.

CHRISTENSEN, V. L. Factors affecting hatchability of turkey embryos. **Poultry and Avian Biology Review**, 6 (1):71-82, 1995.

DECUYPERE, E.; ONAGBESAN, O.; DE SMIT, L.; TONA, K.; EVERAERT, N.; WITTERS, A.; DEBONNE, M.; VERHOELST, E.; BUYSE, J.; HASSANZADEH, M.; DE BAERDEMAEKER, J.; ARCKENS, L.; BRUGGEMAN, V. Hypoxia and hypercapnia during incubation of chicken eggs on development and subsequent performance. **World's Poultry Science Journal (Suppl)**, 486-487, 2001.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; DEBONNE, M.; TONA, J. K.; KAMERS, B. EVERAERT, N. The effect of nonventilation during early incubation on embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. **Poultry Science**, 87:551-560, 2008.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; TONA, J.K.; DEBONNE, M.; ONAGBESAN, O.; ARCKENS, L.; DE BAERDEMAEKER, J.; DECUYPERE, E. Embryonic developmental plasticity of the chick: increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 145: 166-175, 2006.

DIETZ, M. W.; VAN KAMPEN, M.; VAN GRIENSVEN, M. J. M.; VAN MOURIK, S. Daily energy budgets of avian embryos: The paradox of the plateau phase in egg metabolic rate. **Physiological Zoology**, 71:147- 156. 1998.

ELIBOL, O.; PEAK, S. D.; BRAKE, J. Effect of flock age, length of egg storage, and frequency of turning during storage on hatchability of broiler hatching eggs. **Poultry Science**, v.81, p. 945-950, 2002.

GONZALES, E.; KONDO, N.; SALDANHA, E. S.; LODDY, M. M.; CAREGHI, C.; DECUYPERE, E. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. **Poultry Science**, v.82, p.1250–1256, 2003.

HARING, O. H., PATTERSON, J. R. and SARCHE, M. A. Prenatal development of the cardiovascular system in the chicken. **Archives of Pathology**, 89: 537-547, 1970.

HILL, D. (2001). Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality. **Avian Poultry Biology Review**, 12:188.

HOGG, A. Single stage incubation trials. **Poultry Avian Biology Review**, 8:168, 1997.

HULET, R. M.; GLADYS, G.; MEIJERHOF, R.; EL-SHICKH, T. Influence of egg shell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. **Poultry Science**, 86:408-412, 2007.

KROETZ NETO, F. L. Eclodibilidade, qualidade dos neonatos e desempenho pós natal de frangos de corte originados de ovos embrionados submetidos a altos teores de CO₂ no período inicial de incubação. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, Faculdade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

LOURENÇO DA SILVA, P. R. Influência do manejo na qualidade da casca dos ovos de reprodutoras pesadas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA. p.23-34, 1994.

LUNDY, H. A review of the effects of temperature, humidity, turning and gaseous environment in the incubator on the hatchability of the hen's egg. In: Carter TC, Freeman B. M. editors. The fertility and hatchability of the hen's egg. Edinburgh, UK: Oliver e Boyd, 1969.

MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da Incubação**. 2ªed. Jaboticabal: FACTA, p.537, 2003.

MAUDIN, J. M. Measuring incubation moisture weight loss. **International Hatchery Practice**, V.8, p. 47, 1993.

MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN BRAND, H. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: A review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.12, n.3, 137 – 148, 2010.

NAKAGE E. S.; CARDOZO, J. P.; PEREIRA G. T.; QUEIROZ, S. A.; BOLELI, I. C. Effect of the physical form of diet on the eggshell porosity and thickness, water loss and hatchability of partridge (*Rhynchotus Rufescens*) eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, p.227- 234, 2002.

NORTH, M. O., BELL, D. D. Commercial Chicken Production Manual. Chapman e Hall: New York, p. 103-134, 1990.

PEEBLES, E. D.; DOYLE, S. M.; ZUMWALT, P. D.; GERARD, P. D.; LATOUR, M. A.; BOYLE, A. R.; SMITH, T. W. Breeder age influences embryogenesis in broiler hatching eggs. **Poultry Science**, 80:272-277, 2001.

RAHN, R. Gas exchange of avian eggs with special reference to turkey eggs. **Poultry Science**, 60: 1971- 1980, 1981.

RAJU, M. V. L. N.; CHAWAK, M. M.; PRAHARAJ, N. K.; RAO, S. V. R.; MISHRA, S. K. Interrelationships among egg weight, hatchability, chick weight, post-hatch performance and rearing method in broiler breeders. **Indian Journal of Animal Sciences**, 67(1):48-50, 1997.

REIS, L. H.; GAMA, L. T.; CHAVEIRO SOARES, M. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. **Poultry Science**, v. 76, n. 11, p. 1459–1466, 1997.

ROKITKA, M. A.; RAHN, H. Regional differences in shell conductance and pore density of avian eggs. **Respiratory Physiology**, 68: 371–376, 1987.

RONDÓN, E. O. O.; MURAKAMI, A. E. Fatores que interferem no desenvolvimento embrionário e seus efeitos nos problemas metabólicos pós-eclosão em frangos de corte. **Acta Scientiarum**, 20 3:373 – 382, 1998.

ROMANOFF, A. L. Biochemistry of avian embryo. Interscience Publishers. New York, 1967.

ROSA, P. S.; GUIDONI, A. L.; LIMA, I. L.; BERSCH, F. X. R. Influência da temperatura de incubação em ovos de matrizes de corte com diferentes idades e classificados por peso sobre os resultados de incubação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p.1011-1016, 2002.

ROSA, P. S.; SCHEUERMANN, G. N.; FIGUEIREDO, E. A. P. Influência da umidade na incubadora sobre o desempenho de incubação em ovos com diferentes densidades específicas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. **Anais...** p.10. 1999.

SAS INSTITUTE. SAS® (Statistical Analyses System) **User's guide Statistics**, versão 8.1, v.2, 4ª. Ed. Cary, 2000.

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

TAZAWA, H. Adverse effect of failure to turn the avian egg on the embryo oxygen exchange. **Respiration Physiology**, 41: 137-142, 1980.

TAYLOR, L. W.; KREUTZIGER, G. O.; ABERCROMBIE, G. L. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability. 5. Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the terminal days of incubation. **Poultry Science**, 50:66-78, 1971.

TAYLOR L.W.; KREUTZIGER, G. O. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability. 2. Effect of carbon dioxide and oxygen

levels during the period of the fifth through the eight days of incubation. **Poultry Science**, 44:98- 106, 1965.

TAYLOR, L.W.; SJODIN, R. A.; GUNNS, C. A. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability. 1. Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the first four days of incubation upon hatchability. **Poultry Science**, 35:1206-1215, 1956.

TONA, K.; BAMELIS, F.; DE KETELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; MORAES, V. M. B.; BUYSE, J.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of egg storage time and spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. **Poultry Science**, v.82, n.5, p.736-741, 2003.

TULLETT, S. G. Science and the art of incubation. **Poultry Science**, 69: 1–15, 1990.

TULLETT, S. G.; DEEMING, D. C. The relationship between eggshell porosity and oxygen consumption of the embryo in the domestic fowl. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 72A: 529-533, 1982.

WILSON, H. R. Effects of maternal nutrition on hatchability. **Poultry Science**, 76:134-143, 1997.

ZAKARIA, A. H.; PLUMSTEAD, P. W.; ROMERO-SANCHEZ, H.; LEKSRIOMPONG, N. Oviposition pattern, egg weight, fertility, and hatchability of young and old broiler breeders. **Poultry Science**, v. 84, p. 1505-1509, 2005.

WITTERS, A. Factors affecting the impact of hypercapnia during early egg incubation and its effects on pre- and postnatal physiological parameters of broilers [dissertation]. Katholieke Universiteit Leuven, 2009.

CAPITULO 3 - INFLUENCIA DA IDADE DA MATRIZ E DA CONCENTRAÇÃO AO CO₂ NO DESEMPENHO, MORFOMETRIA INTESTINAL E ÍNDICE CARDÍACO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO - O presente estudo teve o objetivo avaliar os efeitos da exposição de ovos de matrizes de duas idades a elevadas concentrações de CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação sobre o desempenho, rendimento de órgãos, morfometria intestinal, rendimento de carcaça e índice cardíaco de frangos de corte. Pintos de um dia, oriundos de matrizes da linhagem Cobb 500 com duas idades (36 e 55 semanas), e incubados sob três concentrações de CO₂ (controle, 1,0%, 1,4%) durante as primeiras 240 horas, foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, totalizando seis tratamentos com cinco repetições de 20 aves cada. Observou-se efeito significativo dos tratamentos ($P < 0.001$) no consumo de ração e ganho de peso, aos sete e 21 dias de idade, para frangos oriundos dos tratamentos com elevadas concentrações de CO₂. O peso relativo do intestino foi influenciado pela idade da matriz. A morfometria intestinal foi influenciada pela interação entre a idade da matriz e concentração de CO₂. Aves submetidas à maior concentração de CO₂ apresentaram menor desenvolvimento do íleo quando comparadas com aquelas expostas a 1,0% de CO₂. O índice cardíaco ao nascimento foi maior em aves oriundas de matriz velha e expostas ao CO₂. A exposição ao CO₂ na primeira fase de incubação em ovos de diferentes idades de matriz deve ser considerada, pois exerce influencia no desenvolvimento na vida da ave pós-eclosão.

Palavras chaves: CO₂, desempenho, idade da matriz.

CHAPTER 3 - THE INFLUENCE OF BREEDER AGE AND CONCENTRATION OF CO₂ ON PERFORMANCE, INTESTINAL MORPHOMETRY AND CARDIAC INDEX BROILER

ABSTRACT - The present study was conducted to evaluate the effects of breeder age and exposure to elevated CO₂ concentrations in the first 240 hours of incubation on performance, organ performance, intestinal morphometry, carcass yield and cardiac index of broilers. Eggs from Cobb 500 breeders from two different ages (36 and 55 weeks) were exposed to three concentrations of CO₂ (control, 1,0%, 1,4%) during the first 240 hours. Data was analyzed as a completely randomized design in a 2 x 3 factorial arrangement of treatments. Six treatments with five replicates of 20 birds each were evaluated. There was a significant difference ($P < 0.001$) in feed consumption and body weight gain at seven and 21 days of age for chickens from treatments with high concentrations of CO₂. The relative weight of intestine was influenced by breeder age. The intestinal morphometry was influenced by the interaction between breeder age and CO₂ concentration. Chickens subjected to higher CO₂ concentration showed less development of ileum compared with those exposed to 1,0% CO₂. Cardiac index at birth was higher in chickens from old breeders and exposed to CO₂. It was concluded that exposure of eggs of different breeder age to CO₂ in the 240 hours of incubation must be considered because it influences the development of chick's life after hatching.

Keywords: CO₂, performance, breeder age.

1. INTRODUÇÃO

A hipercapnia em determinadas fases do desenvolvimento embrionário é importante e essencial para o processo de eclosão e pode trazer benefício para a vida adulta das aves (DE SMIT et al., 2006). Segundo SALAZAR (2005), a exposição ao CO₂ nos primeiros dias pode beneficiar no desenvolvimento do sistema cardiorrespiratório e dos órgãos das aves.

As linhagens modernas com o melhoramento genético apresentam maior sensibilidade do sistema cardiorrespiratório, sendo assim, predispostas a desenvolver as doenças metabólicas e levar a hipertrofia do coração (GONZALES et al., 1998; VILLAMOR et al., 2004). Alterações no desenvolvimento dos órgãos (pulmão, fígado, baço e coração) podem ser um indicador geral de estresse metabólico e que podem também ser utilizados para mensurar a resposta fisiológica à deficiência de oxigênio (SILVERSIDES et al., 1997). Estes autores sugerem ainda, que, existem diferenças entre as linhagens avaliadas com relação à suscetibilidade ascítica.

O uso prático do CO₂ na incubação ainda é um desafio aos pesquisadores. As pesquisas vêm buscando entender qual é o melhor momento do desenvolvimento embrionário a aplicá-lo e a melhor concentração para que se obtenham melhores resultados na incubação. Isto porque, os efeitos da exposição ao CO₂ são variáveis de acordo com a idade de exposição, a concentração, a idade da matriz e as diferenças genéticas (WITTERS, 2009; MOLENAAR et al., 2010). Em um estudo recente KROETZ NETO (2010) concluiu que o aumento gradual do CO₂ nos dez primeiros dias de desenvolvimento embrionário até a concentração de 1,0% influencia positivamente nos resultados de eclodibilidade e desempenho pós-eclosão. Contudo, na literatura são escassos os trabalhos avaliando o desempenho e a morfologia intestinal das aves após a essa condição diferenciada na fase embrionária.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição de ovos de duas idades de matriz a concentração gradual de CO₂ na primeira fase de incubação (0 – 240h) sobre o desempenho, rendimento de órgãos, morfologia intestinal, rendimento de carcaça e índice cardíaco de frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

Pintos de um dia, oriundos de incubação com duas idades de matriz da linhagem Cobb 500 (36 e 55 semanas) sob três concentrações de CO₂ (controle, 1,0% e 1,4%), foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, totalizando 6 tratamentos com cinco repetições de 20 aves cada. As aves foram sexadas pela asa e apenas os pintos machos foram criados neste experimento. Os pintos foram distribuídos em boxes (no piso), em câmaras climatizadas com ambiente termoneutro para cada fase de vida (Figura 1). A temperatura foi monitorada através de sensores⁶, foram registradas a cada 30 minutos durante o dia, e a média diária foi calculada. As aves receberam água e alimento *ad libitum*, com ração à base de milho e farelo de soja, suplementados com minerais e vitaminas, para atender às exigências nutricionais das aves, específica para cada fase segundo recomendações de ROSTAGNO *et al.*, (2011), (Tabela 1). O fornecimento de luz foi de 23h de luz e 1h de escuro.

2.1.1. Desempenho

Para avaliar as características de desempenho, toda a ração fornecida, as sobras de ração e as aves foram pesadas no 7^o, 21^o e 42^o dias de idade. Foi obtido o consumo de ração (CR), o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA= CR/GP) aos 42 dias de idade. Diariamente foi registrado o número de aves mortas para ajustar o consumo de ração. As aves mortas durante o período experimental foram encaminhadas para a necropsia e diagnóstico da causa morte.

⁶ Data Logger Perceptec- Modelo DHT - 2220

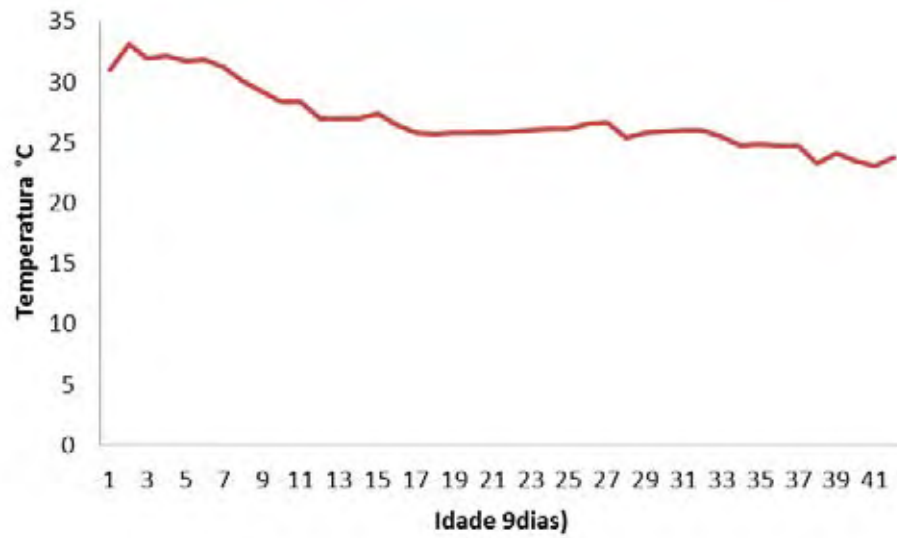


Figura 1 - Monitoramento da temperatura durante a fase experimental

Tabela 1 – Composição e níveis nutricionais das dietas experimentais.

Ingredientes	Inicial (1 – 21 dias)	Crescimento (22 - 33 dias)	Final (34 - 42 dias)
Milho grão	50	62.09	61
Farelo soja 45%	42.15	30.67	30.72
Óleo de soja	3.92	3.45	4.85
Fosfato bicalcico	1.86	1.67	1,52
Calcário	0.91	0.79	0.80
Sal comum	0.50	0.42	0.43
DL - Metionina	0.28	0.25	0.21
L – Lisina	0.12	0.25	0.17
Vitin – Ave ¹	0.10	0.10	0.10
Cloreto de colina	0.07	0.10	0.07
Coxistac	0.05	0.05	0.05
L – Treonina	0.03	0.06	0.03
BHT	0.01	0.01	0.01
Composição calculada²			
Energia mebolizável (Kcal/kg)	3000	3150	3200
Proteína bruta	23.52	21.35	19.26
Metionina (%)	0.59	0.51	0.48
Metionina + cistina (%)	0.90	0.79	0.75
Lisina (%)	1.27	0.08	1,04
Cálcio (%)	0.92	1.65	0.77
Fósforo disponível (%)	0.46	0.41	0.38
Triptofano (%)	0.26	0.24	0.20
Treonina (%)	0.82	0.71	0.68
Arginina (%)	1,52	1.34	1.20
Sódio (%)	0.22	0.20	0.19
Cloro (%)	0.34	0.28	0.20

¹ Níveis de garantia por quilograma do produto: zinco - 91,25g; cobre - 10g; manganês - 76,26g; iodo – 1300mg; selênio – 273,60mg; ácido fólico – 594mg; niacina – 34,65g; biotina – 160mg; ácido pantotênico – 9800mg; vit. A – 7.000.000 UI; vit. B1 – 1780mg; vit. B12 – 10.000µg; vit. B2 – 9600mg; vit. B6 – 3465mg; vit. D3 – 3.000.000 UI; vit. E – 25.000 UI; vit. K3 – 980mg.

² Matriz nutricional Rostagno et al., 2011.

2.1.2. Rendimento de órgãos

No 7^o, 21^o e 42^o dia de idade foram amostradas duas aves com o peso médio da parcela. Após seis horas de jejum, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e os órgãos (intestino, fígado e coração) foram dissecados e pesados para a determinação do rendimento, expresso em percentual do peso vivo.

2.1.3. Morfometria intestinal

No 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dia de idade, cinco aves por tratamento foram selecionadas de acordo com o peso médio da parcela, sacrificadas por deslocamento cervical e submetidas à dissecação intestinal. Para as análises morfométricas do intestino

delgado foram coletadas amostras de aproximadamente 0,5 cm no primeiro dia de vida e de 1,5 cm nas demais idades, do ponto médio do duodeno, do ponto médio entre a entrada do ducto biliar e o divertículo de Meckel (jejuno) e do ponto médio entre o divertículo de Meckel e o ligamento íleo-cecal (íleo). Os segmentos foram abertos em toda sua extensão pela borda mesentérica, estendidos em uma base de papel rígido e lavados delicadamente com pisseta contendo água. As amostras foram então imersas em solução fixadora de Bouin, onde permaneceram por 24 horas. Em seguida, foram desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol (70% a absoluto), diafanizadas em xilol, incluídas em parafina, microtomizadas a 5µm, dispostas em lâminas de vidro e coradas por hematoxilina de Harris-eosina. Para cada segmento intestinal foram efetuados seis cortes de regiões diferentes, cujas imagens digitalizadas foram analisadas no programa Image-J[®]. Foram realizadas 30 leituras por animal, mensurando-se a altura dos vilos e a profundidade da cripta.

2.1.4. Índice cardíaco

Para obtenção do índice cardíaco, oito aves por unidade experimental foram sacrificadas por deslocamento cervical no 1º e 21º dia de vida, sendo o coração coletado e os ventrículos dissecados e pesados para determinar o índice cardíaco pela fórmula ($IC = \text{peso do ventrículo direito} / \text{peso total dos ventrículos}$) de acordo com a metodologia (JULIAN, 1987).

2.1.5. Rendimento de carcaça

Aos 42 dias foram sacrificadas, através do deslocamento cervical, duas aves por unidade experimental, para avaliação do rendimento de carcaça inteira, peito, coxa e sobre-coxa. Todos os valores percentuais foram expressos em relação ao peso vivo da ave em jejum de 6 horas.

2.1.6. Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto ao atendimento das pressuposições de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros estudentizados. Em seguida foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (General Linear Models) do programa SAS[®] e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), certificado pelo protocolo nº 010665/11 e o mesmo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desempenho

Na Tabela 2, são apresentados os resultados de desempenho de frangos de corte oriundos de duas idades de matriz e três concentrações de CO₂. Foi observada diferença significativa no consumo de ração e ganho de peso, aos sete dias de idade, para aves oriundas dos tratamentos com CO₂ na incubação. As aves expostas à maior concentração apresentaram maior CR e GP em comparação com os demais tratamentos para essa idade. Observou-se que os frangos oriundos de matrizes com 55 semanas apresentaram maior ganho de peso comparados com os de matriz nova.

Aos 21 dias de idade, o CR foi influenciado pela concentração de CO₂, evidenciando maior consumo de ração no tratamento 1,0% de CO₂, em comparação com o controle. Aves provenientes de matriz mais velhas apresentaram melhor desempenho, com maior ganho de peso e melhor conversão alimentar, quando comparada com as de matriz nova. Porém aos 42 dias de idade, não se observou diferenças significativas para ambos os fatores estudados. A idade de matriz, além de outros fatores, influencia diretamente o peso do ovo, e, com isso, o peso da progênie (ALMEIDA et al., 2006; ROSA et al., 2002). NOY e PINCHASOV (1993) reportaram que a diferença de desempenho entre aves de diferentes idades é devido à quantidade de material nutritivo presente no ovo. Estudos mostram que, com o maior peso do ovo devido à idade da matriz, os efeitos permanecem durante a vida pós-eclosão. Sendo esse efeito mais marcante nos machos, que a cada 1g de peso do ovo, resulta em 10 a 15g de peso na idade de abate (LEESON e SUMMERS, 2000).

Na literatura, há preocupação com a melhoria dos índices de incubação. Porém, estudos do uso prático do CO₂ durante a incubação e os efeitos durante a vida pós-eclosão são escassos. Em estudos mais recentes, EVERAERT et al., (2007) demonstraram que embriões de matrizes de 39 semanas, expostos a 4% de CO₂ do 10º ao 18º dia de incubação, não apresentaram diferença no peso relativo aos 7 dias

de idade, quando comparado ao grupo controle. Estes autores, relataram ainda que não houve persistência no ganho de peso das aves pós-eclosão. Entretanto, DE SMIT et al. (2006) incubaram ovos com a concentração de 1,5% de CO₂ nos primeiros dez dias de incubação, reportaram que houve um efeito epigenético durante o período de incubação com persistência nos primeiros dias pós-eclosão. Segundo KROETZ NETO (2010) ao estudar o efeito do aumento gradual de CO₂ até a concentração de 1,0% nos primeiros dez dias de incubação, e, avaliando o desempenho até o momento de abate, obteve maior ganho de peso para aquelas aves expostas ao CO₂.

Tabela 2 - Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre o desempenho de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	7 dias			21 dias			42 dias		
	CR ¹	GP ²	CA ³	CR ¹	GP ²	CA ³	CR ¹	GP ²	CA ³
	CO ₂ (%)								
36	138.0 ± 0.0	134.0 ^b ± 0.0	1,03	1000.0 ± 0.0	954.0 ^b ± 0.0	1,05 ^a	4253.0 ± 0.0	2954.0 ± 0.0	1,44
55	143.0 ± 0.0	142.0 ^a ± 0.0	1,01	1011.0 ± 0.0	993.0 ^a ± 0.0	1,02 ^b	4295.0 ± 0.0	2951.0 ± 0.0	1,45
Controle	138.0 ^b ± 0.0	136.0 ^b ± 0.0	1,02	985.0 ^b ± 0.0	962.0 ± 0.0	1,02	4160.0 ± 0.0	2932.0 ± 0.0	1,42
1,0	137.0 ^b ± 0.0	135.0 ^b ± 0.0	1,02	1015.0 ^{ab} ± 0.0	975.0 ± 0.0	1,04	4295.0 ± 0.0	2958.0 ± 0.0	1,45
1,4	147.0 ^a ± 0.0	143.0 ^a ± 0.0	1,03	1016.0 ^a ± 0.0	983.0 ± 0.0	1,03	4362.0 ± 0.0	2967.0 ± 0.0	1,47
Controle	137.0 ± 0.0	132.0 ± 0.0	1,04	991.0 ± 0.0	948.0 ± 0.0	1,05	4141.0 ± 0.1	2894.0 ± 0.0	1,43
1,0	137.0 ± 0.0	131.0 ± 0.0	1,05	1004.0 ± 0.0	946.0 ± 0.0	1,06	4274.0 ± 0.1	2992.0 ± 0.0	1,43
1,4	141.0 ± 0.0	139.0 ± 0.0	1,02	1004.0 ± 0.0	968.0 ± 0.0	1,04	4344.0 ± 0.1	2976.0 ± 0.0	1,46
Controle	140.0 ± 0.0	140.0 ± 0.0	1,00	978.0 ± 0.0	977.0 ± 0.0	1,00	4190.0 ± 0.1	2970.0 ± 0.0	1,41
1,0	136.0 ± 0.0	139.0 ± 0.0	0,98	1026.0 ± 0.0	1003.0 ± 0.0	1,02	4316.0 ± 0.1	2924.0 ± 0.0	1,48
1,4	153.0 ± 0.0	147.0 ± 0.0	1,04	1028.0 ± 0.0	998.0 ± 0.0	1,03	4380.0 ± 0.1	2958.0 ± 0.0	1,48
CV (%)	5.1	4.0	5.6	2.7	3.1	3.1	4.5	3.6	3.7
Fonte de variação	-----P-value-----								
Idade da matriz (IM)	0.102	<0.001	0.256	0.290	0.002	0.014	0.532	0.930	0.381
Concentração de CO ₂	0.009	0.007	0.839	0.028	0.318	0.499	0.069	0.707	0.124
IM x CO ₂	0.158	0.976	0.216	0.258	0.496	0.322	0.997	0.255	0.303

¹ CR= consumo de ração.

² GP= ganho de peso.

³ CA= Conversão alimentar; (SEM = 0.01).

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0.05).

3.2. Rendimento de carcaça

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do rendimento de cortes de frangos de corte oriundos de diferentes idades de matrizes e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário. O rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte não foram influenciados pelos tratamentos ($P>0.05$). Em estudo recente, KROETZ NETO (2010) avaliou os efeitos 1,0% de CO₂ nos 10 primeiros dias de incubação em diferentes atmosferas, ventilada ou não ventilada. Este autor não evidenciou efeito significativo dos tratamentos para o rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte. Porém, relatou que o peso absoluto da carcaça foi maior nos tratamentos com CO₂ quando comparados com o tratamento controle sem adição de CO₂.

Tabela 3 - Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre o rendimento de cortes¹ de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	Carcaça	Peito	Coxa		Sobrecoxa
				-----P- value-----		
36		83.0 ± 0.2	28.6 ± 0.4	9.2 ± 0.1	11.2 ± 0.1	
55		83.2 ± 0.2	28.3 ± 0.4	9.3 ± 0.1	11.3 ± 0.1	
	Controle	83.5 ± 0.3	28.7 ± 0.4	9.3 ± 0.2	11,4 ± 0.2	
	1,0	83.3 ± 0.3	28.5 ± 0.4	9.2 ± 0.2	11.3 ± 0.2	
	1,4	82.5 ± 0.3	28.2 ± 0.4	9.3 ± 0.1	11,0 ± 0.2	
	Controle	83.4 ± 0.4	28.6 ± 0.4	9.4 ± 0.2	11.3 ± 0.3	
36	1,0	83.4 ± 0.4	28.9 ± 0.6	9.2 ± 0.2	11,4 ± 0.3	
	1,4	82.4 ± 0.4	28.2 ± 0.6	9.2 ± 0.2	11.1 ± 0.3	
	Controle	83.6 ± 0.4	28.8 ± 0.6	9.2 ± 0.2	11.6 ± 0.3	
55	1,0	83.3 ± 0.4	28.1 ± 0.6	9.2 ± 0.2	11.3 ± 0.3	
	1,4	82.6 ± 0.4	28.1 ± 0.6	9.5 ± 0.2	10.9 ± 0.3	
CV (%)		1,0	2,7	2,2	2,8	
Fonte de variação		-----P- value-----				
Idade da matriz (IM)		0.528	0.476	0.591	1,000	
Concentração de CO2		0.063	0.590	0.323	0.168	
IM x CO2		0.975	0.739	0.148	0.646	

¹ Percentual de rendimento de cortes em relação ao peso da ave.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P<0.05$).

3.3. Rendimento de órgãos

Na Tabela 4 são apresentados os resultados do rendimento de órgãos de frangos de corte oriundos de diferentes idades de matrizes e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário. Aves oriundas de matriz com 36 semanas apresentaram maior peso relativo do intestino aos sete dias de idade, quando comparado com aquelas de matriz velhas. Não foi observado efeito significativo dos tratamentos com CO₂ sob o rendimento dos órgãos. Contudo, observou-se que as aves expostas ao CO₂ na incubação apresentaram menor peso relativo do intestino aos 7 dias de idade. Sendo que o peso do intestino foi menor em ambos os tratamentos com CO₂ aos 21 dias de idade. Observou-se ainda que o peso relativo do coração aos 7 dias de idade no tratamento com 1,4% de CO₂ foi menor em comparação aos demais tratamentos. Em estudo mais recente, KROETZ NETO (2010) não observou efeito do aumento gradual das concentrações de CO₂ até 1,0% durante a primeira fase de incubação, sobre o rendimento dos órgãos na idade de abate, quando comparado ao grupo controle. Segundo COLEMAN e COLEMAN (1991), as condições inadequadas da incubadora promovem incompleta maturação dos órgãos, ocasionando coração menor e com isso, a ave precisa fazer maior esforço para bombear sangue aos tecidos. DE SMIT et al. (2008) relataram que a exposição a 0,7% CO₂ nos primeiros dez dias de incubação não influenciou o peso do coração. De acordo com HARING (1970), a exposição a altas concentrações de CO₂ (6%), por 24h, em qualquer momento da primeira fase de incubação resultou em alta mortalidade embrionária e mal funcionamento do coração. Apesar da não constatação de morte por ascite no presente estudo, há uma associação à maior demanda metabólica em aves de maior ganho de peso e com isso uma maior exigência de O₂ nos tecidos, mas quando há uma malformação do coração, neste caso menor tamanho, pode predispor a ave a um quadro de ascite (JULIAN et al., 1989; GONZALES e MACARI, 2000).

Tabela 4 – Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre o peso relativo dos órgãos¹ de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	7 dias			21 dias			42 dias		
		Intestino	Fígado	Coração	Intestino	Fígado	Coração	Intestino	Fígado	Coração
36	7.3 ^a ± 0.2	3.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.8 ± 0.1	2.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
	6.8 ^b ± 0.2	3.3 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.7 ± 0.1	2.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	2.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
55	7.4 ± 0.2	3.3 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
	6.9 ± 0.2	3.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
36	6.9 ± 0.2	3.2 ± 0.1	0.9 ± 0.0	4.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
	7.7 ± 0.3	3.4 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.2	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
55	6.9 ± 0.3	3.0 ± 0.1	0.9 ± 0.0	4.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
	7.2 ± 0.3	3.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.2 ± 0.2	1.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
36	7.0 ± 0.3	3.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.9 ± 0.3	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
	6.8 ± 0.3	3.4 ± 0.1	1.0 ± 0.0	4.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	2.6 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
55	6.6 ± 0.3	3.3 ± 0.1	0.9 ± 0.0	4.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	3.2 ± 0.2	1.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	
	4.1	4.4	0.4	4.1	3.8	0.4	7.4	6.7	0.4	
-----P-value-----										
Fonte de variação										
Idade da matriz (IM)		0.018	0.257	0.472	0.690	1.000	0.272	0.192	0.770	
Concentração de CO ₂		0.107	0.825	0.874	0.063	0.720	0.143	0.243	0.750	
IM x CO ₂		0.610	0.191	0.287	0.530	0.069	0.364	0.202	0.675	

¹ Expresso como a percentagem do peso da ave.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

3.4. Morfometria intestinal

Observou-se interação significativa entre a idade de matriz e a concentração de CO₂ para a profundidade cripta e a relação vilo:cripta do duodeno dos pintos com um dia de idade (Tabela 5). Aves oriundas de matrizes novas, quando expostas a 1,0% de CO₂ apresentaram menor altura de vilo, enquanto que nas aves oriundas de matriz velha a essa concentração houve uma maior altura do vilo, o que influenciou diretamente na relação vilo:cripta. Aos sete dias, aves oriundas de matriz nova apresentaram maior profundidade da cripta. Aos 21 dias de idade, aves provenientes da exposição a 1% de CO₂ durante a incubação apresentaram maior altura do vilo e relação vilo:cripta.

Houve interação significativa entre a idade de matriz e a concentração de CO₂ para a profundidade de cripta e a relação vilo:cripta do jejuno com um dia de idade (Tabela 6). Observou-se menor profundidade de cripta para as aves oriundas de matriz jovem expostas à concentração de 1,0% CO₂. Entretanto, em matriz de 55 semanas de idade, foi verificada maior profundidade de cripta nesta concentração. Na idade de sete dias, a concentração de 1,0% de CO₂, afetou significativamente a morfometria do jejuno, sendo observado maior altura do vilo, porém a profundidade de cripta foi menor, quando comparado com os tratamentos controle e de 1,4% de CO₂. Verificou-se ainda que, aos 21 dias de idade, houve interação significativa ($P < 0.05$) entre a idade de matriz e a concentração de CO₂ para a profundidade de cripta.

Foi observada interação significativa entre a idade de matriz e a concentração de CO₂ para a altura de vilo e profundidade de cripta do íleo com um dia de idade (Tabela 7). Evidenciou-se que a ave oriunda de matriz jovem, quando exposta a 1,0% de CO₂, sofreu alterações negativas na morfometria do vilo e cripta. Portanto, para as aves oriundas de matriz velha, notou-se que a essa concentração de CO₂, as aves apresentaram maior desenvolvimento do vilo e cripta. Observou-se efeito significativo ($P < 0.001$) da concentração CO₂ na idade de sete dias na morfometria do vilo e cripta, verificado pelo menor desenvolvimento na concentração de 1,0% CO₂. Já, aos 21 dias de idade verificou-se efeito significativo ($P < 0.001$) na concentração de CO₂ para a altura de vilo e relação vilo:cripta. Aves submetidas à maior concentração de CO₂

apresentaram menor desenvolvimento do vilo (713 μm) quando comparadas com aquelas expostas a 1,0% de CO_2 (876 μm).

A integridade da mucosa do sistema digestório, altura do vilo e profundidade de cripta, está diretamente relacionada com o adequado ganho de peso (SMITH et al., 1990). No entanto, nos primeiros dias de vida pós-eclosão o desenvolvimento do trato gastrintestinal é intenso quando comparado com as demais idades. Além disso, o crescimento dos órgãos é diferenciado nas aves, sendo que no intestino é máximo nos primeiros 6 - 10 dias de vida. Alguns autores sugerem que, o máximo crescimento é dependente da presença ou não de alimento (NOY e SKLAN, 1998a; UNI et al., 1999). De acordo com UNI et al. (1999) com a idade, o aumento de peso e o comprimento dos segmentos são diferenciados, sendo que o duodeno é superior ao jejuno e íleo, conforme verificado no presente estudo. A partir de nossos resultados, principalmente nos primeiros dias de idade, sugere-se que o CO_2 exerça influencia na morfometria intestinal de frangos de corte e que as respostas variam dependendo da idade da matriz, evidenciadas pelas interações significativas.

Tabela 5 – Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a morfometria intestinal do duodeno de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	1 dia			7 dias			21 dias		
		Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³	Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³	Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³
36	1,0	478,0 ± 40,3	59,0 ± 2,6	8,0 ± 0,6	1061,0 ± 25,7	119,0 ^a ± 4,9	9,0 ± 0,6	1327,0 ± 66,3	226,0 ± 8,4	6,0 ± 0,3
		561,0 ± 36,9	61,0 ± 2,4	9,0 ± 0,5	1037,0 ± 30,9	102,0 ^b ± 5,9	11,0 ± 0,7	1438,0 ± 68,2	231,0 ± 8,7	6,0 ± 0,3
55	Controle	507,0 ± 46,8	60,0 ± 3,0	8,0 ± 0,7	1093,0 ± 36,4	118,0 ± 6,9	9,0 ± 0,8	1181,0 ^b ± 87,3	211,0 ± 11,1	6,0 ^b ± 0,4
	1,0	449,0 ± 50,6	60,0 ± 3,3	9,0 ± 0,7	1026,0 ± 31,5	102,0 ± 6,0	11,0 ± 0,7	1611,0 ^a ± 81,6	228,0 ± 10,4	7,0 ^a ± 0,4
	1,4	503,0 ± 44,2	61,0 ± 2,9	8,0 ± 0,7	1028,0 ± 36,4	113,0 ± 6,9	9,0 ± 0,8	1356,0 ^{ab} ± 78,1	246,0 ± 9,9	6,0 ^b ± 0,4
36	Controle	503,0 ± 66,2	63,0 ^{ab} ± 4,3	8,0 ^{ab} ± 0,9	1068,0 ± 44,6	124,0 ± 8,4	9,0 ± 1,0	989,0 ± 123,4	200,0 ± 15,7	5,0 ± 0,6
	1,0	444,0 ± 76,4	43,0 ^b ± 5,0	10,0 ^a ± 1,1	1063,0 ± 44,6	105,0 ± 8,4	11,0 ± 1,0	1639,0 ± 123,4	230,0 ± 15,7	7,0 ± 0,6
	1,4	487,0 ± 66,2	71,0 ^a ± 4,3	7,0 ^b ± 0,9	1053,0 ± 44,6	129,0 ± 8,4	8,0 ± 1,0	1354,0 ± 95,6	247,0 ± 12,1	6,0 ± 0,4
55	Controle	512,0 ± 66,2	57,0 ^{ab} ± 4,3	9,0 ^{ab} ± 0,9	1118,0 ± 57,5	111,0 ± 10,9	10,0 ± 1,3	1372,0 ± 123,4	221,0 ± 15,7	6,0 ± 0,6
	1,0	654,0 ± 66,2	76,0 ^a ± 4,3	9,0 ^{ab} ± 0,9	989,0 ± 44,6	99,0 ± 8,4	11,0 ± 1,0	1583,0 ± 106,9	226,0 ± 13,6	7,0 ± 0,5
	1,4	518,0 ± 59,2	51,0 ^b ± 3,8	10,0 ^a ± 0,8	1004,0 ± 57,5	97,0 ± 10,9	11,0 ± 1,3	1358,0 ± 123,4	245,0 ± 15,7	6,0 ± 0,6
CV (%)	25,3	14,2	21,2	9,5	16,9	29,2	15,4	11,8	15,8	
-----P-value-----										
Fonte de variação										
Idade da matriz (IM)		0,146	0,530	0,317	0,560	0,036	0,136	0,264	0,680	0,909
Concentração de CO ₂		0,767	0,920	0,510	0,338	0,217	0,465	<0,001	0,088	0,025
IM x CO ₂		0,308	<0,001	0,038	0,434	0,345	0,502	0,175	0,671	0,524

¹ Altura do vilo.

² Profundidade da cripta.

³ Relação da altura do vilo e profundidade da cripta.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

Tabela 6 – Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a morfometria intestinal do Jejuo de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	1 dia			7 dias			21 dias		
		Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³	Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³	Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³
36	36	375.0 ± 25.4	56.0 ± 4.1	7.0 ± 0.4	681.0 ± 15.5	108.0 ± 3.5	6.0 ± 0.3	1052.0 ± 42.5	214.0 ± 6.4	5.0 ± 0.2
	55	354.0 ± 25.4	54.0 ± 4.1	7.0 ± 0.4	648.0 ± 17.7	100.0 ± 4.0	7.0 ± 0.3	1066.0 ± 40.3	227.0 ± 6.1	5.0 ± 0.2
Controle	1,0	407.0 ± 30.6	56.0 ± 5.0	8.0 ± 0.4	648.0 ^{ab} ± 21.9	111.0 ^a ± 5.0	6.0 ^b ± 0.4	1135.0 ± 53.3	223.0 ± 8.0	5.0 ± 0.2
	1,4	354.0 ± 30.6	53.0 ± 5.0	7.0 ± 0.4	708.0 ^a ± 19.0	92.0 ^b ± 4.3	8.0 ^a ± 0.3	1013.0 ± 49.3	206.0 ± 7.4	5.0 ± 0.2
	1,4	332.0 ± 32.2	56.0 ± 5.2	6.0 ± 0.4	637.0 ^b ± 20.1	109.0 ^a ± 4.6	6.0 ^b ± 0.3	1030.0 ± 49.3	232.0 ± 7.4	5.0 ± 0.2
Controle	1,0	445.0 ± 40.8	67.0 ^a ± 6.6	7.0 ^{bc} ± 0.6	659.0 ± 26.8	116.0 ± 6.1	6.0 ± 0.5	1152.0 ± 80.6	204.0 ^{ab} ± 12.1	6.0 ± 0.4
	1,4	354.0 ± 45.6	39.0 ^c ± 7.4	10.0 ^a ± 0.6	727.0 ± 26.8	95.0 ± 6.1	8.0 ± 0.5	1039.0 ± 69.8	217.0 ^{ab} ± 10.5	5.0 ± 0.3
	1,4	325.0 ± 45.6	61.0 ^{ab} ± 7.4	6.0 ^c ± 0.6	657.0 ± 28.8	113.0 ± 6.1	6.0 ± 0.5	966.0 ± 69.8	219.0 ^{ab} ± 10.5	5.0 ± 0.3
Controle	1,0	368.0 ± 45.6	45.0 ^{bc} ± 7.4	9.0 ^{ab} ± 0.6	637.0 ± 34.7	106.0 ± 7.9	6.0 ± 0.5	1117.0 ± 69.8	241.0 ^{ab} ± 10.5	5.0 ± 0.3
	1,4	353.0 ± 40.8	67.0 ^a ± 7.6	5.0 ^c ± 0.6	688.0 ± 26.8	89.0 ± 6.1	8.0 ± 0.5	987.0 ± 69.8	196.0 ^b ± 10.5	5.0 ± 0.3
	1,4	340.0 ± 45.6	52.0 ^{abc} ± 7.4	7.0 ^{abc} ± 0.6	618.0 ± 30.0	105.0 ± 6.8	6.0 ± 0.5	1093.0 ± 69.8	245.0 ^a ± 10.5	5.0 ± 0.3
CV (%)	24.9	26.4	18.3	9.0	13.1	15.8	13.2	9.5	13.2	
-----P-value-----										
Fonte de variação										
Idade da matriz (IM)		0.556	0.813	0.398	0.172	0.131	0.776	0.823	0.137	0.171
Concentração de CO ₂		0.245	0.874	0.044	0.040	0.013	<0.001	0.223	0.069	0.239
IM x CO ₂		0.547	0.004	<0.001	0.948	0.958	0.892	0.394	0.033	0.401

¹ Altura do vilo.

² Profundidade da cripta.

³ Relação da altura do vilo e profundidade da cripta.

^{a,b} Médias seguidas de letras iguais diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

Tabela 7 – Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre a morfometria intestinal do íleo de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	1 dia			7 dias			21 dias		
		Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³	Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³	Vilo ¹	Cripta ²	V:C ³
36	55	283.0 ± 9.8	56.0 ± 3.5	5.0 ± 0.3	497.0 ± 9.6	102.39 ± 3.9	5.0 ± 0.2	818.0 ± 35.9	205.0 ± 6.3	4.0 ± 0.2
		287.0 ± 11.2	59.0 ± 4.0	5.0 ± 0.3	493.0 ± 9.9	97.0 ± 4.0	5.0 ± 0.2	754.0 ± 38.2	217.0 ± 6.7	4.0 ± 0.3
36	Controle	287.0 ± 14.0	55.0 ± 5.0	5.0 ± 0.4	501.0 ^{ab} ± 10.6	107.0 ^a ± 4.3	5.0 ± 0.2	770.0 ^b ± 48.0	220.0 ± 8.4	4.0 ^{ab} ± 0.3
	1,0	287.0 ± 10.3	59.0 ± 3.7	5.0 ± 0.3	466.0 ^b ± 12.8	89.0 ^b ± 5.2	5.0 ± 0.3	876.0 ^a ± 42.2	201.0 ± 7.4	4.0 ^a ± 0.3
	1,4	281.0 ± 14.0	59.0 ± 5.0	5.0 ± 0.4	518.0 ^a ± 12.2	103.0 ^{ab} ± 5.0	5.0 ± 0.2	713.0 ^b ± 45.9	213.0 ± 8.1	3.0 ^b ± 0.3
55	Controle	296.0 ^{ab} ± 17.7	61.0 ^{ab} ± 6.4	5.0 ± 0.5	511.0 ± 15.0	108.0 ± 6.1	5.0 ± 0.3	761.0 ± 72.6	213.0 ± 12.7	4.0 ± 0.5
	1,0	250.0 ^b ± 15.4	48.0 ^b ± 5.5	6.0 ± 0.5	459.0 ± 19.3	96.0 ± 7.9	5.0 ± 0.4	956.0 ± 56.2	206.0 ± 9.9	5.0 ± 0.5
	1,4	303.0 ^{ab} ± 17.7	60.0 ^{ab} ± 6.4	5.0 ± 0.5	521.0 ± 15.0	101.0 ± 6.1	5.0 ± 0.3	737.0 ± 56.2	196.0 ± 9.9	4.0 ± 0.4
55	Controle	279.0 ^{ab} ± 21.7	50.0 ^b ± 7.8	6.0 ± 0.7	492.0 ± 15.0	105.0 ± 6.1	5.0 ± 0.3	778.0 ± 62.8	226.0 ± 11.0	4.0 ± 0.4
	1,0	324.0 ^a ± 13.7	70.0 ^a ± 4.9	5.0 ± 0.4	473.0 ± 16.3	81.0 ± 6.9	5.0 ± 0.3	796.0 ± 62.8	195.0 ± 11.0	4.0 ± 0.4
	1,4	258.0 ^{ab} ± 21.7	57.0 ^{ab} ± 7.8	5.0 ± 0.7	516.0 ± 19.3	105.0 ± 7.9	5.0 ± 0.4	689.0 ± 72.6	230.0 ± 12.7	3.0 ± 0.5
CV (%)	10.6	18.8	18.0	6.7	13.7	12.9	15.8	10.5	21,4	
-----P-value-----										
Idade da matriz (IM)		0.784	0.620	0.360	0.792	0.412	0.051	0.239	0.207	0.222
Concentração de CO ₂		0.928	0.836	0.780	0.024	0.043	0.138	0.050	0.255	0.049
IM x CO ₂		0.008	0.038	0.385	0.627	0.398	0.062	0.382	0.145	0.758

¹ Altura do vilo.

² Profundidade da cripta.

³ Relação da altura do vilo e profundidade da cripta.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

3.5. Índice cardíaco

As médias de índice cardíaco de frangos de corte oriundos de ovos de duas idades de matrizes e três concentrações de CO₂ são apresentadas na Tabela 8 e Figura 2. Houve interação significativa ($P < 0.001$) da idade de matriz e da concentração de CO₂ sobre o índice cardíaco com um dia de idade. Para as aves provenientes de matriz nova, a maior concentração de CO₂ resultou em menor índice cardíaco. Já em aves provenientes de matriz velha, a exposição ao CO₂ elevou o índice cardíaco, sendo mais pronunciado na maior concentração. O maior índice cardíaco observado com um dia de idade, na maior concentração de CO₂ para aves provenientes de matriz velha (0.24) sugere cuidados quanto ao uso de CO₂ nos primeiros dez dias de incubação, visto que essas aves apresentaram maior duração da incubação, 486.5h e 489.3h, para a concentração de 1,0% e 1,4% de CO₂, respectivamente. O índice cardíaco das aves expostas a maiores concentrações de CO₂ durante as primeiras 240h de incubação, principalmente para aquelas oriundas de matriz velha, se aproximou daquele considerado para ave ascítica de acordo com GONZALES e MACARI (2000). Aos 21 dias de idade, observou-se tanto efeito da idade de matriz como da concentração de CO₂.

Os efeitos da exposição ao CO₂ são variáveis de acordo com a idade dos ovos, a concentração, a idade da matriz e as diferenças genéticas (WITTERS, 2009; MOLENAAR et al., 2010). O aumento da relação VD/VT pode ser associada à predisposição aos distúrbios do aparelho cardiorrespiratório (JULIAN, 1987). Distúrbios metabólicos relacionados com o rápido crescimento são comuns aos 7 e 21 dias de idade, contudo, podem acometer pintos nos primeiros dias de vida como relatado por (GONZALES e MACARI, 2000).

De acordo com HUCHZERMEYER e DE RUYCK (1986) e JULIAN (1987) a faixa normal para o índice cardíaco varia de 0,15 a 0,25, enquanto que para as aves consideradas ascíticas podem apresentar valores entre 0,30 e 0,60. Além disso, as condições ambientais da incubadora na fase final de incubação, hipóxia na câmara de ar durante o período de desenvolvimento embrionário, podem influenciar negativamente na maturação do coração (COLEMAN e COLEMAN, 1991).

Tabela 8 - Efeito da idade de matriz e da adição gradual de CO₂ nos primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário sobre o índice cardíaco¹ de frangos de corte Cobb 500

Idade da matriz (semanas)	CO ₂ (%)	1dia	21dias
36		0.21 ± 0.0	0.20 ^a ± 0.0
55		0.22 ± 0.0	0.17 ^b ± 0.0
	Controle	0.21 ± 0.0	0.21 ^a ± 0.0
	1,0	0.21 ± 0.0	0.17 ^b ± 0.0
	1,4	0.22 ± 0.0	0.18 ^b ± 0.0
36	Controle	0.22 ^{ab} ± 0.0	0.21 ± 0.0
	1,0	0.20 ^{ab} ± 0.0	0.18 ± 0.0
	1,4	0.19 ^b ± 0.0	0.20 ± 0.0
55	Controle	0.19 ^b ± 0.0	0.20 ± 0.0
	1,0	0.22 ^{ab} ± 0.0	0.16 ± 0.0
	1,4	0.24 ^a ± 0.0	0.16 ± 0.0
CV (%)		17.06	12.19
Fonte de variação		-----P-value-----	
Idade da matriz (IM)		0.330	<0.001
Concentração de CO ₂		0.795	<0.001
IM x CO ₂		0.046	0.319

¹ Relação entre o ventrículo direito pelos ventrículos totais.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si ($P < 0.05$).

4. CONCLUSÃO

A idade da matriz e a exposição às concentrações graduais de CO₂ durante as primeiras 240h de incubação interferem no desempenho e na morfometria intestinal de frangos de corte

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. G.; DAHLKE, F.; MAIORKA, A.; FARIA FILHO, D. E.; OELKE, C. A. Efeito da idade da matriz no tempo de eclosão, tempo de permanência do neonato no nascedouro e o peso do pintainho. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v. 11, n. 1, p. 45-49, 2006

COLEMAN, M. A.; COLEMAN, G. E. Ascites control through proper hatchery management. **World Poultry**, 7:33-35, 1991.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; DEBONNE, M.; TONA, J. K.; KAMERS, B.; EVERAERT, N. The effect of nonventilation during early incubation on embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. **Poultry Science**, 87:551-560, 2008.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; TONA, J. K.; DEBONNE, M.; ONAGBESAN, O.; ARCKENS, L.; DE BAERDEMAKER, J.; DECUYPERE, E. Embryonic developmental plasticity of the chick: increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** 145: 166-175, 2006.

EVERAERT, N.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; WITTERS, A.; KAMERS, B.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Changes in acid-base balance and related physiological responses as a result of external hypercapnia during the second half of incubation in the chicken embryo. **Poultry Science**, 87:362-367, 2008.

GONZALES, E.; BUYSE, J.; TAKITA, T. S.; SARTORI, J. R.; DECUYPERE, E. Metabolic disturbances in male broilers of different strains.v1. performance, mortality, and right ventricular hypertrophy. **Poultry Science**, v.77, p.1646–1653, 1998.

GONZALES, E.; MACARI, M. Enfermidades metabólicas em frangos de corte . In: BERCHIERE JR., A.; MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: Facta, p. 451 – 464, 2000.

HARING, O. H.; PATTERSON, J. R.; SARCHE, M. A. Prenatal development of the cardiovascular system in the chicken. **Archives of Pathology**, 89: 537-547, 1970.

HUCHZERMEYER, F. W.; DE RUYCK, A. M. C. Pulmonary hypertension syndrome associated with ascites in broilers. **Veterinary Record**, 119: 93, 1986.

JULIAN, R. J. The effect of increased sodium in the drinking water on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in broiler chickens. **Avian Pathology**, 16: 61 – 71, 1987.

JULIAN, R. J. Lung volume of meat type chickens. **Avian Diseases**, 33: 174-176, 1989.

KROETZ NETO, F. L. Eclodibilidade, qualidade dos neonatos e desempenho pós natal de frangos de corte originados de ovos embrionados submetidos a altos teores de CO₂ no período inicial de incubação. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, Faculdade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

LEESON, S.; SUMERS, J. D. **Comercial Poultry Nutrition**, 2ed. Guelph: University Books, 2000.

MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN BRAND, H. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: A Review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.12, n.3, 137 - 148. 2010.

NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilization in the newly hatched poultry. **British Poultry Science**, 39: 446 – 451. 1998a.

NOY, Y.; PINCHASOV, Y. Effect of a single posthatch incubation of nutrients on subsequent early performance of broiler chicks and turkey pouts. **Poultry Science**, 72:1861 – 1866. 1993.

ROSA, P.S.; GUIDONI, A.L.; LIMA, I.L.; BERSCH, F.X.R. Influência da temperatura de incubação em ovos de matrizes de corte com diferentes idades e classificados por peso sobre os resultados de incubação. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 31, n. 2, p.1011-1016. 2002.

ROSTAGNO, S. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, 3ª Ed, 252p. (2011).

SALAZAR, A. I. Nuevas Ideas sobre el Manejo de la Concentración del CO₂ y Del Porcentaje de Humedad Relativa en Incubadoras Multietapa. In: Congresso Latinoamericano de Avicultura, Panamá, 2005. **Anais...** XIX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Panamá, 2005. CD.

SILVERSIDES, F. G.; LEFRANÇOIS, M F.; VILLENEUVE, P. The effect of strain of broiler on physiological parameters associated with the ascites syndrome. **Poultry Science**, v.76, n.5, p.663-667. 1997.

SMITH, M.W.; MITCHELL, M.; PEACOCK, M.A. Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.97, p.57-63, 1990.

VILLAMOR, E.; KESSELS, C. G. A.; RUIJTENBEEK, K.; VAN SUYLEN, R. J.; BELIK, J.; BLANCO, C. E. Chronic in ovo hypoxia decreases pulmonary arterial contractile reactivity and induces biventricular cardiac enlargement in the chicken embryo. **American Journal Physiology**, Comparative Physiology 287, R642–R651, 2004.

WITTERS A. Factors affecting the impact of hypercapnia during early egg incubation and its effects on pre- and postnatal physiological parameters of broilers [dissertation]. Katholieke Universiteit Leuven. 2009.

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

CAPÍTULO 4 - INFLUENCIA DO CO₂ DURANTE OS PRIMEIROS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO NA ANGIOGÊNSE DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE E NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO - O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos do aumento gradual de CO₂ até 1,5% durante os 10 dias primeiros (0 – 240 horas) de incubação na vascularização da membrana corioalantóide, nas variáveis sanguíneas do embrião e 24 horas pós-eclosão em frangos de corte. Ovos da linhagem Cobb 500 foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, divididos em dois tratamentos: controle sem adição de CO₂ e o tratamento com exposição gradual de CO₂ a 1,5 % durante as primeiras 240 horas de incubação. A incubação foi realizada em incubadora automática com a temperatura média de 37,5°C, a umidade relativa média de 60% e viragens de 90° a cada hora. Avaliou-se a morfometria da membrana corioalantóide (CAM), variáveis sanguíneas e os resultados zootécnicos. A exposição ao CO₂ promoveu maior vascularização da CAM (14.0% controle; 17.0%, CO₂). O pH do sangue foi mais alcalino no tratamento com CO₂ aos 16 e 18 dias de incubação e 24h pós-eclosão foi mais ácido (7.37). A pressão parcial de O₂ (pO₂), no tratamento controle, foi o dobro do valor encontrado no tratamento com CO₂, com 24h pós-eclosão. A pressão parcial de CO₂ no sangue (pCO₂) foi significativamente maior aos 16 dias e 24h pós-eclosão. O metabolismo embrionário foi alterado com menor tempo de incubação e menor peso do pinto, quando os ovos foram expostos ao CO₂. Conclui-se que a exposição gradual de 1,5% de CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação aumenta a vascularização da membrana corioalantóide, acelera o desenvolvimento embrionário e altera o metabolismo das aves com 24h pós-eclosão.

Palavras chaves: membrana corioalantóide, vascularização, morfometria, hipercapnia.

CHAPTER 4 – INFLUENCE OF CO₂ DURING THE FIRST 10 DAYS OF INCUBATION ON CHORIOALLANTOIC MEMBRANE ANGIOGENESIS AND DEVELOPMENT OF BROILER EMBRYOS

ABSTRACT - The present study evaluated the effects of the gradual increase of CO₂ up to 1,5% during the first 10 days (0-240 hours) of incubation on the chorioallantoic membrane vascularization, embryo and post-hatch blood parameters, and the incubation results of broiler chickens. Cobb 500 eggs were distributed in a completely randomized design. Two treatments were evaluated, the control treatment without additional CO₂ and CO₂ treatment with gradual increase up to 1,5% CO₂ during the first 240 hours of incubation. The incubation was performed in the incubator with automatic average temperature of 37,5° C, relative humidity average of 60% and 90° turning hour. The morphology of chorioallantoic membrane (CAM), blood parameters and the results of incubation were evaluated. Exposure to CO₂ affected CAM vascularization (14.0% control, 17.0% CO₂). The blood pH was more alkaline in the treatment with CO₂ (0.8 units) and post-hatch had blood pH more acidic (7.37). The pO₂, post-hatch was influenced ($P < 0.05$) by treatments (73.0mmHg, control; 36.0mmHg, CO₂), respectively. The pCO₂ values were influenced by treatments at 16 days and post-hatch ($P < 0.05$). At 18 days, the treatments affected ($P < 0.05$) the weight of the embryo (31.6g, control; 29.3g, group CO₂), respectively. The embryonic metabolism has changed with shorter incubation and smaller chick weight, when eggs were exposed to CO₂. It is concluded that gradual exposure of 1,5% of CO₂ during the first 240 hours of incubation increased vascularization of the chorioallantoic membrane, accelerated embryonic development and changes the chick metabolism 24h post-hatch.

Keywords: chorioallantoic membrane, vascularization, morphometry, hypercapnia

1. INTRODUÇÃO

Acredita-se que a exposição ao CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação possa afetar o desenvolvimento do embrião e a sua vida pós eclosão, conforme verificado por DE SMITH, et al., 2006; KROETZ NETO, 2010. No entanto, prover condições adequadas no processo de incubação e atender os requerimentos fisiológicos para o desenvolvimento embrionário são extremamente importantes na obtenção de pintos de qualidade e com robustez na vida adulta (MOLENAR, 2010).

Com o desenvolvimento do embrião, a tolerância ao CO₂ é aumentada, isto acontece devido ao estabelecimento do aparato respiratório a partir de 96 horas de incubação (TAYLOR e KREUTIZGER, 1965). A formação da membrana corioalantóide ocorre a partir da fusão das membranas córion e alantóide com aproximadamente quatro dias de desenvolvimento embrionário (DE). A partir da sua fusão e desenvolvimento, aos 12 dias de DE, está recobre toda área da membrana interna da casca, seguida de grande fluxo de sangue através dos vasos sanguíneos (VAN GOLDE et al., 1997). O seu desenvolvimento cessa quando o embrião faz a bicagem interna e os pulmões já estão funcionais (TAZAWA e WHITTOW, 2000).

Em aves, a membrana corioalantóide provê a troca gasosa, retirando, portanto, a influência materna, e os resultados neonatais de hipóxia ou outro estímulo embrionário pode ser avaliado livre dos efeitos da resposta materna (BAVIS e KILGORE, 2001). No começo do desenvolvimento embrionário a área vaculosa da CAM é reponsavel pelo suprimento de oxigenio e a remoção do CO₂ (TAYLOR e KREUTIZGER, 1965). Como a difusão dos gases é limitada até a fase em a membrana entra em contato com a casca aos seis dias de desenvolvimnto, e sendo a partir deste momento em que a respiração se torna mais eficiente. Estudo em codornas expostas à 2% de CO₂ durante 15 dias de incubação demonstrou que alterações na resposta aguda ventilatória ao CO₂ em adultos (BAVIS e KILGORE, 2001; WILLIAMS e KILGORE JR., 1992).

As pesquisas com hipercapnia durante a incubação pretendem esclarecer como os embriões de frangos toleram as diferentes concentrações bem como os momentos de exposição. Porém, os resultados dos experimentos têm mostram que a tolerância do embrião sofre influência de vários fatores como a concentração e a idade de exposição (OWEN, 1991; DE SMITH, et al., 2006; EVERAERT et al., 2007;

DE SMITH et al., 2008; KROETZ NETO, 2010), e a idade da matriz (DE SMITH, et al., 2006; WITTERS, 2009).

O objetivo do presente estudo foi de avaliar os efeitos da incubação com CO₂ (aumento gradual até 1,5%) durante os primeiros 10 dias (0 - 240 horas de incubação) na vascularização da membrana corioalantóide, nos variáveis sanguíneos do embrião e 24 horas pós-eclosão em frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tratamentos e manejo de incubação

Ovos férteis de matrizes da linhagem Cobb 500, classificados de acordo com o peso médio de $68.0 \pm 0.5g$, provenientes de matrizes com 44 semanas foram incubados. Os ovos foram distribuídos em dois tratamentos. O tratamento controle sem adição de CO₂ e o tratamento com CO₂ exposição gradual a 1,5 % CO₂ na primeira fase de incubação (0 a 240h). Após as 240h os ovos permaneceram sob condição padrão de incubação, mantendo a temperatura média da incubadora em 37,5°C, a umidade relativa média de 60% e a viragem automática de 90° a cada hora. A incubação e os nascimentos foram realizados em incubadora automática⁷. As concentrações de CO₂ foram acrescidas gradualmente de acordo com a idade do embrião (Figura 1) e foram monitoradas com o auxílio de sensores⁸. Para atender as concentrações de CO₂ desejadas nos tratamentos, para cada dia, a injeção foi realizada através de válvulas com solenóides acopladas ao sistema de sensores e aos cilindros contendo o gás. Na segunda fase de incubação até o final da incubação 504 horas, em ambos os tratamentos, as concentrações de CO₂ permaneceram inferiores a 0.05%.

⁷ Incubadora Premium Ecológica, modelo IP600, Belo Horizonte - MG.

⁸ Vaisala – 19222GM Calibration Software Kit.

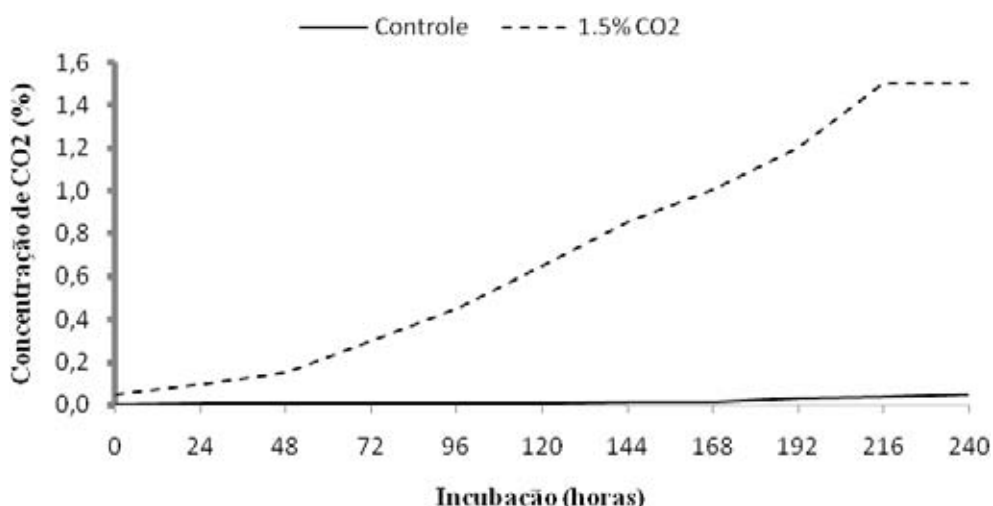


Figura 1 - Concentrações de CO₂ durante as primeiras 240 horas de incubação.

2.2. Análise morfométrica da membrana corioalantóide (CAM)

Aos 12 dias de desenvolvimento embrionário dez ovos por tratamento foram selecionados para a análise da morfometria da CAM segundo metodologia adaptada de PARENTE et al. (2012). Para a preparação da CAM os ovos foram abertos a partir da câmara de ar e o embrião retirado e eutanasiado pela secção medular na articulação atlanto-occipital. Os fragmentos da CAM foram coletados tomando-se como referência o vaso sanguíneo de maior calibre detectado.

Para a análise morfométrica, um fragmento da CAM à fresco de 10 ovos de cada grupo foi coletado e distendido sobre uma lâmina de vidro e sobre este fragmento se sobrepôs uma lamínula. A leitura das lâminas foi realizada com auxílio do sistema de análise digital de imagem⁹. Calculou-se a porcentagem da área vascular por campo, correspondente a área marcada em vermelho, trabalhando em ambiente Windows, sendo fotografados 30 campos aleatórios que apresentavam vasos sanguíneos.

⁹ (Leica Qwin V3) acoplado a um microscópio (Leica-DM 2500) e o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA).

2.2. Determinação dos variáveis sanguíneos

2.2.1. Amostragem dos embriões

Foram amostrados seis embriões por tratamento no 13^o, 16^o, 18^o dias de incubação e pintos com 24h pós-eclosão. Os ovos e embriões foram pesados, uma porção da casca $\pm 2\text{cm}^2$ foi retirada para a exposição dos vasos sanguíneos e a artéria de maior calibre foi dissecada, segundo a metodologia adaptada (PIIPER et al., 1980). Após, com uma tesoura, foi realizado uma incisão na artéria e, sem contato com o ar, o sangue foi coletado em um tubo capilar¹⁰ e inserido em um analisador de gases¹¹. Foram analisados os seguintes variáveis sanguíneas: pH, pressão parcial de O₂ (pO₂, mmHg), pressão parcial de CO₂ (pCO₂, mmHg), Hematócrito (Hct, %), Hemoglobina (Hb, g/dL). Os valores foram corrigidos para a temperatura da casca do ovo e ou do embrião no momento da coleta.

2.2.2. Canulação e amostragem pós-eclosão

Após os nascimentos dos pintos a artéria femoral direita foi canulada. Na cirurgia, os animais (n=6) foram anestesiados com zotetil e realizada uma incisão de 1 cm na região inguinal direita para a exposição da artéria femoral. Na canulação utilizou-se um cateter de polietileno composto por um seguimento PE-10 de 4,5 cm de comprimento, ligado a um cateter PE-50 de 15 cm. A extremidade livre do cateter foi fixada na área interescapular. Após a cirurgia, as aves foram mantidas por 24 horas em ambiente com temperatura de conforto, com acesso a água e alimento *ad libitum*, para a recuperação. Após esse período, a extremidade do cateter foi aberta e uma amostra de sangue foi coletada, sem contato com ar, para a análise.

2.2.3. Parâmetros zootécnicos

Os embriões foram pesados no 13^o, 16^o, 18^o dias de desenvolvimento embrionário. Aos 19 dias os ovos foram pesados para verificar a perda de peso. Avaliou-se ainda, a duração dos nascimentos (horas), eclosão (%), eclodibilidade (%), peso do pinto recém eclodido (g), peso relativo ((peso do embrião/peso inicial do ovo) x 100) e o comprimento da ave recém eclodida (cm), para isso, a ave foi posicionada

¹⁰ Tubo capilar sem heparina cód. 100, Perfecta, São Paulo, Brasil.

¹¹ i-STAT 1 analyser, modelo ABBT – 04J48 – 50, San Diego, CA.

delicadamente em uma superfície plana, mensurou-se o comprimento das extremidades da ponta do bico até a ponta do dedo médio, sem considerar a unha.

2.3. Análise estatística

Os dados foram avaliados em um delineamento inteiramente casualizado quanto ao atendimento das pressuposições de homogeneidade de variância e normalidade dos erros estudentizados. Os valores percentuais foram transformados em ARCSEN. Em seguida foram submetidos à análise de variância simples pelo procedimento GLM (General Linear Models) do programa SAS[®] (SAS institute, 2000) e a diferença entre as médias foram avaliadas pelo teste t de Student e consideradas estatisticamente significantes com ($P < 0.05$).

O projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), certificado pelo protocolo nº 010665/11 e o mesmo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Morfometria da membrana corioalantóide (CAM)

Durante o desenvolvimento embrionário alterações nas concentrações dos gases afetam diretamente a angiogênese da membrana corioalantóide (VERHOELST et al., 2011). Neste sentido, a hipercapnia na fase inicial de incubação, primeiras 96 horas, tem sido considerada benéfica para o desenvolvimento embrionário. O melhor desenvolvimento embrionário, devido à hipercapnia, pode ser atribuído ao efeito estimulante na angiogênese nos diferentes tecidos (IRIE et al., 2005), com efeito significativo na neovascularização da membrana corioalantóide. A análise morfométrica demonstrou aumento da área vascular na membrana corioalantóide aos 13 dias de desenvolvimento ($P < 0.05$). A CAM oriunda do tratamento com CO₂ apresentou maior vascularização quando comparado com o tratamento controle (Figura 2 e 3).

A exposição ao CO₂ promoveu alterações na CAM, porém, não influenciou no peso do embrião aos 13 dias de incubação. Como os resultados da CAM foram influenciados pela exposição ao CO₂, esperava-se na presente pesquisa que o peso do embrião fosse influenciado, fato que não ocorreu, uma vez que as pesquisas sugerem que as diferenças no desenvolvimento da membrana corioalantóide afetam diretamente o metabolismo embrionário e com isso impactar no desenvolvimento do embrião (TONA et al., 2004; VERHOELST et al., 2011).

Neste experimento optou-se pela coleta da membrana com 13 dias de incubação, devido ao fato que nesta idade a sua formação e funcionalidade já estão completas (ROMANOFF, 1960). No entanto, por ser um órgão relacionado com respiração do embrião, alterações no ambiente de incubação, alteram o metabolismo embrionário e conseqüentemente impactam na angiogênese da CAM (VERHOELST et al., 2011). A angiogênese é alterada durante o desenvolvimento embrionário e dependente das condições de incubação como as concentrações de gases (DUSSEAU e HUTCHINS, 1989; IRIE et al., 2005).

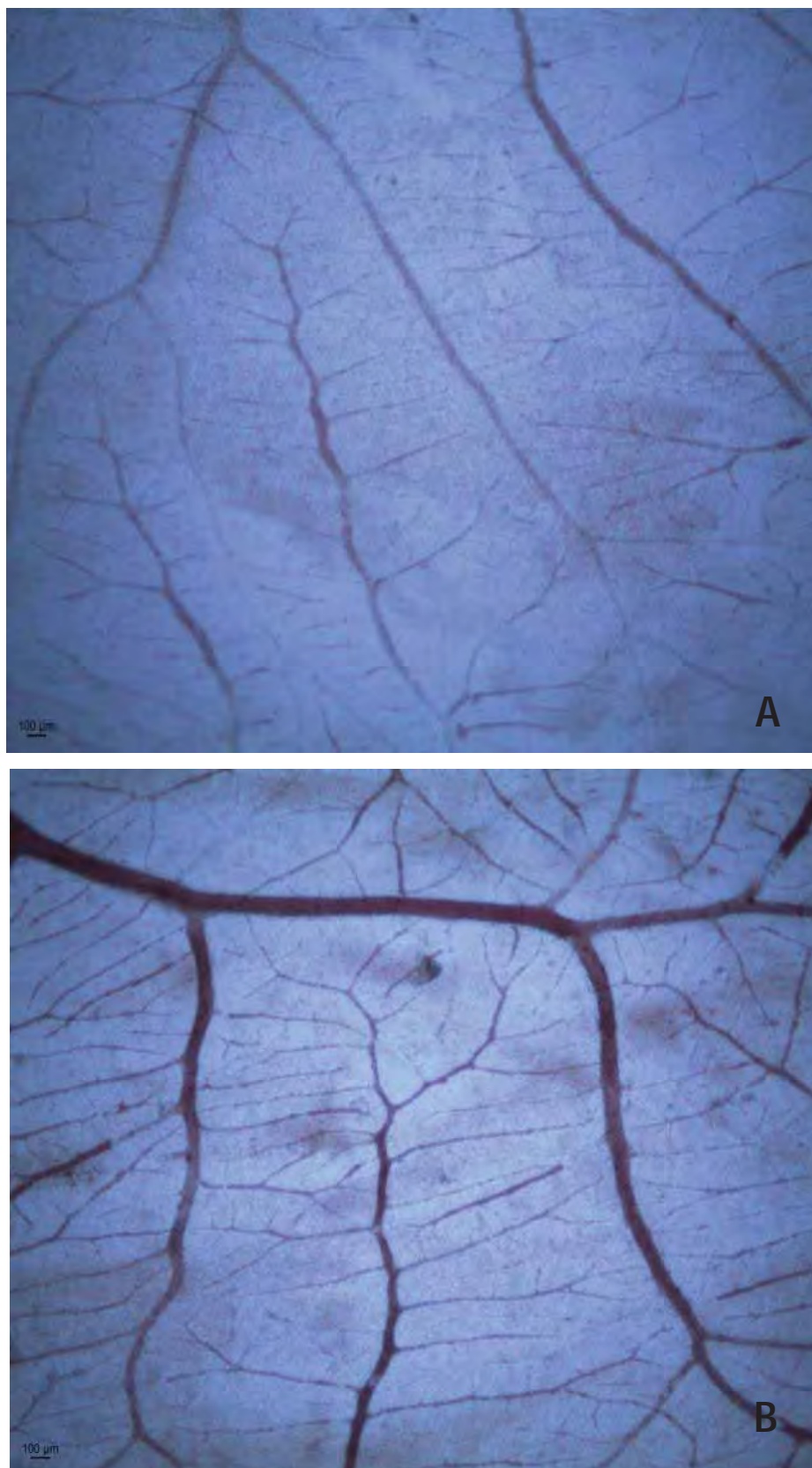


Figura 2 - Membrana corioalantóide (CAM) aos 13 dias de incubação (n=10). (A) tratamento controle sem adição de CO₂, (B) Tratamento CO₂ exposição gradual a 1,5 % CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação.

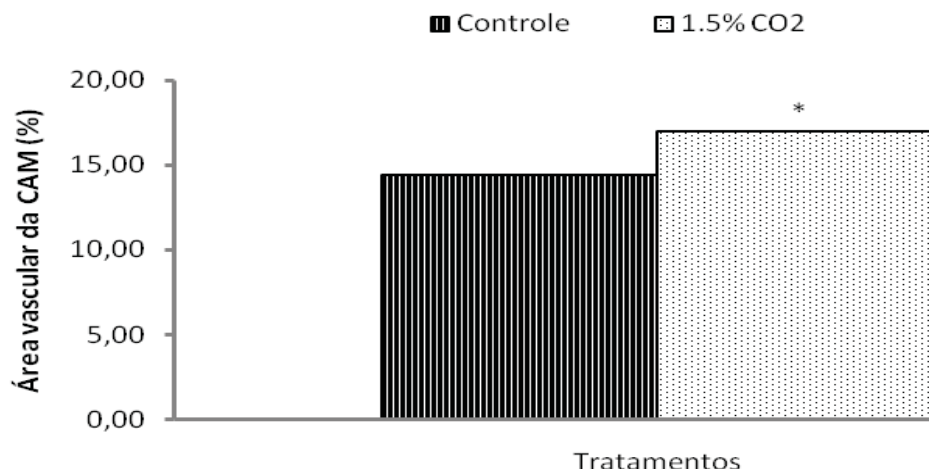


Figura 3 - Percentual de vasos na membrana corioalantóide (CAM) aos 13 dias de desenvolvimento embrionário (n=10). Diferença significativa entre os tratamentos (* $P < 0.05$).

3.2. Variáveis sanguíneas

Na Tabela 1, são apresentados os valores das variáveis sanguíneas: pH, pO_2 (mmHg), pCO_2 (mmHg), Hct (%) e Hb (g/dL) de embriões e 24h pós-eclosão de frangos de corte incubados com adição gradual da concentração de CO_2 até 1,5% nos 10 primeiros dias de incubação. Aves do grupo exposto ao CO_2 apresentaram pH sanguíneo foi mais alcalino aos 18 dias. Já com 24h pós-eclosão observou-se que no tratamento controle o pH foi mais alcalino (7.50) quando comparado com o tratamento CO_2 . Durante a fase de incubação não houve efeito dos tratamentos sobre a pO_2 sanguíneo. Porém, com 24h pós-eclosão houve diferença significativa, sendo o tratamento controle com o dobro do valor encontrado em comparação ao tratamento CO_2 .

A pCO_2 foi significativamente influenciada pelos tratamentos aos 16 dias e 24h pós-eclosão. Aves provenientes do ambiente com CO_2 na incubação apresentaram, aos 16 dias e 24h pós-eclosão, diferença de 10.4 mmHg e 10.3 mmHg, respectivamente. O hematócrito foi significativamente influenciado pelos tratamentos, com valores de 17.8% no grupo CO_2 e de 22% no controle. No entanto, 24h pós-eclosão, verificou-se diferença significativa nos valores de hematócrito 22.7%, controle e 13.5%, CO_2 . Não foram observadas diferenças significativas para hemoglobina entre os tratamentos, durante o período de incubação.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que as aves durante o desenvolvimento embrionário ativaram mecanismos que auxiliaram na manutenção da homeostase. Dentre esses mecanismos, o desenvolvimento da membrana corioalantóide (maior neovascularização). Segundo DAWES e SIMKISS (1969), a maior vascularização pode auxiliar nas trocas gasosas e reabsorção de Ca da casca e estímulo das funções renais na formação de bicarbonato para o tamponamento do sangue frente às alterações dos variáveis sanguíneos e a aceleração do desenvolvimento (menor tempo para o nascimento) causado pela hipercapnia, conforme descrito na literatura (DE SMIT et al., 2006; BRUGGEMAN et al., 2007; TONA et al., 2007, WILLEMSSEN, et al., 2008).

Tabela 1 – Efeito da adição gradual da concentração de CO₂ até 1,5% nos 10 primeiros dias de incubação de frangos de corte Cobb 500 sobre os variáveis sanguíneos pH, pressão parcial de O₂ (pO₂), pressão parcial CO₂ (pCO₂), Hematócrito e Hemoglobina durante a incubação e 24h pós eclosão

Variáveis sanguíneas	Idade embrionária (dias)							
	13		16		18		24h pós – eclosão ¹	
	Controle ²	CO ₂	Controle	CO ₂	Controle	CO ₂	Controle	CO ₂
pH	7.51 ± 0.2	7.46 ± 0.2	7.45 ± 0.02	7.49 ± 0.02	7.40 ^b ± 0.02	7.48 ^a ± 0.02	7.50 ^a ± 0.3	7.37 ^b ± 0.4
pO ₂ (mmHg)	39.4 ± 5.1	26.7 ± 4.7	12.7 ± 1,0	13.5 ± 1,0	11.2 ± 0.7	13.0 ± 0.7	73.0 ^a ± 7.1	36.0 ^b ± 8.7
pCO ₂ (mmHg)	29.0 ± 2.6	31,1 ± 2.4	53.4 ^a ± 2.8	43.0 ^b ± 2.6	54.3 ± 4.0	47.4 ± 4.0	22.9 ^b ± 1,4	33.2 ^a ± 1.8
Hct (%)	22.0 ^a ± 0.9	17.8 ^b ± 0.8	24.8 ± 1,4	24.0 ± 1.2	25.5 ± 1.1	26.6 ± 1.1	22.7 ^a ± 1,0	13.5 ^b ± 1.2
Hb (g/dL)	6.9 ± 0.5	6.1 ± 0.5	8.9 ± 0.4	8.0 ± 0.5	8.7 ± 0.4	9.1 ± 0.4	7.3 ± 0.5	5.4 ± 0.7

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na linha, em cada idade, diferem entre si ($P < 0.05$).

¹ Os pontos de um dia idade foram canulados na artéria femoral e a coleta de sangue foi realizada 24h após a cirurgia (n=6).

² Sem adição de CO₂ durante a incubação.

3.3. Parâmetros zootécnicos

Não houve efeito dos tratamentos sobre o peso do embrião no 13º e 16 dias de incubação (Tabela 2). No entanto, no 18º dia, os embriões do tratamento controle apresentaram maior peso em comparação ao tratamento com 1,5% de CO₂. Esses resultados estão de acordo com os observados por EVERAERT et al., (2007), que avaliaram o efeito de 4% de CO₂ a partir do 10º dia de incubação até o 18º e reportaram aumento significativo no peso do embrião aos 18 dias no grupo controle, mas ao nascimento não verificaram diferença entre os tratamentos. A fase de exposição e a concentração influenciam nas respostas metabólicas das aves.

Tabela 2 – Efeito da adição gradual da concentração de CO₂ até 1,5% nos 10 primeiros dias de incubação de frangos de corte Cobb 500 sobre o peso do embrião e o peso relativo na idade embrionária e pós-eclosão

Idade (DE)	Peso do embrião (g)		Peso relativo do embrião ³ (%)	
	Controle ¹	CO ₂ ²	Controle	CO ₂
13	11.61 ± 0.20	11.84 ± 0.21	19.44 ± 0.39	19.65 ± 0.41
16	21,40 ± 0.31	21.70 ± 0.34	36.32 ± 0.60	36.15 ± 0.67
18	31.60 ^a ± 0.40	29.30 ^b ± 0.29	53.63 ^a ± 0.73	50.98 ^b ± 0.53

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na linha, em cada idade, diferem entre si ($P < 0.05$).

¹ Sem adição de CO₂; ² Adição gradual de 1,5% de CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação.

³ (peso embrião/peso inicial do ovo) x100.

As condições de incubação influenciaram os resultados zootécnicos e a qualidade dos pintos (Tabela 3). No tratamento CO₂ o tempo para os nascimentos foi reduzido em 3 horas em comparação ao tratamento controle. A exposição ao CO₂ na primeira fase de incubação afetou negativamente a eclodibilidade de ovos ($P < 0.05$). Os resultados encontrados nesta pesquisa são coerentes com os da literatura que relatam que o uso de altas concentrações de CO₂ ≥ 1% na primeira fase de incubação (240h) estimula o desenvolvimento embrionário e a eclosão precoce (HOGG, 1997; DE SMIT et al., 2006, 2008; EVERAERT et al., 2007).

O comprimento dos pintos, ao nascimento, foi superior nas aves expostas a 1,5% de CO₂, com valores médios de 19.5cm no tratamento com CO₂ e 18.0cm no tratamento controle. O peso absoluto dos pintos diferiu entre os tratamentos ($P < 0.05$), com maior peso para as aves do grupo controle. O metabolismo embrionário foi

alterado nas aves expostas ao CO₂, menor tempo de incubação, e afetou negativamente o desenvolvimento das aves, menor peso do pinto. De acordo com OVIEDO-RONDÓN e MURAKAMI (1998) o desenvolvimento embrionário é dependente das condições de incubação. A alteração no suprimento de oxigênio, por exemplo, repercutiu na resposta dos embriões com maior afinidade ao oxigênio, menor atividade metabólica (maior tempo de incubação) e menor crescimento e peso. O peso do pintainho é altamente correlacionado com o comprimento (HILL, 2006). Este fato está associado com a utilização da gema. Sugere-se que neste estudo o metabolismo das aves foi intenso durante o período de desenvolvimento embrionário, principalmente nas primeiras 240 horas e com a exposição CO₂, o que afetou o desenvolvimento das aves, visto pelo menor tempo para o nascimento e menor peso das aves no tratamento com CO₂. Esses resultados estão de acordo com os observados por (EVERAERT et al., 2010). Verifica-se no presente estudo a necessidade de mais pesquisas para avaliar se os efeitos da incubação com CO₂ impactarão no desempenho das aves e quais as respostas metabólicas nas condições adversas de criação.

Tabela 3 - Efeito da adição gradual da concentração de CO₂ até 1,5% nos 10 primeiros dias de incubação de frangos de corte Cobb 500 sobre o nascimento, a eclosão, eclodibilidade, comprimento e peso do pinto.

Variáveis de incubação	Tratamentos ¹	
	Controle	CO ₂
Nascimento (h)	488.0 ^a ± 1,0	485.0 ^b ± 1,0
Eclosão (%)	79.2 ± 1.2	78.3 ± 1,4
Eclodibilidade (%)	91,0 ^a ± 1,0	87.5 ^b ± 1.2
Comprimento (cm)	18.0 ^b ± 0.4	19.5 ^a ± 0.5
Peso do pinto (g)	47.2 ^a ± 0.2	46.5 ^b ± 0.2

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes na linha, em cada idade, diferem entre si (P<0.05).

¹ Controle: sem adição de CO₂; Grupo CO₂: adição gradual de 1,5% de CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação.

4. CONCLUSÃO

A exposição gradual de 1,5% de CO₂ nas primeiras 240 horas de incubação aumenta a vascularização da membrana corioalantóide e acelera o desenvolvimento embrionário pelo menor período de incubação e menor peso ao nascimento.

5. REFERÊNCIAS

BAVIS, R. W.; KILGORE, D. L. Effects of embryonic CO₂ exposure on the adult ventilatory response in quail: does gender matter? **Respiratory Physiology**, 126:183–199, 2001.

BRUGGEMAN, V.; SMIT, L. DE; TONA, K.; EVERAERT, N.; WITTERS, A.; DEBONE, M.; DEGRAEVE, P.; GARAIN, P.; DECUYPERE, E. Changes in albumen pH due to higher CO₂ concentrations during the first ten days of incubation. *World's Poultry Science Association (WSPA), Beekbergen, Netherlands, 12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 2006.*

BRUGGEMAN, V., WITTERS, A., DE SMIT, L., DEBONNE, M., EVERAERT, N., KAMERS, B., ONAGBESAN, O. M., DEGRAEVE, P.; DECUYPERE, E. Acid-base balance in chicken embryo (*Gallus domesticus*) incubated under high CO₂ concentrations during the first ten days of incubation. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, 159:147-154, 2007.

DAWES, C., SIMKISS, K. The acid–base status of the blood of the developing chick embryo. **Journal of Experimental Biology**, 50, 79–86, 1969.

EVERAERT, N.; KAMERS, B.; WITTERS, A.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.;

DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Effect of Four Percent Carbon Dioxide During the Second Half of Incubation on Embryonic Development, Hatching Parameters and Posthatch Growth. **Poultry Science**, 86:1372–1379, 2007.

EVERAERT, N., DEBONNE, M., WILLEMSSEN, H., WITTERS, A., KAMERS, B., DE BAERDEMAEKER, J., DECUYPERE, E. e BRUGGEMAN, V. Interaction between ascites susceptibility and CO₂ during the second half of incubation of two broiler lines. The effect on embryonic development and on the hatching process. **British Poultry Science**, 51:335–343, 2010.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; DEBONNE, M.; TONA, J. K.; KAMERS, B.; EVERAERT, N. The effect of nonventilation during early incubation on embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. **Poultry Science**, 87:551-560, 2008.

DE SMIT, L.; BRUGGEMAN, V.; TONA, J. K.; DEBONNE, M.; ONAGBESAN, O.; ARCKENS, L.; DE BAERDEMAEKER, J.; DECUYPERE, E. Embryonic developmental plasticity of the chick: increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 145:166-175, 2006.

DUSSEAU, J. W.; HUTCHINS, P. M. Microvascular Responses to Chronic Hypoxia by the Chick Chorioallantoic Membrane - a Morphometric Analysis. **Microvascular Research** 37: 138-147, 1989.

HOGG, A. Single stage incubation trials. **Poultry and Avian Biology Reviews**, 8:168, 1997.

HILL, D. Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality. **Avian and Poultry Biology Reviews**, 12:188. 2001.

IRIE, H., TATSUMI, T., TAKAMIYA, M., ZEN, K., TAKAHASHI, T., AZUMA, A., TATEISHI, K., NOMURA, T., HAYASHI, H., NAKAJIMA, N. Carbon dioxide-rich water bathing enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb via mobilization of endothelial progenitor cells and activation of NO-Cgmp system. **Circulation** 111: 1523-1529, 2005.

KROETZ NETO, F. L. Eclodibilidade, qualidade dos neonatos e desempenho pós natal de frangos de corte originados de ovos embrionados submetidos a altos teores de CO₂ no período inicial de incubação. 103 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, Faculdade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2010.

MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN BRAND, H. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: A review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 12 3:137 – 148, 2010.

OVIEDO-RONDÓN, E. O.; MURAKAMI, A. E. Fatores que interferem no desenvolvimento embrionário e seus efeitos nos problemas metabólicos pós-eclosão em frangos de corte. **Acta Scientiarum**, 20 3:373 – 382, 1998.

OWEN, J. Principles and problems of incubator design. In: Avian Incubation. S.G. Tullet, ed. Butter-worth-Heinemann, London, UK. p. 205-224, 1991.

PARENTE, L. M. L.; JÚNIOR, R. S. L.; TRESVENZOL, L. M. F.; MARINA, M. C.; PAULA, J. R.; PAULO, N. M. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2012.

PIIPER, J.; TAZAWA, H.; AR, A.; RAHN, H. Analysis of chorioallantoic gás exchange in the chick embryo. **Respiratory Physiology**, 39, 273–284, 1980.

ROMANOFF, R. The avian embryo. Macmillan. New York, 1960.

TAYLOR, L. W.; KREUTZIGER, G. O. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability. 2. Effects of carbon dioxide and oxygen levels during the period of the fifth through the eighth days of incubation. **Poultry Science**, 44: 98-106, 1965.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G. C. Incubation Physiology. In **Sturkie's Avian Physiology**. Academic Press, San Diego, p.617-634, 2000.

TONA, K.; ONAGBESAN, O. M.; JEGO, Y.; KAMERS, B.; DECUYPERE, E. BRUGGEMAN, V. Comparison of embryo physiological parameters during incubation, chick quality, and growth performance of three lines of broiler breeders differing in genetic composition and growth rate. **Poultry Science**, 83:507–513, 2004.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.; BRUGGEMAN, V.; DESMIT, L.; FIGUEIRED, D.; DECUYPERE, E. Nonventilation during early incubation in combination with dexamethasone administration during late incubation :1.Effects on physiological hormone levels, incubation duration and hatching events. **Domestic Animal Endocrinology**, 33:32-46, 2007.

VANGOLDE, J., MULDER, T.; BLANCO, C. E. Changes in mean chorioallantoic artery blood flow and heart rate produced by hypoxia in the developing chick embryo. **Pediatric Research**, 42: 293-298, 1997.

VERHOELST, E.; KETELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; VILLAMOR, E.; DECUYPERE, E.; BAERDEMAEKER, J. Development of a fast, objective, quantitative methodology to monitor angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane during development. **The International journal of developmental biology**, 55: 85-92, 2011.

WILLEMSEN, H; TONA, K.; BRUGGEMAN, V.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of high CO₂ level during early incubation and late incubation in ovo dexamethasone injection on perinatal embryonic parameters and post-hatch growth of broilers. **British Poultry Science**, 49:222-231, 2008.

WILLIAMS, B.R.; KILGORE, D.L. Jr. Ontogenetic modification of the hypercapnic ventilatory response in the zebra finch. **Respiratory Physiology**, 90:125–134, 1992.

WITTERS, A. Factors affecting the impact of hypercapnia during early egg incubation and its effects on pre- and postnatal physiological parameters of broilers [dissertation]. Katholieke Universiteit Leuven, 2009.