

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VITAMINA C INTRA-OVO E ESTRESSE POR CALOR
NA INCUBAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE**

Sarah Sgavioli

Zootecnista

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VITAMINA C INTRA-OVO E ESTRESSE POR CALOR
NA ICUBAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE**

Sarah Sgavioli

Orientador: Prof. Dra. Isabel Cristina Boleli

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

Sgavioli, Sarah
S523v Vitamina C intra-ovo e estresse por calor na incubação de frangos
de corte / Sarah Sgavioli. -- Jaboticabal, 2013
iv, 196 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Isabel Cristina Boleli
Banca examinadora: Antônio Carlos Laurentiz, Lúcio Francelino
Araújo, Otto Mack Junqueira, Silvana Martinez Baraldi-Artoni
Bibliografia

1. Aves - bem-estar. 2. Frangos de corte – estresse por calor. 3.
Incubação – vitamina C. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.5:636.08

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SARAH SGAVIOLI – nascida em 18 de junho de 1984, na cidade de Itapuí (SP), filha de Mirko José Sgavioli e Denise Bonateli Sgavioli, ingressou no curso de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp - Câmpus de Jaboticabal em março de 2003, graduando-se em janeiro de 2008. Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp - Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2010, no mês de março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado na mesma Instituição, sob orientação da Profa. Dra. Isabel Cristina Boleli. Teve como mestre em todos os momentos o professor Dr. Otto Mack Junqueira, o qual foi tido como exemplo.

“A bondade cresce por meio do exercício, tornando-se um hábito de vida ou desaparecendo por falta de ação. Em tudo e em todos jazendo a presença de Deus, é necessário saber descobrir neles a bondade que expressa a sua essência, a sua origem, igualmente presente em todas as vidas.”

(Joana de Ângelis)

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre.”

(Albert Einstein)

“É melhor ser alegre que ser triste
Alegria é a melhor coisa que existe
É assim como a luz no coração...”

(Vinícius de Moraes)

OFEREÇO

Ao meu filho Gabriel

Pelo brilho de seus olhos, pelo seu sorriso, por me fazer acreditar que sou capaz!

Por me fazer acreditar que existem pessoas e pessoas.

Você me faz sorrir, parte da minha vida, razão do meu viver, alegria dos meus dias.

Nunca imaginei que seria tão importante em minha vida.

Posso dizer que só agora sou feliz.

DEDICO

À professora Isabel Cristina Boleli, pela paciência nos momentos difíceis da condução dos experimentos, por ter me passado muito conhecimento, conhecimento este que no começo por muitas vezes acreditei que não seria capaz de absorver, mas devido à sua determinação, conseguiu me fazer uma pessoa mais capacitada após este doutorado.

À minha família, em especial a minha mãe Denise e ao meu irmão Danilo, por terem me ajudado a vencer esta etapa da minha vida.

A Deus, por ter me dado saúde, inteligência, força, pessoas com quem aprendi muito e acima de tudo por ter me dado fé para passar por meus obstáculos e nunca pensar em desanimar e sempre lembrar que existe um Deus que tudo pode e tudo faz para aquele que confia nele.

À Fapesp por ter acreditado em meu potencial e no da minha orientadora, e por ter considerado meu projeto de pesquisa relevante para a avicultura, pois de nada adiantaria ter o apoio de todos aqui citados, se não houvesse o apoio financeiro da Fapesp. Amo o que eu faço, mas sem você Fapesp seria impossível realizar este sonho.

À dona Maria e toda sua família (senhor Marinho e Fernanda) por terem me ajudado a cuidar do Gabriel em momentos de necessidade e por sempre estarem ao meu lado quando precisei.

AGRADECIMENTOS

À Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela oportunidade oferecida para a realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (proc. nº 2010/01923-7) e pelo auxílio pesquisa concedidos (2010/15280-0).

Ao Prof. Otto, com quem tive o prazer de realizar minhas iniciações científicas e meu mestrado, por ter me ensinado não só sobre avicultura, mas por todo o carinho e apoio emocional, por aquela sopa quando fiquei doente, pelas conversas e conselhos, por me permitir conviver com sua família e aproveitar de momentos felizes e de descontração, com certeza serei sua eterna orientanda e o senhor para mim será meu eterno segundo pai.

Aos funcionários do Setor de Avicultura e Fábrica de Ração: Robson, Vicente, “seu” Izildo, Batista, Helinho, pela ajuda e dedicação durante todo o período experimental.

À banca da qualificação, Profas. Dras. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, Lizandra Amoroso, Kenia Cardoso Bicego e Vanessa Karla Silva, pelas colaborações.

À banca examinadora, Profs. Dros. Silvana Martinez Baraldi-Artoni, Otto Mack Junqueira, Antônio Carlos de Laurentiz e Lúcio Francelino Araújo, pelas considerações.

Aos professores de estatística Dr^o Euclides e Dr^o João Ademir, pela disponibilidade e competência.

Aos amigos de trabalho, Carla, Diana, Vitor, João, Viviane, Michaela, Vanessa, Viviane, Mariana, Gretchem, Anemia, Tocha, Black, Isabella, Laka, Eduardo, Tamiris, Evandro, Gisele, Pega-leve e Rafael, por me ajudarem a superar minhas limitações.

À minha amiga Ariella, de Itapuí, por todos os momentos inesquecíveis e pela felicidade compartilhada.

Ao centro de convivência infantil, por me ajudar a educar meu filho e cuidar dele durante o dia para que eu pudesse desenvolver minhas atividades com tranquilidade.

Ao senhor Orandir, pelo auxílio no preparo das amostras histológicas.

Ao professor Dr^o. Mario Jefferson Quintada Louzada e sua aluna de mestrado Bruna, por terem me auxiliado nas análises ósseas.

Ao meu sobrinho Pedro e a minha cunhada Daniela, por me proporcionarem momentos de felicidade em minhas horas de descontração.

À minha tia Rita e à minha prima Laurinha, por terem compartilhado comigo momentos de dificuldade e terem feito estes momentos mais leves e fáceis de superar.

Ao Juliano, que além de ter me dado o maior presente de minha vida, meu filho, me ajudou a cuidar dele durante todos os experimentos.

São pessoas assim, tão maravilhosas, que me ajudaram a superar meus obstáculos e minhas dificuldades.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Enfim, agradeço à todos que estão ou que estiveram em minha vida durante este período, agradeço até mesmo às pessoas que me fizeram passar por grandes dores, pois com cada decepção, cresci e me fortaleci.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	i
RESUMO.....	i
ABSTRACT	i
CAPITULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução	1
2. Estresse térmico na criação de frangos de corte	3
3. Manipulação térmica na incubação	7
4. Vitamina C x estresse por calor.....	14
5. Objetivos	17
6. Referências Bibliográficas	17
FASE DE INCUBAÇÃO.....	34
CAPÍTULO 2. INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM OVOS INCUBADOS SOB ESTRESSE POR CALOR: PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO E QUALIDADE DOS PINTOS	
Resumo.....	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos	36
3. Resultados	38
4. Discussão.....	48
5. Conclusões.....	52
6. Referências Bibliográficas	52
CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE VITAMINA C INTRA OVO SOBRE A ABSORÇÃO MINERAL DA CASCA DO OVO, MORTALIDADE EMBRIONÁRIA E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS EM PINTOS INCUBADOS EM TEMPERATURA QUENTE	
Resumo.....	57
1. Introdução	58
2. Material e Métodos	60
3. Resultados	62
4. Discussão.....	71

5. Conclusões.....	73
6. Referências Bibliográficas	74
CAPÍTULO 4 – INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO INTRA OVO ESTIMULA PROLIFERAÇÃO CELULAR DA BURSA DE FABRICIUS E LINFOCITOSE DURANTE A INCUBAÇÃO	
Resumo.....	77
1. Introdução	78
2. Material e Métodos	79
3. Resultados	83
4. Discussão.....	90
5. Conclusões.....	93
6. Referências Bibliográficas	93
FASE DE CRIAÇÃO.....	
	98
CAPÍTULO 5. EFEITO DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DA ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO	
Resumo.....	98
1. Introdução	99
2. Material e Métodos	100
3. Resultados	104
4. Discussão.....	108
5. Conclusões.....	109
6. Referências Bibliográficas	110
CAPÍTULO 6 – EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB CALOR	
Resumo.....	114
1. Introdução	116
2. Material e Métodos	117
3. Resultados	123

4. Discussão.....	134
5. Conclusões.....	134
6. Referências Bibliográficas	138

CAPÍTULO 7 – INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

Resumo.....	143
1. Introdução	145
2. Material e Métodos	146
3. Resultados	151
4. Discussão.....	163
5. Conclusões.....	166
6. Referências Bibliográficas	166

CAPÍTULO 8 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DO ESTRESSE POR CALOR NA INCUBAÇÃO E NA CRIAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO DE FRANGOS DE CORTE

Resumo.....	173
1. Introdução	174
2. Material e Métodos	175
3. Resultados	179
4. Discussão.....	189
5. Conclusões.....	193
6. Referências Bibliográficas	193

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM OVOS INCUBADOS SOB ESTRESSE POR CALOR: PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO E QUALIDADE DOS PINTOS

Tabela 1. Efeitos da injeção de ácido ascórbico <i>in ovo</i> , das temperaturas de incubação e dos dias de incubação sobre a temperatura da casca dos ovos.....	41
Tabela 2. Desdobramento da interação entre temperaturas de incubação e dias de incubação para a temperatura da casca dos ovos.	42
Tabela 3. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico <i>in ovo</i> e temperaturas de incubação para a temperatura da casca dos ovos durante a incubação..	42
Tabela 4. Efeitos da injeção de ácido ascórbico <i>in ovo</i> e das temperaturas de incubação sobre a perda de massa e a condutância da casca dos ovos e a temperatura da superfície corporal dos pintainhos na eclosão.....	44
Tabela 5. Desdobramento da interação entre a injeção de ácido ascórbico <i>in ovo</i> e as temperaturas de incubação para a temperatura da superfície corporal dos pintainhos pós-eclosão.....	44
Tabela 6. Efeitos da injeção de ácido ascórbico <i>in ovo</i> e das temperaturas de incubação sobre a taxa de eclosão, mortalidade embrionária e duração da incubação.	45
Tabela 7. Efeitos da injeção de ácido ascórbico <i>in ovo</i> e das temperaturas de incubação sobre a qualidade dos pintainhos machos na eclosão.....	47

CAPÍTULO 3. EFEITOS DA INJEÇÃO DE VITAMINA C INTRA OVO SOBRE A ABSORÇÃO MINERAL DA CASCA DO OVO, MORTALIDADE EMBRIONÁRIA E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS EM PINTOS INCUBADOS EM TEMPERATURA QUENTE

Tabela 1. Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre os parâmetros eritrocitários de pintos de corte	62
--	----

Tabela 2. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico e temperatura de incubação para contagem de células vermelhas (RBC ¹ , células/mm ³) de pintos de corte.....	64
Tabela 3. Desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para HCT ¹ (%) de pintos de corte.....	65
Tabela 4. Desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para HGB ¹ x(g/dL) de pintos de corte.....	66
Tabela 5. Efeitos das porcentagens de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre gases sanguíneos de pintos de corte.	67
Tabela 6. Desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para pH sanguíneo de pintos de corte.....	68
Tabela 7. Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre íons Na ⁺ e K ⁺ , Cai e glicose no sangue de pintos de corte.....	69
Tabela 8. Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre os parâmetros de qualidade da casca do ovo ao final da incubação.	70
Tabela 9. Desdobramento da interação entre tratamentos e temperaturas para a porcentagem de fósforo na casca dos ovos ao final da incubação.....	71

CAPÍTULO 4. INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO INTRA OVO ESTIMULA PROLIFERAÇÃO CELULAR DA BURSA DE FABRICIUS E LEUCOCITOSE DURANTE A INCUBAÇÃO

Tabela 1. Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas sobre o peso e índice bursal ((peso bursa:peso corporal) x 100) de pintos recém-eclodidos machos.....	83
Tabela 2. Efeito da injeção de ácido ascórbico (AA) e das temperaturas de incubação sobre a área dos folículos, a espessura do epitélio interno e da parede e a proliferação celular folicular da bursa de pintos machos recém-eclodidos.....	84

Tabela 3. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico (AA) e temperaturas de incubação para a área (μm^2) ¹ do folículo da bursa de pintos machos recém-eclodidos.....	85
Tabela 4. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico (AA) e temperaturas de incubação para a espessura do epitélio interno (μm) ¹ da bursa de pintos machos recém-eclodidos..	86
Tabela 5. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para a espessura da parede (μm) ¹ da bursa..	87
Tabela 6. Efeito da injeção de ácido ascórbico (AA) e das temperaturas de incubação sobre o leucograma, de pintos recém-eclodidos machos.....	89

CAPÍTULO 5. EFEITO DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DA ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

Tabela 1. Temperatura ambiente durante todo o período de criação.....	101
Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).	102
Tabela 3. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 1 a 21 dias de idade de frangos de corte.	104
Tabela 4. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 21 a 42 dias de idade de frangos de corte.	105
Tabela 5. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 1 a 42 dias de idade de frangos de corte.	105
Tabela 6. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o rendimento de carcaça e partes de frangos de corte aos 42 dias de idade.	107

CAPÍTULO 6 – EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB CALOR

Tabela 1. Temperatura ambiente durante todo o período de criação.....	119
Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).	120
Tabela 3. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a temperatura da superfície corporal e retal de frangos de corte aos 41 dias de idade.	123
Tabela 4. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 1 a 42 dias de idade de frangos de corte.	124
Tabela 5. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre os parâmetros sanguíneos de frangos de corte aos 41 dias de idade.	126
Tabela 6. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre gases sanguíneos de frangos de corte aos 41 dias de idade.	128
Tabela 7. Desdobramento das interações entre os tratamentos na incubação e as temperaturas na criação para o pH sanguíneo de frangos de corte aos 41 dias de idade.	129
Tabela 8. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre íons Na ⁺ e K ⁺ , Ca ⁱ e glicose no sangue de frangos de corte aos 41 dias de idade.	130
Tabela 9. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o leucograma de frangos de corte aos 41 dias de idade.	132
Tabela 10. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o leucograma de frangos de corte aos 41 dias de idade.	133

CAPÍTULO 7. – INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

Tabela 1. Temperatura ambiente preconizada durante todo o período de criação.....	148
Tabela 2. Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).	149
Tabela 3. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o comprimento, largura e peso do fêmur e do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.....	155
Tabela 4. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a composição mineral, área, densidade mineral total e da epífise proximal, diáfise e epífise distal do fêmur de frangos de corte aos 42 dias de idade.	156
Tabela 5. Desdobramento das interações entre os tratamentos na incubação e as temperaturas na criação para a densidade mineral da diáfise do fêmur de frangos de corte aos 42 dias de idade.	157
Tabela 6. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a composição mineral, área, densidade mineral total e da epífise proximal, diáfise e epífise distal do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.	158
Tabela 7. Desdobramento das interações entre os tratamentos na incubação e as temperaturas na criação para a densidade mineral da epífise proximal e epífise distal do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.	159
Tabela 8. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a porcentagem de cálcio, fósforo e cinzas do fêmur e do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.	161
Tabela 9. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a resistência do fêmur de frangos de corte aos 42 dias de idade.....	162
Tabela 10. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a resistência do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.	163

CAPÍTULO 8. EFEITOS DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DO ESTRESSE POR CALOR NA INCUBAÇÃO E NA CRIAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO DE FRANGOS DE CORTE

Tabela 1. Temperatura ambiente preconizada durante todo o período de criação.....	177
Tabela 2. Efeitos dos tratamentos na incubação (TI), das temperaturas na criação (TC), da idade (ID) e dos períodos de avaliação (PA), sobre o comportamento de frangos de corte.....	182

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Interação entre ambiente e comportamento e atividade do frango de corte. 8

Figura 2. Indução epigenética perinatal por fatores ambientais. 11

CAPÍTULO 2. INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM OVOS INCUBADOS SOB ESTRESSE POR CALOR: PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO E QUALIDADE DOS PINTOS

Figura 1. Temperatura da casca dos ovos de todos os tratamentos nas fases embrionária (01-09 dias) e fetal (10-18 dias) de incubação. a-b: médias com letras distintas diferem significativamente ($P \leq 0,05$). 39

Figura 2. Temperatura da casca de ovos injetados ou não com ácido ascórbico e incubados sob 37,5°C e 39°C, de acordo com o dia de incubação. Linhas horizontais correspondem às temperaturas de incubação. Cont: controle, AA0, AA2, AA4 e AA6: injeção de 0, 2, 4 e 6% de ácido ascórbico. 40

CAPÍTULO 3. EFEITOS DA INJEÇÃO DE VITAMINA C INTRA OVO SOBRE A ABSORÇÃO MINERAL DA CASCA DO OVO, MORTALIDADE EMBRIONÁRIA E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS EM PINTOS INCUBADOS EM TEMPERATURA QUENTE

Figura 1. RBC de pintos de ovos incubados sob temperatura termoneutra (TT) e quente (TQ) em função dos níveis de ácido ascórbico injetados nos ovos..... 64

Figura 2. pH sanguíneo de pintos de ovos incubados à temperatura quente em função dos níveis de ácido ascórbico injetados nos ovos..... 68

Figura 3. Fósforo na casca dos ovos ao final da incubação à temperatura quente em função dos níveis de ácido ascórbico injetados nos ovos..... 71

CAPÍTULO 4. INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO INTRA OVO ESTIMULA PROLIFERAÇÃO CELULAR DA BURSA DE FABRICIUS E LEUCOCITOSE DURANTE A INCUBAÇÃO

- Figura 1. Fotomicrografia de cultura de células não induzidas (A) e induzidas à mitose (B), de secções histológicas da Bursa de Fabricius de pintainhos recém-eclodidos, submetidas à técnica de marcação de células em mitose (PCNA). 82
- Figura 2. Equações para o desenvolvimento da bursa. Proliferação (A), área dos folículos (B), altura do epitélio interno (C) e espessura da parede da bursa (D), em função das porcentagens de ácido ascórbico injetado intra ovo antes da incubação e das temperaturas de incubação..... 88
- Figura 3. Linfócitos em função das porcentagens de ácido ascórbico injetados intra ovo antes da incubação. 90

CAPÍTULO 7. – INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

- Figura 1. Ganho de peso dos frangos aos 42 dias de idade (A) e consumo de ração de 1-42 dias de idade (B), de acordo com a temperatura de criação. a-c: médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 152

CAPÍTULO 8. EFEITOS DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DO ESTRESSE POR CALOR NA INCUBAÇÃO E NA CRIAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO DE FRANGOS DE CORTE

- Figura 1. Comportamento ingestivo (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade. a-c: médias com letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$). 182
- Figura 2. Comportamento ingestivo (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde. a-b: médias com letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$). 183
- Figura 3. Comportamento ingestivo de água (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e

minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os dias respectivamente ($P < 0,05$).	183
Figura 4. Comportamento ingestivo de água (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	184
Figura 5. Comportamento ingestivo de ração (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	184
Figura 6. Comportamento ingestivo (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde. a-b: médias com letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$).	185
Figura 7. Comportamento ingestivo de ração (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	185
Figura 8. Comportamento de repouso (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os dias respectivamente ($P < 0,05$).	186
Figura 9. Comportamento exploratório de frangos de corte (%) com 7, 14 e 35 dias de idade, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os dias respectivamente ($P < 0,05$).	186
Figura 10. Comportamento exploratório (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	187
Figura 11. Comportamento exploratório (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas	

diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	187
Figura 12. Comportamento de conforto (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	188
Figura 13. Comportamento de conforto (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).	188
Figura 14. Comportamento de dissipação de calor (CDC) e de aquecimento (CAQ) (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade	189

VITAMINA C INTRA-OVO E ESTRESSE POR CALOR NA INCUBAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE

RESUMO – Estresse calórico afeta o desempenho e as características morfofuncionais dos frangos. Manipulação das condições ambientais na fase fetal tem se mostrado efetiva na indução de características adaptativas ao calor na incubação. Manipulação nutricional da ave com anti-estressores também tem sido apontado como potencial indutor de adaptações fisiológicas ao calor na fase de criação. O presente estudo analisou os efeitos do estresse por calor na incubação associado ou não à injeção de ácido ascórbico (AA) intra ovo sobre características morfofuncionais dos pintos na eclosão e sobre seu desempenho pós-eclosão e características morfofuncionais à idade de abate quando criados sob temperatura fria, termoneutra ou quente. No Capítulo 1 apresentamos uma abordagem teórica sobre o tema. Nos Capítulos 2, 3 e 4 são abordados os efeitos da alta temperatura de incubação associada ou não com diferentes porcentagens de AA injetado intra ovo antes da incubação sobre parâmetros de incubação (temperatura da casca dos ovos, perda de massa dos ovos, eclodibilidade, mortalidade, condutância e qualidade dos pintos), hemodinâmica (eritrograma, leucograma e variáveis bioquímicas e gases) e desenvolvimento da bursa de Fabrício (peso, área medular e cortical dos folículos, espessura de epitélio e proliferação celular). Para isso, ovos férteis de matrizes de frangos de corte (Cobb) foram utilizados em delineamento experimental inteiramente casualizado 2x5 (temperatura de incubação: 37,5°C e 39°C; sem injeção de AA e injeção de 0%, 2%, 4% e 6% de AA). Os dados do Capítulo 2 mostram que as porcentagens de AA utilizadas afetaram a perda de calor por condução e a taxa de eclosão dos ovos, e que não minimizaram os efeitos da alta temperatura de incubação sobre o desenvolvimento hepático e cardíaco. No Capítulo 3, os dados mostram que manipulação nutricional do ovo pode ser realizada antes da incubação, que o AA influencia a absorção de minerais da casca, e que injeção de 4% de vitamina C melhora o potencial de transporte de gases no sangue dos pintos oriundos de ovos incubados sob temperatura quente. No capítulo 4, os resultados mostram que a o AA age como imunomodulador com dose e temperatura-dependentes e que os níveis de 4% e 6% de AA estimulam o desenvolvimento da bursa in ovo e a linfocitose. Nos Capítulos 5, 6 e 7 é analisado os efeitos da alta temperatura de incubação associada ou não com a injeção de 6% de AA intra ovo sobre o desempenho e hemodinâmica, características ósseas (peso, comprimento, densidade mineral, resistência) e comportamento, respectivamente, de frangos criados sobre temperatura fria, termoneutra e quente de criação. Nesse caso, foi utilizado delineamento experimental 3x3 (incubação: 37,5°C; 39°C e 39°C + AA 6%; criação: temperaturas fria, termoneutra e quente). Capítulo 5, é verificado que incubação a 39°C com ou sem injeção de AA não influenciou o desempenho de frangos criados sob temperatura fria, termoneutra ou quente. Frangos criados sob temperatura quente consumiram menos ração e ganharam menos peso, mas não sofreram alteração no rendimento de carcaça e corte. O Capítulo 6 mostra que o AA e hipertermia apresentaram efeito estimulador sobre o sistema imune celular na incubação e na criação, respectivamente. Alta temperatura de incubação, associada ou não à injeção de AA pré-incubação, induziu adaptações no balanço eletrolítico das aves, não favorecendo a ocorrência da alcalose respiratória em frangos criados

sob temperatura quente. O capítulo 7 mostra que alta temperatura de incubação associada ou não ao AA melhorou a densidade mineral dos fêmures e das tíbias dos frangos criados sob temperatura termoneutra e fria, respectivamente, mas não evitou a redução no crescimento, mineralização e resistência desses ossos da perna causada pela temperatura quente de criação, a qual deve ter sido resultante do menor consumo de ração. Em suma, o presente estudo mostra que o AA possui efeito estimulador do sistema imune das aves. Além disso, a alta temperatura de incubação minimizou os efeitos da alta temperatura de criação, com relação aos parâmetros sanguíneos analisados. No entanto, ambos os manejos não minimizaram os efeitos da alta temperatura de criação sobre as características de desempenho das aves.

Palavras-chaves: adaptação epigenética, estresse térmico, imunidade, pintos, vitamina C

VITAMIN C INTRA-EGG AND HEAT STRESS IN INCUBATION ON BROILERS

ABSTRACT – Heat stress affects the performance and morphofunctional characteristics of broilers. Manipulation of environmental conditions during the fetal period has been effective in the induction of adaptive traits in heat incubation. Nutritional manipulation of the bird with anti-stressors has also been touted as a potential inducer of physiological adaptations to heat in the growing phase. The present study examined the effects of heat stress on incubation with and without intra-egg injection of ascorbic acid (AA) on the morphofunctional characteristics of chicks at hatching and their post-hatch performance and morphofunctional characteristics at slaughter age when raised under cold, thermoneutral or hot temperatures. In Chapter 1 we present a theoretical approach to the topic. In Chapters 2, 3 and 4 the effects of high incubation temperature associated or not with different percentages of AA injected intra-egg before incubation on incubation parameters (temperature, eggshell, weight loss, hatchability, mortality, conductance and chick quality), hemodynamics (erythrocyte, leukocyte count and biochemical variables and gases) and development of the Fabricius bursa (weight, medullary and cortical area of the follicles, epithelial thickness and cell proliferation) are addressed. For this fertile Cobb broiler eggs were used in a completely randomized design 2x5 (incubation temperature: 37.5° C and 39° C, not injection of AA, and injection of 0%, 2%, 4% and 6% of AA). The data in Chapter 2 show that the percentage of AA used affected the heat loss by conduction and hatching rate of the eggs and did not minimize the effects of high temperature incubation on the heart and liver development. In Chapter 3, the data show that the egg nutritional manipulation can be performed before incubation, the AA influenced the absorption of minerals from the shell, and injecting 4% of ascorbic acid improves the potential for gas transport in the blood of chicks in eggs incubated under hot temperature. In Chapter 4, the results show that the AA acts as an immunomodulator with the dose and temperature-dependent levels of 4% and 6% AA stimulates the development of the bursa and lymphocytosis in ovo. In Chapters 5, 6 and 7 the effects of high incubation temperature associated or not with the injection of 6% AA intra-egg on performance and hemodynamics, bone characteristics (weight, length, mineral density, strength) and behavior respectively, from chickens raised in cold, thermoneutral and warm temperatures is analyzed. In this case, a 3x3 experimental design was used (incubation: 37.5° C, 39° C and 39° C; AA +6%; growth: cold, thermoneutral and hot temperatures). Chapter 5, it is found that incubation at 39° C with or without injection of AA did not influence the performance of broilers under cold, thermoneutral or hot temperatures. Broilers under hot temperature consumed less food and gained less weight but did not change in carcass yield and cut. Chapter 6 shows that AA and hyperthermia showed a stimulatory effect on the cellular immune system in incubation and growth, respectively. High incubation temperature, with or without preincubation AA injection induced adaptations in electrolyte balance, preventing the occurrence of respiratory alkalosis in broilers under hot temperature. Chapter 7 shows that high temperature incubation with or without AA improved the mineral density of the femurs and tibias of broilers raised under thermoneutral and cold, respectively, but did not prevent the reduction in growth, mineralization and strength of these leg bones caused by the hot growth temperature. This must have been due to lower feed intake. In summary, the present study shows that AA has a

stimulatory effect on the immune system of birds. Moreover, the high incubation temperature reduced the effects of high ambient temperature during growth, with respect to blood parameters analyzed, however, both management techniques did not minimize the effects of high environmental growth temperature on the performance characteristics of the birds.

Keywords: adaptation epigenetic, chickens, immunity, thermal stress, vitamin C

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira encontra-se entre as três maiores do mundo, por possuir alto grau tecnológico e produtividade, resultantes dos avanços nas áreas de manejo, melhoramento genético, nutrição e sanidade (OLIVEIRA et al., 2006). Tais avanços contribuíram de forma significativa para melhorias na eficiência alimentar, aumento do peso ao abate e diminuição do tempo de crescimento e idade para abate. No entanto, a seleção para produção não foi acompanhada de eficiência ou melhoria no processo de termorregulação, o que tornou as aves altamente sensíveis à temperaturas acima da termoneutra. Essa alta sensibilidade à temperatura quente na criação, também é acompanhada de alta sensibilidade durante o período de incubação, de modo que altas temperaturas podem causar prejuízos em ambos os períodos. Estresse por calor na incubação afeta a perda de massa, a condutância da casca (MORITA, 2009), a eclodibilidade e reduz a qualidade dos pintos na eclosão (HAGGER et al., 1986; FRENCH, 2000; BOLELI, 2008; LEKSRIOMPONG et al., 2007; WILLEMSSEN et al., 2010; BOLELI & QUEIROZ, 2012) afetando seu crescimento pós-eclosão (DECUYPERE, 1979; GEERS et al., 1982).

Na fase pós-eclosão, a temperatura ambiente é considerada o fator físico de maior efeito sobre o desempenho de frangos de corte, influenciando no consumo de ração (TEETER et al., 1984), no ganho de peso e na conversão alimentar. Aves sob estresse térmico apresentam modificações metabólicas expressas por alterações bioquímicas e hematológicas. Além disso, as aves submetidas ao estresse ambiental geralmente têm sua função imune reduzida (MILLER & QURESHI, 1991). Diante dessa situação, muitos estudos são desenvolvidos com o objetivo de estabelecer os prejuízos no desempenho das aves, conhecer as alterações fisiológicas decorrentes do estresse térmico, e desenvolver possíveis alternativas que minimizem o impacto do calor na criação de frangos de corte.

Atualmente, a ação de anti-estressores, como a vitamina C (ácido ascórbico), tem sido avaliada quanto à minimizar e/ou evitar os efeitos do estresse térmico. O ácido ascórbico participa de vários processos biológicos, por exemplo, atua como co-fator para a formação e manutenção do colágeno - essencial para a formação e manutenção do tecido conjuntivo, ossos e cartilagens, e tem ação imuno

estimulante, e sua suplementação na dieta melhora a resistência do animal às doenças (SPINOSA et al., 2002), e melhora a condição dos ossos da perna em aves estressadas (LESSON & SUMMERS, 2001).

A vitamina C por seu potente efeito antioxidante e pelo fato de sua síntese ser reduzida durante o estresse por calor, pode ser usada como importante estratégia nutricional para diminuir os efeitos negativos de altas temperaturas. Além disso, temperaturas elevadas impedem a absorção de vitamina C e, assim, aumentam sua exigência, e estimula o crescimento quando é adicionado á dietas (BRIGGS et al., 1994).

Características de desempenho e função imune de aves que sofreram estresse por calor são significativamente melhoradas com o aumento nas concentrações de vitamina C (PARDUE et al., 1985), vitamina E (EL-BOUSHY, 1988) e piridoxina (BLALOCK et al., 1984). Estes dados originaram as questões se pintos oriundos de ovos injetados com vitamina C e submetidos ou não a estresse por calor apresentariam maior imunidade e desempenho que os pintos oriundos de incubação a termoneutralidade sem injeção de ácido ascórbico, e se eles seriam mais resistentes ao estresse por calor durante a criação.

Os pesos de órgãos linfóides (POPE, 1991), a resposta de anticorpos aos antígenos estranhos (SCOTT et al., 1994), a relação heterófilo:linfócito (H:L) (PATTERSON & SIEGEL, 1998) e os ensaios de blastogênese de linfócitos (GOGAL et al., 1997), corticosterona no sangue, concentração total de proteína e glicose plasmática, hematócrito, glicogênio hepático e de índice hepático (MAXWELL et al., 1990) são parâmetros comumente utilizados para estimar a imunidade de aves. O peso de órgãos linfóides é facilmente medido e reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante a resposta imune.

Segundo Maxwell et al (1990), os organismos respondem ao estresse e aos outros agentes estressores aumentando corticosterona, proteína total, glicose e hematócrito no sangue, reduzindo linfócitos circulantes, glicogênio hepático e índice hematosomático. A exposição ao calor acarreta maior teor de gordura e menor rendimento de peito, enquanto os rendimentos de carcaça e de coxa mais sobrecoxa são maiores (FARIA FILHO, 2003). Mitchell & Carlisle (1992) observaram redução na área absorptiva intestinal de frangos de corte expostos à temperatura elevada

como efeito da diminuição (19%) da altura de vilosidades intestinais, que têm papel fundamental na degradação final de proteínas e carboidratos (GARTNER & HIATT, citado por FIGUEIREDO et al., 2003). De acordo com Uni et al. (2001), a redução da altura das vilosidades intestinais de aves submetidas ao estresse térmico por causa do calor é consequência direta da redução de consumo de ração.

Considerando-se, que já existem procedimentos que permitem a inoculação massiva *in ovo* de vacinas sem causar prejuízo ao desenvolvimento embrionário, é plausível supor-se que a suplementação exógena de embriões de frangos de corte possa ser realizada utilizando-se a mesma técnica. Todavia, melhor seria se resultados positivos fossem obtidos com a manipulação nutricional do ovo antes da incubação, pois isso evitaria a manipulação dos ovos e sua retirada da incubadora ou nascedouro, o que pode causar prejuízos a eclodibilidade. Se a vitamina C atua como um agente anti-estresse, um imunoativador e um co-fator para formação e manutenção do colágeno e, conseqüentemente, dos ossos, é possível que a injeção da mesma *in ovo* resulte na formação de pintainhos de maior qualidade e mais resistentes ao estresse térmico durante a criação.

Diante do contexto exposto, o presente estudo tem como objetivo verificar se pintos oriundos de ovos injetados com ácido ascórbico e submetidos ao estresse por calor apresentarão maior imunidade e crescimento, bem como maior desempenho pós-eclosão que os pintos oriundos de incubação a termoneutralidade sem injeção de ácido ascórbico, e se eles serão mais resistentes ao estresse por calor durante a criação.

2 Estresse térmico na criação de frangos de corte

O ambiente onde as aves são criadas é um dos grandes responsáveis pelo sucesso ou fracasso de uma empresa avícola. Como na maioria das situações as aves domésticas estão confinadas, a temperatura ambiente pode ser considerada o fator físico de maior efeito, pois nessas condições as aves apresentam pouca margem de manobra para os ajustes comportamentais necessários à manutenção da temperatura corporal (MACARI et al., 2004).

Desta forma, o estresse por calor é um dos maiores entraves na produção de frangos, principalmente em regiões onde predominam altas temperaturas, resultando

em queda no desempenho, a imunossupressão e a alta mortalidade (OLIVEIRA NETO et al., 2000; NAZIROGLU et al., 2000; MUJAHID et al., 2007).

O estresse por calor tem início quando a temperatura ambiental ultrapassa a temperatura de conforto térmico, que é definido como sendo a faixa de temperatura ambiente onde a taxa metabólica é mínima e a homeotermia é mantida com menos gasto energético. Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA, 2009) a faixa de temperatura recomendada para aves adultas é de 21 a 23°C, com umidade relativa entre 65% e 70%. Entretanto, em países tropicais dificilmente estes valores são encontrados em condições comerciais de produção, o que compromete o desempenho ótimo destes animais.

Grande parte das pesquisas envolvendo altas temperaturas são realizadas em situações crônicas de exposição ao calor, e nesta situação as aves apresentam máxima resposta frente a esse desafio, apresentando significativa redução no desempenho. Bonnet et al. (1997) observaram redução em 50% do ganho de peso nas aves em estresse crônico de 32°C, quando comparadas às aves em ambiente termoneutro de 22°C, depois de três semanas. Enquanto Lana et al. (2000), encontraram ganho de peso 15% menor para aves mantidas sob estresse crônico por calor (31°C) em relação às aves mantidas em conforto térmico (23°C). Souza (2008) verificou que a exposição crônica ao calor causou redução no consumo de ração de 12,44%, 22,89% e 25,85% aos 28, 35 e 42 dias, respectivamente. Já a exposição ao calor cíclico reduziu o consumo de ração em 13,52% e 16,30%, aos 35 e 42 dias, respectivamente. Estes resultados são justificados pelo maior consumo nas horas frescas da noite, que ocorre no estresse cíclico.

Quando expostas ao calor, as aves ativam mecanismos fisiológicos responsáveis pela dissipação de calor e diminuem sua produção metabólica. Simultaneamente, alteram seu comportamento, abrindo as asas e mantendo-as afastadas do corpo, também aumentam o fluxo sanguíneo para a superfície corporal a fim de facilitar a dissipação do calor para o ambiente. Se ainda não for suficiente, há o aumento da frequência respiratória, ocasionando perdas excessivas de dióxido de carbono (CO₂). Assim, a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) diminui, levando à queda na concentração de ácido carbônico (H₂CO₃) e hidrogênio (H⁺). Esta alteração é denominada alcalose respiratória (FURLAN & MACARI, 2002). O aumento dos

movimentos respiratórios também desencadeia a contração da musculatura envolvida na respiração, gerando mais calor ao animal que pode levá-lo à hipertermia, além do desperdício energético para manutenção da estabilidade fisiológica (FURLAN & MACARI, 2002).

Portanto, ao sofrerem estresse por calor, as aves reduzem o consumo de alimento e a eficiência digestiva, a fim de diminuir a produção de calor metabólico e manter a homeotermia. No entanto, menos nutrientes são disponibilizados para o metabolismo, resultando em menor taxa de crescimento (ABU-DIEYEH, 2006) Segundo Geraert et al. (1996) a taxa de produção de calor metabólico é reduzida quando as aves são expostas a temperaturas elevadas. Assim, a taxa de turnover protéico, que representa a síntese e a degradação de proteína, também é influenciada pela temperatura ambiente, pois gera grande quantidade de calor. Segundo Yunianto et al. (1997), estas mudanças podem ser causadas por alterações nas funções hormonais. De acordo com esses pesquisadores o hormônio corticosterona pode exercer auxílio no controle do turnover protéico da musculatura esquelética em aves. Em estudo conduzido com frangos de corte desafiados pelo calor (30 e 34°C), eles observaram aumento na concentração plasmática de corticosterona, que pode ter induzido a quebra da proteína muscular.

Já os hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que são diretamente relacionados ao metabolismo animal (SAHIN ET AL., 2002), apresentam suas concentrações plasmáticas influenciadas negativamente pela temperatura ambiental (YAHAV et al., 1997). Dessa forma, aves mantidas sob altas temperaturas apresentam níveis plasmáticos destes hormônios diminuídos, reduzindo a atividade da bomba de sódio e potássio e o consumo de oxigênio pelas células animais, ocasionando redução da taxa metabólica (CHEN et al., 1994). Jonier & Huston (1957) verificaram redução no tamanho da glândula tireóide em frangos de corte estressados por calor, o que resultou em redução da atividade desta glândula e em redução da taxa metabólica.

Segundo Oliveira Neto et al. (2000), altas temperaturas provocam modificações no tamanho dos órgãos, consistindo em ajuste fisiológico para reduzir a produção de calor corporal. Isto favia sido verificado por Plavnik & Yahav (1998) ao trabalharem com frangos de corte estressados por calor (35°C), observaram

redução no peso do fígado das aves, provavelmente devido à redução na taxa metabólica. Oliveira et al. (2002), encontraram menores pesos relativos do fígado e do coração de frangos de corte sob estresse térmico (32°C). O sistema sanguíneo também é sensível às mudanças de temperatura, consistindo num importante indicador das respostas fisiológicas das aves aos agentes estressores (LAGANÁ et al., 2005). De acordo com Yahav et al. (1997), o aumento da temperatura ambiente, reduziu a concentração de hemoglobina de 10,34 para 9,77g dL⁻¹ e aumentou o hematócrito em frangos submetidos ao estresse agudo por calor. Laganá et al. (2005) verificaram que o ambiente influenciou a concentração de hemoglobina e de heterófilos. De acordo com os últimos autores, a diminuição no hematócrito em altas temperaturas estaria associada com a necessidade de reduzir a viscosidade do sangue durante a vasodilatação ou devido a uma possível desidratação.

A bursa de Fabricius e o timo são órgãos linfoepiteliais centrais das aves, indispensáveis ao desenvolvimento e funcionamento do tecido linfóide periférico, uma vez que, respondem pela maturação e transferência de linfócitos para outros tecidos dependentes: baço, nódulos linfáticos agregados ao sistema digestório condutor e glândula lacrimal da terceira pálpebra (LIMA et al., 2008). Estes órgãos são fundamentais durante as primeiras semanas pós-eclosão, porém sofrem involução fisiológica à medida que a ave atinge sua maturidade sexual (HODGES, 1974).

O sistema imune desses animais pode ser dividido, em dois compartimentos distintos: o sistema burso-associado, composto principalmente por linfócitos B, que em essência é responsável pela produção de anticorpos, após estímulo antigênico e o sistema timo-associado, composto principalmente por linfócitos T e fundamentalmente responsável pelas respostas de citotoxicidade e hipersensibilidade tardia (MONTASSIER, 2009).

O estresse por calor pode aletrar o sistema imune, que inclui a atrofia do timo, da bursa de Fabricius cloacal e do baço, decorrentes do aumento da concentração de corticosterona no sangue das aves. Segundo Malheiros et al. (2003) a presença de altas concentrações deste hormônio, resulta em alterações metabólicas. Rosales et al. (1989) encontraram em aves criadas em ambientes com temperaturas elevadas, atrofia de todos os órgãos linfóides (timo, baço e bursa de Fabricius),

levando a redução do número de linfócitos circulantes (BORGES et al., 2004). Donker & Beuving (1989) comprovaram que a infusão de corticosterona em frangos diminui o peso relativo do timo em 71%, da bursa em 57% e do baço em 35%. Estes resultados são consistentes com a idéia de que os estressores e a corticosterona têm efeito catabólico sobre os órgãos linfóides e que a perda de peso, acompanhada da atrofia e da regressão dos órgãos linfóides, são bons indicativos de estresse pelas aves.

A elevação das concentrações de corticosteróides no sangue acarreta lise de linfócitos imaturos da bursa de Fabricius e do timo, ocasionando hipotrofia dos referidos órgãos e involução precoce do tecido linfóide (COMPTON et al., 1990). Esta depleção não só interfere na produção de imunoglobulinas como também reduz os níveis de anticorpos circulantes, tornando o animal mais vulnerável aos desafios sanitários. O processo de depleção linfocitária é mediado por intensificação da morte celular programada, também conhecida como apoptose, principalmente na bursa de Fabricius, tanto que este órgão é frequentemente adotado para avaliar a resposta em casos de estresse (REVIDATTI et al., 2002).

Sendo assim, existe a necessidade de se buscar alternativas para reduzir as perdas na produtividade e conseqüentemente na atividade imunológica de frangos de corte em situação de estresse térmico.

3 Manipulação térmica durante a incubação

O sistema de regulação térmica das aves é um dos primeiros a se desenvolver ainda no início do processo de incubação, com a formação do sistema nervoso central e periférico que são responsáveis pelos mecanismos da termorregulação. Assim que ocorre o fechamento total do canal neural (48 horas) inicia o funcionamento do mecanismo termorregulador. O objetivo da regulação da temperatura em animais homeotérmicos na fase de desenvolvimento pós-eclosão é a manutenção de uma temperatura corporal estável na maioria das condições ambientais, principalmente as variações de temperatura.

Os sistemas cardiovascular, respiratório e metabolismo em geral possuem a capacidade de integrarem suas atividades participando de reações adequadas e coordenadas para o controle da temperatura corporal (NICHELMANN et al., 2001).

A termorregulação envolve uma integração de vários sistemas e possui a finalidade de manter a temperatura corporal dentro dos limites toleráveis, permitindo constância do meio interno e o funcionamento dos componentes. O sistema termorregulador envolve três componentes: receptor, integrador e efetor (Figura 1). Os estímulos são detectados pelos receptores e sua integração com o sistema nervoso induz a ativação dos mecanismos controladores da temperatura corporal.

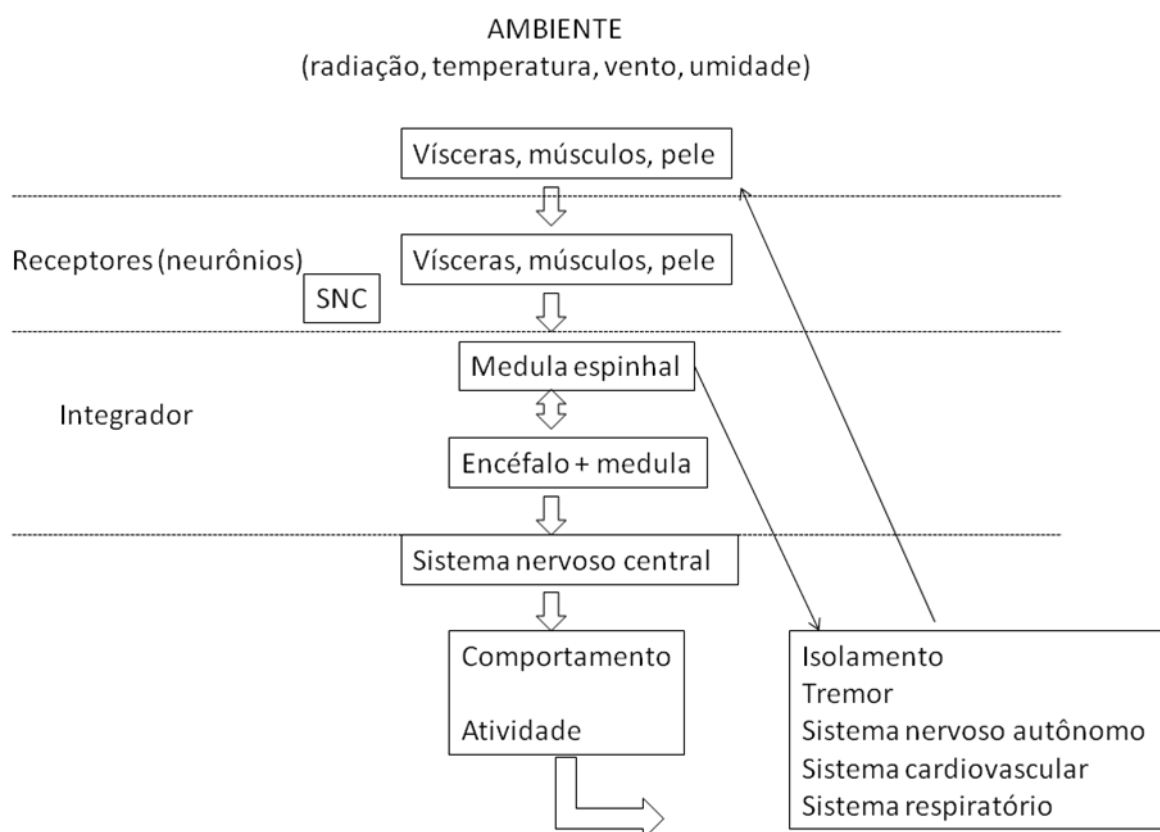


Figura 1 – Interação entre ambiente e comportamento e atividade do frango de corte. Adaptado: Furlan & Macari (2008).

Assim, a formação de um eficiente sistema termorregulador pode ser considerada um pré-requisito para a maturação da regulação da temperatura na fase pós-eclosão, o que é muito importante para o desempenho do frango de corte até o final da criação. Tzschentke (2007) relatou que o desenvolvimento pré-natal dos mecanismos termorreguladores em espécies precoces, como as aves, ajuda o rápido amadurecimento da regulação de temperatura logo após a eclosão, o que é importante para o desempenho zootécnico. Em aves, o final da incubação é

caracterizado por funções corporais bem desenvolvidas, como a regulação de temperatura que é realizada de forma intensa nessa fase.

Da mesma forma que os mecanismos periféricos de termorregulação, os mecanismos centrais localizados no hipotálamo anterior (região do sistema nervoso central importante para a termorregulação) são desenvolvidos precocemente. Em estudo com embriões de patos, Tzschentke et al. (2004) observaram que desde o 28º dia de incubação até a eclosão (34 dias para patos) a proporção de neurônios sensíveis ao calor, sensíveis ao frio e termo insensíveis foi constante e não se diferenciou nos recém-nascidos.

Tzschentke et al. (2004), comparando a termosensibilidade do hipotálamo de patos em crescimento com patos adultos, verificaram que em embriões de patos e patinhos neonatos a termosensibilidade é caracterizada por alta sensibilidade neuronal ao frio. Além disso, os neurônios “guardiões” da temperatura, que são sensíveis a leves alterações de temperatura de não mais de 1° C quando se aplica estimulação térmica, já foram encontrados em embriões de patos aos 28 dias de incubação. Estes neurônios foram descritos pela primeira vez por Basta et al. (1997) em patos de 10 dias de idade. Os neurônios “guardiões” da temperatura são sensíveis somente a temperaturas encefálicas extremamente altas ou baixas e podem ativar mecanismos termorregulatórios mais eficazes, se o intervalo normal de regulação for excedido. Os mecanismos termorregulatórios que são ativados durante o estresse por calor incluem a vasodilatação periférica, a respiração ofegante e ainda a redução do metabolismo.

Em aves, uma fase crítica do desenvolvimento do sistema termorregulador parece ser o período perinatal, isto é, entre o final da incubação e os primeiros dias após a eclosão (YAHAV & MCMURTRY, 2001). Durante essa fase fatores ambientais como temperatura de incubação ou ambiental, podem induzir a uma mudança duradoura das funções corporais em relação ao ambiente, a denominada mudança epigenética. Dessa forma, o desenvolvimento do sistema termorregulatório deve acontecer de maneira efetiva, visando garantir efetiva regulação térmica após o nascimento das aves.

Os frangos de corte são mantidos em ambientes controlados que minimizam as variações de temperatura ambiental. Aves selvagens, seus ovos e seus embriões

muitas vezes são submetidos às condições ambientais irregulares. E isso pode explicar o fato dos pássaros silvestres serem capazes de desenvolver termotolerância com maior eficiência que as aves domésticas. De acordo com Nichelmann et al. (1999), a exposição a flutuações de temperatura durante o período de incubação pode ser utilizado para a adaptação epigenética e, assim, possibilitar o conforto térmico do frango de corte mesmo quando submetidos à temperaturas ambientais consideradas estressantes.

Doner (1976) propôs um conceito geral etiológico de programação perinatal epigenética da função dos sistemas regulatórios fundamentais durante toda a vida. Em seu conceito, os hormônios têm papel decisivo como organizadores do sistema neuroendócrino e imune dependentes de fatores do meio ambiente, os quais regulam todos os processos fundamentais da vida. De acordo com o autor, durante as fases críticas, hormônios, neurotransmissores e citoquinas estão envolvidos na diferenciação, maturação e programação funcional de seus próprios controladores no sistema nervoso central, dentro dos seus respectivos sistemas reguladores fisiológicos. Dessa forma, essas substâncias atuam como efetores endógenos críticos que transmitem as informações ambientais para o genoma. Finalmente passam a também agir como fatores epigenéticos. Por um lado, este mecanismo parece ser uma base provável da programação ou programação defeituosa na fase neonatal da ave, que, por exemplo, pode causar transtornos metabólicos e cardiovasculares, assim como transtornos comportamentais observados durante a fase de criação dos animais.

Por outro lado, o conhecimento e o melhor entendimento dos mecanismos termorregulatórios podem ser usados especificamente para induzir a adaptação de longo prazo de um organismo às condições climáticas pós-eclosão. Na Figura 2 está resumida esta abordagem conceitual.

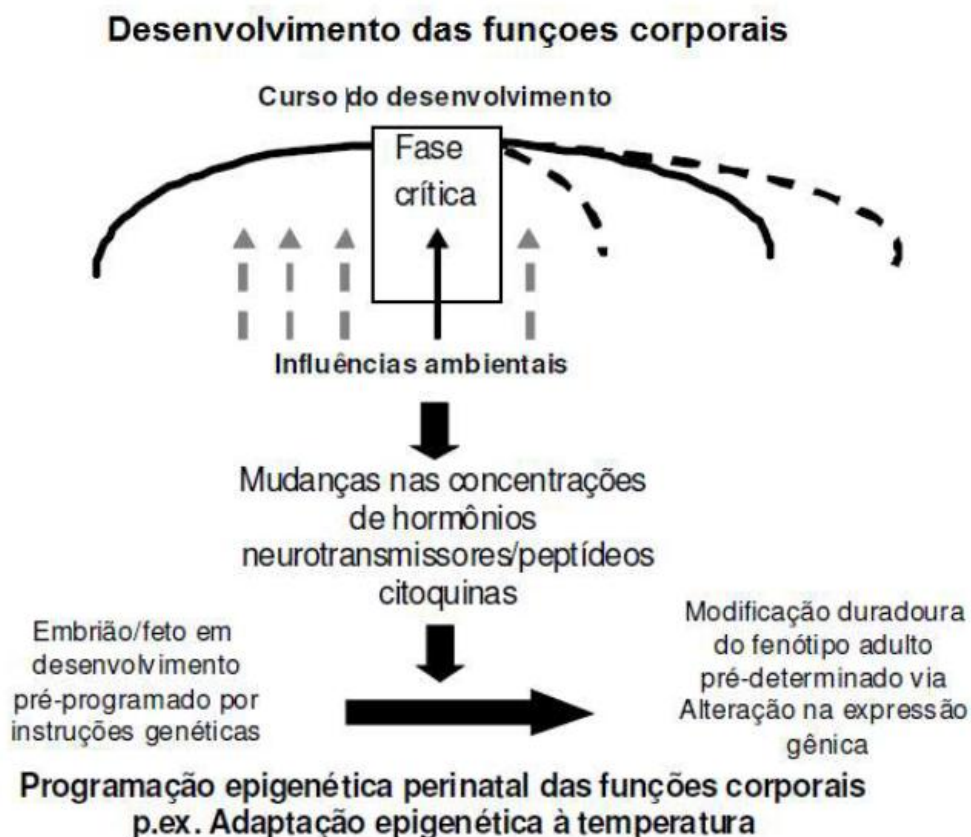


Figura 2 – Indução epigenética perinatal por fatores ambientais.

Adaptado: Tzschentke & Plagemann, 2006

No Glossary of Terms for Thermal Physiology (2003), adaptação é definida como — mudanças que reduzem a tensão fisiológica produzida por componentes estressantes do ambiente como um todo. Isto pode ocorrer durante a vida de um organismo (fenotípico) ou ser o resultado da seleção genética em uma espécie ou subespécie (genotípico).

De acordo com Tzschentke & Basta (2002), a adaptação térmica durante a incubação ocorre durante a ontogenia inicial, dentro de uma fase crítica de incubação em janelas de tempo curtas, por meio de alterações epigenéticas duradouras que afetam a expressão de genes efetores relacionados. Dessa forma, a adaptação epigenética à temperatura em embriões de aves pode ser induzida por alterações crônicas na temperatura de incubação nos últimos dias de incubação, o que acarreta em alterações duradouras nos mecanismos termorreguladores relacionados à adaptação ao frio e ao calor.

Também, as alterações na termossensibilidade do sistema termorregulador refletem as alterações nos mecanismos termorreguladores periféricos após experiências de temperatura no período embrionário.

Gladys et al. (2000) encontraram que as principais consequências da hipertermia durante todo o processo de incubação são a redução da eclodibilidade e má qualidade do pintainho. Além disso, podem ocasionar redução do peso corporal, do comprimento e tamanho relativo do coração, problemas locomotores, aumento da mortalidade embrionária na fase final e mau posicionamento, entre outras consequências. Condições de hipertermia foram testadas por Thompson et al. (1976), sendo que os desvios de temperatura estudados foram: 40,6; 43,3; 46,1 ou 48,9°C. Os autores não utilizaram a hipertermia durante toda a incubação, apenas no final da embriogênese aos 16 dias de incubação, durante vários tempos de exposição, verificaram que a manutenção por 24 horas de 40,6°C não causou danos à taxa de eclodibilidade, mas 6 horas a 43,3°C diminuiu a eclodibilidade, o que se tornou ainda mais severo a partir de 9 horas de exposição. As temperaturas de 46,1°C durante 3 horas e 48,9°C por 1 hora provocaram 100% de mortalidade embrionária. Apesar de não provocar mortalidade, os pintos sobreviventes de ovos submetidos a elevadas temperaturas eram fracos, com alta incidência de defeitos de pernas e andar inseguro.

Da mesma forma, Leandro et al. (2000) não encontraram diferenças entre a eclodibilidade, peso ao nascer e qualidade de pernas, em estudo com variação de temperatura de calor (40°C) ou frio (32°C) durante cinco horas, depois do 16º dia de incubação. Porém, os ovos expostos ao estresse pelo frio ou calor tiveram um período de incubação maior do que aqueles expostos à temperatura normal. O aumento do tempo médio total de incubação foi de 10 e 8 horas para frio e calor, respectivamente, indicando que mesmo uma breve variação da temperatura normal de incubação em uma fase crítica de desenvolvimento é suficiente para determinar estresse nos embriões de frangos de corte.

Tzschentke & Halle, 2009, estudando manipulação térmica na incubação de ovos férteis (ROSS 308), encontraram que a incubação em temperatura crônica elevada (1°C acima do padrão) nos últimos quatro dias da incubação não teve nenhum efeito sobre a taxa de nascimento das aves ou qualidade dos pintos.

Resultados semelhantes foram encontrados, por Joseph et al. (2006). Sob condições de criação em ambiente quente constante (32°C) até a idade de abate, exclusivamente para frangos machos, a incubação em temperatura elevada crônica ocasionou alterações de longo prazo das funções corporais e melhorou o desempenho, características estas relacionadas com a melhor adaptação ao calor (HALLE & TZSCHENTKE, 2010).

Hulet et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas do embrião sobre o ganho de peso de frangos de corte. Foi relatado que embriões que foram manipulados termicamente apresentaram maior ganho de peso quando comparados ao grupo que apresentava temperatura do embrião padrão. Isso pode ser explicado, pois, os frangos de corte criados em temperaturas de estresse térmico por calor podem ter se aclimatado desde a fase embrionária para realizarem seus processos metabólicos sob condições de temperaturas mais elevadas.

Collin et al. (2007) em estudo com embriões de galinha, verificaram o efeito de manipulação térmica embrionária (39,5°C) durante 3 horas nos dias 8, 9 e 10 (precoce), em 16,17 e 18 (tardio) ou em ambas as fases (precoce e tardio) sobre parâmetros zootécnicos ao nascimento, peso vivo no abate e rendimento de peito de frangos de corte (42 dias). Os autores encontraram que a taxa de eclosão pode ser influenciada pela condição de hipertermia na fase precoce de desenvolvimento e que a temperatura retal do neonato foi menor no tratamento controle. Para os resultados de peso do neonato e das aves durante a fase pós-eclosão (28 e 42 dias), não ocorreu influência da manipulação térmica. Entretanto, o rendimento de peito das aves submetidas à hipertermia na fase precoce, tardio e precoce e tardio foi superior ao rendimento de peito das aves submetidas à temperatura de incubação padrão (37,8°C).

Leksrisompong et al. (2007) estudaram o efeito de uma hipertermia crônica (40°C) entre dos dias 19 e 20 da embriogênese sobre o peso corporal do neonato e o peso de órgãos, encontraram que pintos oriundos de ovos que sofreram uma hipertermia tiveram um pior peso ao nascer, quando comparados aos pintainhos oriundos de ovos incubados em temperatura constante de 38,2°C. Para os pesos de órgãos, os autores encontraram que o coração dos neonatos incubados em

hipertermia tardia era mais pesados quando comparados ao controle, para os outros órgãos estudados não houve diferença estatística.

Entretanto, Yahav et al. (2004) estudando hipertermia na fase final da incubação (38,5°C nos dias 16, 17 e 18 por um intervalo de 3 horas em cada um dos dias) não encontraram diferenças entre os grupos termomanipulados e o controle para o peso vivo do neonato.

4 Vitamina C x estresse por calor

O termo vitamina C refere-se aos compostos que exibem atividade de L-ácido ascórbico e está presente sob duas formas: ácido ascórbico (AA) e ácido deidroascórbico. Sendo normalmente comercializada na forma reduzida, que é o AA (FARIA et al., 2009). Esta atua como co-fator enzimático em várias reações fundamentais no organismo animal, sendo de grande importância para a biossíntese do colágeno, síntese e metabolismo de neurotransmissores, está envolvido na manutenção do epitélio da mucosa e da parede dos vasos, participa também da formação dos glóbulos vermelhos do sangue e do controle das concentrações de corticosteróides circulantes.

Aves naturalmente sintetizam vitamina C para o crescimento e metabolismo, a partir da glicose-1-fosfato. Mas essa capacidade não é suficiente sob condições de estresse, principalmente provocado pelo calor ambiente (FURLAN & MACARI, 2002). Portanto, sob condições de estresse, a suplementação de vitamina C pela água de beber, pela ração ou até mesmo pela injeção intra ovo pode, em alguns casos, atenuar os efeitos deletérios dos fatores estressantes (SILVA et al., 1993).

Considerando que a vitamina C aumenta a degradação de corticosteróides, liberados durante o estresse (SAHIN et. al., 2002) e que este hormônio acelera a degradação de proteína corporal (YUNianto et al., 1997) e provoca a morte de células linfóides, pode-se deduzir que a inclusão da vitamina C para aves sob estresse de calor é uma alternativa nutricional para melhorar o desempenho e a resposta imune das aves nestas condições. Nesse contexto, Mahmoud et al. (2004) encontraram redução das concentrações de corticosteróides em frangos de corte expostos a estresse cíclico por calor (21-30 °C) quando suplementados com Vitamina C (500 mg/Kg) na ração.

Avaliando o efeito da suplementação de vitamina C na ração sobre o desempenho de aves submetidas a altas temperaturas, Vathana et al. (2002) encontraram diferenças no desempenho de frangos de corte mistos de 42 dias submetidos a estresse por calor cíclico, e suplementados com vitamina C na água de bebida. Lohakare et al. (2005) observaram diferenças para ganho de peso, consumo e conversão alimentar de frangos de corte suplementados com doses crescentes de vitamina C na ração. De forma semelhante, Vaz (2006) avaliando o desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade mantidos em ambiente de alta temperatura (32°C), observou que a suplementação de vitamina C melhorou o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar das aves. Entretanto, Mckee et al. (1997) não verificaram diferenças para ganho de peso e consumo de alimento quando suplementaram a ração com vitamina C de frangos de corte submetidos a estresse por calor (33,8°C).

A vitamina C também pode reduzir o efeito decorrente de altas temperaturas sobre os tecidos viscerais. Sahin et al. (2003) verificaram que a adição de vitamina C (250 mg/kg) em rações melhorou os rendimentos de fígado, coração e moela de frangos sob estresse crônico por calor.

Outro benefício obtido com a suplementação de vitamina C é sobre a função imune de aves estressadas por calor, que foi significativamente melhorada com o aumento nos níveis de vitamina C (PARDUE & THAXTON, 1984; PARDUE et al., 1985). Sahin et al. (2003) verificaram que a adição de vitamina C (250 mg/kg) em rações para frangos estressados por calor (32°C), resultou em aumento de 17% no peso relativo do baço.

A injeção intra ovo de vitamina C pode ser uma alternativa para a suplementação desta vitamina para pintos. Ipek et al. (2004) em estudo com injeção de vitamina C intra ovo aos 13 dias de incubação, observaram efeito positivo para a eclosão com a injeção de 3 e 5 mg de AA por ovo, diluídos em 0,5 ml de solução.

Nowaczewski et al. (2012), em estudo com a injeção de 3 e 6 mg de ácido ascórbico, dissolvido em 0,1 ml de solução, realizados nos dias 13, 15 e 17 de incubação, na câmara de ar, observaram aumento da eclodibilidade para o grupo que recebeu 6 mg de ácido ascórbico, no 15º dia de incubação, em relação ao grupo controle (sem perfuração).

Wilson & Jaworski (1992) afirmaram que a concentração plasmática de ácido ascórbico diminuiu no 15º dia de incubação em ovos de galinha White Leghorn, em conjunto, ocorre a elevação da corticosterona no sangue, que é geralmente associada com o estresse do embrião e com a redução da biossíntese de ácido ascórbico em aves (KUTLU & FORBES, 1994). Portanto, o ácido ascórbico pode ser considerado como um agente anti-estresse (PARDUE & THAXTON, 1985), porque pode levar à redução de corticosterona, principalmente em embriões incubados em altas temperaturas.

Zakaria & Al-anezi (1996) em estudo com injeção de ácido ascórbico realizados aos 11, 15, 17 e 19 dias de incubação, com concentrações de 0,5, 1, 3, e 12 mg de ácido ascórbico por ovo, diluídos em 0,1 mL de solução, observaram melhor eclodibilidade para os ovos injetados com 3 mg do ácido, enquanto que uma dose de 12 mg acarretou em uma piora desta característica. Além disto, os autores observaram melhores resultados para os ovos injetados com o ácido nos 11 e 15 dias de incubação; enquanto este efeito foi minimizado nos ovos injetados no dia 19 de incubação.

Selim et al. (2012) em estudo com a injeção de soluções (0,1 ml de óleo de milho; 0,1 ml de óleo de milho + 10 mg de vitamina E; 0,1 ml de solução salina e 0,1 ml de solução salina + 3 mg de ácido ascórbico) aos 12 dias de incubação de patos, observaram que a injeção intra ovo da solução, com ou sem ácido ascórbico diminui a eclodibilidade para (68%) em comparação com o controle não injetado (74%).

Ghonim et al., (2009) ao compararem a injeção de 3 mg de ácido ascórbico, com a imersão dos ovos no ácido em uma diluição de 20 g/L e a pulverização (30 g/L) em ovos de patos aos 14 dias de incubação, relataram uma melhora para a eclodibilidade dos ovos pulverizados e imergidos em ácido ascórbico, quando comparado com os ovos injetados.

Mohammed et al. (2012) ao avaliarem a imersão de ovos de matrizes em soluções (controle, sem imersão; imersão em soluções contendo 0, 5 e 10 g de ácido ascórbico/L de água destilada durante dois minutos) e exposição a 24°C durante seis horas no 16º dia de incubação, observaram melhora na eclodibilidade dos ovos imergidos em 5g de ácido ascórbico.

Shafed et al. (2002) imergiram ovos antes do início da incubação em diferentes soluções (controle, sem imersão; imersão em água; imersão em soluções contendo 10, 20 e 30 g de ácido ascórbico), e observaram que a imersão dos ovos de matrizes com 29 semanas de idade, em uma solução contendo 10 g de ácido ascórbico aumentou a condutância e a eclodibilidade destes ovos, em relação ao grupo controle. Os autores observaram também que este tratamento aumentou a perda de massa dos ovos.

De acordo com Vick & Brake (1986) os ovos mergulhados por dois minutos em uma solução contendo 3 g de ácido ascórbico tiveram a maior condutância, no entanto, apresentaram queda na eclodibilidade (SHAFED et al., 2002).

5 Objetivos

5.1 Gerais

Verificar se a injeção de ácido ascórbico in ovo atenua os efeitos causados pelo estresse por calor sobre a incubação e sobre a criação de frangos de corte.

5.2 Específicos

Durante a fase de incubação a proposta foi verificar se a injeção de ácido ascórbico antes da incubação influencia os parâmetros de incubação, qualidade, parâmetros sanguíneos e do sistema imune dos pintos.

Durante o período de criação a proposta foi verificar se a injeção de ácido ascórbico antes da incubação em conjunto com a manipulação térmica durante a incubação influenciariam nos parâmetros de desempenho, rendimento de carcaça e partes e do sistema ósseo, parâmetros sanguíneos e comportamento de frangos de corte mantidos em estresse térmico durante a criação.

6 Referências Bibliográficas

ABU-DIEYEH, Z. H. M. Effect of high temperature per se on growth performance of broilers. **International Journal of Poultry Science**, n. 5, p. 19-21. 2006.

BASTA, D.; TZSCHENTKE, B.; NICHELMANN, M.; Temperature guardian neurons in the preoptic area of the hypothalamus. **Brain Research**, v. 767, p. 361-362, 1997.

BLALOCK, J. L.; THAXTON, J. P.; GARLICH, J. D. Humoral immunity in chicks experiencing marginal vitamin B-6 deficiency. **Journal Nutrition**, v. 114, p. 312-322, 1984.

BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2008. p.75-95.

BOLELI, I. C.; QUEIROZ, S. A. Effects of incubation temperature and relative humidity on embryonic development in eggs of red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*). **International Journal of Poultry Science**, v. 11, 2012.

BONNET, S.; GERAERT, P. A.; LESSIRE, M.; CARRE, B.; GUILLAUMIN, S. Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. **Poultry Science**, v. 76, n. 6, p. 857–863, 1997.

BORGES, S. A.; FISCHER da SILVA, A. V.; MAJORKA, A., HOOGE, D. M.; CUMMINGS, K. R. Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram). **Poultry Science**, v. 83, n. 9, p. 1551-1558, 2004.

BRIGGS, G. M.; LUCKEY, T. D.; ELVENJEM, C. A.; HART, E. B. Effect of ascorbic acid on chick growth, when added to purified rations. **Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 55, p. 111-115, 1994.

CHEN, C. L.; SANGIAH. S.; CHEN, H.; RODER, J. D.; SHEN, Y. Effects of heat stress on Na⁺, K (+)-ATPase, Mg (2+)-activated ATPase, and Na (+)-ATPase activities of broiler chickens vital organs. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 41, p. 345-356, 1994.

COLLIN, A.; BERRI, C.; TESSERAUD, S.; REQUENA RODÓN, F. E.; SKIBACASSY, CROCHET, S.; DUCLOS, M. J.; RIDEAU, N.; TONA, K.; BUYSE, J.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E.; PICARD, M.; YAHAV, S. Effects of Thermal Manipulation During Early and Late Embryogenesis on Thermotolerance and Breast Muscle Characteristics in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 86, p. 795–800, 2007.

COMPTON M.M.; GIBBS P.S.; JOHNSON L.R. Glicocorticoid Activation of Deoxyribonucleic Acid Degradation in Bursal Lymphocytes. **Poultry Science**, v. 69, p.1292-1298, 1990.

DECUYPERE, E.; NOUWEN, E. J.; KÜHN, E. R.; GEERS, R.; MICHELS, H. Differences in serum iodohormone concentration between chick embryos with and without the bill in the air chamber at different incubation temperatures. **General Comparative Endocrinology**, v. 37, p. 264-267, 1979.

DONKER, R. A.; BEUVING, G. Effect of corticosterone infusion on plasma corticosterone concentration, antibody production, circulating leukocytes and growth

in chicken lines selected for humoral immune responsiveness. **British Poultry Science**, v. 30, n. 3, p. 361-369, 1989.

DORNER, G. **Hormones and brain differentiation**. Amsterdam: Elsevier, 1976.

EL-BOUSHY, A. R. Vitamin E affects viability, immune response of poultry. **Feedstuffs**, v. 60, n. 4, p.20-26, 1988.

FARIA FILHO, D. E. **Efeito de dietas com baixo teor protéico, formuladas usando o conceito de proteína ideal, para frangos de corte criados em temperaturas fria, termoneutra e quente**. 2003, 85 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

FARIA, D. E. ; JUNQUEIRA, O. M; DUARTE, K. F. Enfermidades Nutricionais. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2 ed. Campinas: FACTA/APINCO, 2009, v. 1, p. 927-971.

FIGUEIREDO, D. F; MURAKAMI, A. E.; PEREIRA, M. A. S.; FURLAN, A. C.; TORAL, F. L. B. Desempenho e morfometria da mucosa de duodeno de frangos de corte alimentados com farelo de canola, durante o período inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p.1321-1329, 2003.

FRENCH, N. A. Effect of short periods of high incubation temperature on hatchability and incidence of embryo pathology of turkey eggs. **British Poultry Science**, v. 41, p. 377–382, 2000.

FURLAN, R. L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ª Ed. Jaboticabal. Funep, 2008, cap. 17 p. 209-230.

GEERS, R.; MICHELS, H.; TANGHE, P. Growth, maintenance requirements and feed efficiency of chickens in relation to prenatal environmental temperatures. **Growth**, v. 46, p. 26–35, 1982.

GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C. F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 195-204, 1996.

GHONIM, A. I. A.; AWAD, A. L.; FATTOUH, M. H. A.; EL-SHHAT, A. M. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. **Egypt Poultry Science**, v. 29, p. 1085-1099, 2009.

GLADYS, G. E.; HILL, D.; MEIJERHOF, R.; SALEH, T.M.; HULET, R.M. Rffect of embryo temperature and age of breeder flock on broiler post-hatch performance. **Poultry Science**, v. 79 (Suppl.1), 2000.

GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 75-106, 2003.

GOGAL, R. M. J.; AHMED, S. A.; LARSEN, C. T. Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (Lympho-Pro). **Avian Disease**, v. 41, p. 714-721, 1997.

HAGGER, C.; STEIGER-STAFF, D.; MARGUERAT, C. Embryonic mortality in chicken eggs as influenced by egg weight and inbreeding. **Poultry Science**, v. 65, p. 812–814, 1986.

HALLE, I.; TZSCHENTKE, B. Influence of Temperature Manipulation during the Last 4 Days of Incubation on Hatching Results, Post-Hatching Performance and Adaptability to Warm Growing Conditions in Broiler Chickens. **Journal Poultry Science**, v. 48, p. 97-105, 2010.

HODGES, R. D. Histology of the bursa of Fabricius and the thymus. In: HODGES R. D. **The Histology of the Fowl**. Academic Press, London, 1974, p.205-213.

HULET, R.; GLADYS, G.; HILL, D.; MEIJERHOF, R.; EL SHIEKH, T. Influence of eggshell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. **Poultry Science**, v. 86, p. 408–412, 2007.

IPEK, A.; SAHAN, U.; YLMAZ, B. The effect of *in ovo* ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. **Archives Geflügelk**, v. 68, p. 132-135, 2004.

JONIER, W. P.; HUSTON, T. M. The influence of high environmental temperature on immature domestic fowl. **Poultry Science**, v. 36, p. 973-978, 1957.

JOSEPH, N. S., LOURENS, A., MORAN JR., E. T. The effects of suboptimal eggshell temperature during incubation on broiler chick quality, live performance, and further processing yield. **Poultry Science**, v. 85, p. 932–938, 2006.

KUTLU, H. R.; FORBES, J. M. Responses of Broiler Chicks to Dietary Ascorbic Acid and Corticosterone. **British Poultry Science**, v. 35, p. 184–186, 1994.

LAGANÁ, C. **Otimização da produção de frango de corte em condições de estresse por calor**. 2005. 180f. Tese (Doutorado em Zootecnia) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

LAGANÁ, C.; REBEIRO, A. M. L.; GONZALES, F. H. D.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. R.; BARBOSA, P. R. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de frangos de corte em estresse por calor. **Boletim da Indústria animal**, v. 62, n. 2, p.157-165, 2005.

LANA, G. R. Q.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; LANA, A. M. Q. Efeito da temperatura ambiente e da restrição alimentar sobre o desempenho e a composição da carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1117-1123, 2000.

LEANDRO, N. S. M.; GONZALES, E.; VAROLI JÚNIOR, J. C. V.; LODDI, M. M.; TAKITA, T. S. Incubabilidade e Qualidade de Pintos de Ovos Matrizes de Frangos

de Corte Submetidos a Estresse de Temperatura. **Brazilian Poultry of Science**, v. 2, n.1, 2000.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Scott's nutrition of the chicken**. 4.ed. Guelph: University Books, 2001. 591p.

LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler Incubation. 1. Effect of Elevated Temperature During Late Incubation on Body Weight and Organs of Chick. **Poultry Science**, v. 86, p. 685–2691, 2007.

LIMA, E. M. M.; SILVA, F. O. C; SEVERINO, R. S.; DRUMMOND, S. S.; ARAÚJO, C. L.; BOMBONATO, P. P.; SANTANA, M. I. Suprimento arterial para a bolsa cloacal em aves (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758) da linhagem Lhoman White LSL. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 95-100, 2008.

LOHAKARE, J. D.; RYU, M. H.; HAHN, T. W.; LEE, J. K.; CHAE, B. J. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, p. 10–19, 2005.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: MENDES, A. A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004, p.137-156.

MAHMOUD, K. Z.; EDENS, F. W.; EISEN, E. J. et al. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 35–42, 2004.

MALHEIROS, R. D.; MORAES, V. W.; COLLIN, A.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Free diet selection by broilers as influenced by raçãory macronutrient ratio and corticosterone supplementation. 1. Diet selection, organ weights, and plasma metabolites. **Poultry Science**, v. 82, p. 193-31, 2003.

MAXWELL, M. H.; ROBERTSON, G. W.; SPENCE, S.; MCCORQUODALE, C. C. Comparison of haematological values in restricted- and as libitumfed domestic fowls: white blood cells and thrombocytes. **British Poultry Science**, v. 31, n. 2, p. 399-405, 1990.

MCKEE, J. S.; HARRISON, P.C.; RISKOWSKI, R. L. Effects of supplemental ascorbic acid on the energy conversion of broiler chicks during heat stress and feed withdrawal. **Poultry Science**, v. 76, p. 1278-1286, 1997.

MILLER, L.; QURESHI, M. A. Introduction of heat shock proteins and phagocytic function of chicken macrophage following in vitro heat exposure. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 37, n. 1, p. 34-42, 1991.

MITCHELL, M. A.; CARLISLE, A. J. The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 101, n. 1, p. 137–142, 1992.

MOHAMMED, K. A.; EL-BOGHADY, A.; SOLIMAN, M. A. H.; ABD AL-GALIL, M. A.; ABD AL-ALEEM, N. M. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. **Egypt Poultry Science**, v. 31, n. 2, p. 379-392, 2011.

MONTASSIER, H. J. Fisiopatologia do sistema imune. In: Angelo Berchieri Júnior, Edir Nepomuceno Silva, José Di Fábio, Luiz Sesti e Marcelo A. Fagnani Zuanaze. (Org.). **Doenças das Aves**. 2 ed. Campinas: FACTA/APINCO, v. 1, 2009, p. 391-429.

MORITA, V. S.; BOLELI, I. C.; OLIVEIRA, J. A. Hematological and incubation parameters of chicks from young breeders eggs: variation with sex and incubation temperature. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 6, p. 606-612, 2010.

MUJAHID, A.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. **Poultry Science**, v. 86, p. 364-71, 2007.

NAZIROĞLU, M.; ŞAHİN, K.; ŞİMŞEK, H.; AYDILEK, N.; ERTAS, O. N. The effects of food withdrawal and darkening on lipid peroxidation of laying hens in high ambient temperatures. **Dtsch Tierärztl Wochenschr**, v. 107, p. 199-202, 2000.

NICHELMANN, M.; TZSCHENTKE, B. Thermoregulatory heat production in precocial avian embryos. **Ornis Fennica**, v. 76, p. 177-187, 1999.

NICHELMANN, M.; JANKE, O.; HOCHERL, J.; TSZCHENTKE, B. Development of physiological control systems in avian embryos. **New Biomed Science**. p. 15-25, 2001.

NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSZCZYK, S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. **Folia Biologica**, v. 60, p. 93-97, 2012.

OLIVEIRA NETO, A. R.; OLIVEIRA, R. F. M.; DONZELE, J. L.; ROSTAGNO, H. S.; FERREIRA, R. A. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dieta controlada e dois níveis de energia metabolizável. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 183-190, 2000.

OLIVEIRA, R. F. M.; OLIVEIRA, G. A.; DONZELE, J. L.; Avaliação do efeito da temperatura ambiente sobre as características de carcaça e o crescimento de órgãos de frangos de corte, dos 22 aos 42 dias. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002. Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2002. 1CD-ROM.

PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P. Evidence of amelioration of steroid mediated immunosuppression by ascorbic acid. **Poultry Science**, v. 63, p. 1262-1268, 1984.

PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P.; BRAKE, J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. **Journal Applied of Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1511-1516, 1985.

PATTERSON, P. H.; SIEGEL, H. S. Impact of cage density on pullet performance and blood parameters of stress. **Poultry Science**, v. 77, p. 32-40, 1998.

PLAVNIK, I.; YAHAV, S.; Effect of environmental temperature on broiler chickens subjected to growth restriction at an early age. **Poultry Science**, v. 77, p. 870-872, 1998.

POPE, C.R. Pathology of lymphoid organs with emphasis on immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 31-44, 1991.

REVIDATTI, F. A.; FERNANDEZ, R. J.; TERRAES, J. C.; SANDOVAL, G. L.; LUCHI, P. E. Modificaciones del peso corporal y indicadores de estrés en pollos parrilleros sometidos a inmovilización y volteo. **Revista Veterinaria Argentina**, v. 12, n. 1, 2002.

ROSALES, A. G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P. D.; FLETCHER, O. J.; MOHAMED, M. A.; BROWN, J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal Virus. **Avian Disease**. v. 33, p. 35-41, 1989.

SAHIN, K.; KÜÇÜK, O.; SAHIN, N.; SARI, M. Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, status, serum hormones, metabolite and mineral concentrations of japanese quails reared under heat stress (34°C). **International Journal of Vitamin Nutrition Research**, v. 72, p. 91-100, 2002.

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

SCOTT, T. R.; DUNNINGTON, E. A.; SIEGEL, P. B. *Brucella abortus* antibody response of White Leghorn chickens selected for high and low antibody responsiveness to sheep erythrocytes. **Poultry Science**, v. 73, p. 346-349, 1994.

SELIM, S. A.; GAAFAR, K. M.; EL-BALLAL, S. S. Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 264-271, 2012.

SHAFEY, T. M. Egg shell conductance, embryonic growth, hatchability and embryonic mortality of broiler breeder eggs dipped into ascorbic acid solution. **British Poultry Science**, v. 43, p. 135-140, 2002.

SILVA, R. D. M.; MENTEN, J. F. M.; CARDOSO, M. K. Suplementação de vitamina c associada à densidade de criação no desempenho de frangos de corte. **Science Agriculture**, v. 50, n.3 p.490-497, 1993.

SOUZA, L. F. A. **Exposição crônica e cíclica ao calor em frangos de corte: desempenho, metabolização dos nutrientes e atividade de enzimas pancreáticas**. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**, 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, p. 634-635.

TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; MURRAY, E. Force feeding methodology and equipment for poultry. **Poultry Science**, v. 63, n. 4, p.573-575, 1984.

THOMPSON, J. B.; WILSON, H. R.; VOITTE, R. A. Influence of high temperature stress of 16-day embryo on subsequent hatchability. **Poultry Science**. v. 55, p. 892-894, 1976.

TZSCHENTKE, B. Attainment of thermoregulation and its influence by environmental factors. **Poultry Science**, v. 86, p.1025-1036, 2007.

TZSCHENTKE, B.; BASTA, D.; JANKE, O.; MAIER, I. Characteristics of early development of body functions and epigenetic adaptation to the environment in poultry: Focused on development of central nervous mechanisms. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 15, p. 107–118, 2004.

TZSCHENTKE, B.; PLAGEMANN, A.; Imprinting and critical periods in early development. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 626-637, 2006.

TZSCHENTKE, B.; BASTA, D. Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: influence of epigenetic temperature adaptation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 131, p. 825–832, 2002.

TZSCHENTKE, B.; HALLE, I. Influence of temperature stimulation during the last 4 days of incubation on secondary sex ratio and later performance in male and female broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 50, p. 634-640, 2009.

UBA – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Norma Técnica de Produção Integrada de Frango**. São Paulo: UBA, 2009, 64 p.

UNI, Z.; GAL-GARBER, O.; GEYRA, A.; SKLAN, D.; YAHAV, S. Changes in growth and function of chick small intestine epithelium due to early thermal conditioning. **Poultry Science**, v. 80, n. 4, p. 438-445, 2001.

VATHANA, S.; KANG, K.; LOAN, C. P.; Effect of vitamin C supplementation on performance of broiler chickens in Cambodia. In: CONFERENCE ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH FOR DEVELOPMENT, 2002, Witzenhausen. **Proceedings...** Witzenhausen, 2002. p.72-78.

VAZ, R. G. M. V. **Nutrientes funcionais em rações de frangos de corte mantidos em ambiente de alta temperatura**. 2006. 48f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

VICK, S. V.; BRAKE, J. Effect of incubation humidity with respect to egg weight and flock age. **Poultry Science**, v. 65, (Suppl. 1), p. 130, 1986.

WILLEMSEN, H.; WILLEMS, Y.; FRANSENS, E.; WANG, Y.; DECUYPERE, E. Intermittent thermal manipulations of broiler embryos during late incubation and their

immediate effect on the embryonic development and hatching process. **Poultry Science**, v. 90, p. 1302-1312, 2011.

WILSON, J. X.; JAWORSKI, E. M. Effect of Oxygen on Ascorbic Acid Uptake and Concentration in Embryonic Chick Brain. **Neurochemical Research**, v. 17, p. 571–576, 1992.

YAHAV, S.; MCMURTRY, J. P. Thermotolerance acquisition in broiler chickens by temperature conditioning early in life – the effect of timing and ambient temperature. **Poultry Science**, v. 80, p. 1662-1666, 2001.

YAHAV, S.; SASSON, R. R.; SHINDER, D, The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. **Journal of Thermal Biology**. v. 29, p. 245–250, 2004.

YAHAV, S.; STRASCHNOW, A.; PLAVNIK, I.; HURWITZ, S. Blood system response of chickens to changes in environmental temperature. **Poultry Science**, v. 76, n. 4, p. 627-633, 1997.

YUNianto, V. D.; HAYASHI, K.; KANEDA, A.; OHTSUKA, A.; TOMITA, Y. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 77, p. 897-909, 1997.

ZAKARIA, A. H.; AL-ANEZI, M. A. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality and the body weights of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 75, p. 1204–1209, 1996.

FASE DE INCUBAÇÃO

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM OVOS INCUBADOS SOB ESTRESSE POR CALOR SOBRE PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO E QUALIDADE DOS PINTAINHOS¹

RESUMO - Ao ácido ascórbico (AA) têm sido atribuído efeitos positivos dose-dependentes sobre a eclodibilidade e o peso corporal na eclosão, com ou sem estresse térmico intermitente durante o período fetal. Ovos férteis de matrizes (Cobb®) foram usados para determinar se injeção pré-incubação de AA *in ovo* influencia a incubação e a qualidade dos pintainhos sob condições termoneutras e de estresse contínuo. Ovos não injetados e injetados com 0%, 2%, 4% e 6% AA/100µl de água foram incubados continuamente sob temperatura termoneutra (37,5°C) ou alta (39,0°C). Em todos os grupos experimentais, a temperatura da casca dos ovos (TCO) aumentou na segunda metade da incubação. Nos ovos não perfurados e nos injetados com água, a TCO foi maior sob incubação à 39°C do que à 37,5°C, mas não houve diferença entre essas temperaturas nos ovos injetados com AA. A perda de massa dos ovos e a condutância de suas cascas foram maiores nos ovos incubados a 39°C do que a 37,5°C. A taxa de eclosão dos ovos foi menor nos ovos injetados com AA. Os pesos do fígado e do saco de vitelo foram maiores e os do coração e moela menores nos pintainhos de ovos incubados à 39°C, mas não ocorreu efeito da temperatura de incubação sobre o peso dos pintainhos. Os dados mostram que as porcentagens de AA utilizadas afetaram a perda de calor por condução e a taxa de eclosão dos ovos, e que não minimizaram os efeitos da alta temperatura de incubação sobre o desenvolvimento hepático e cardíaco.

Palavras-chave: condutância, eclodibilidade, perda de massa, peso corporal, temperatura de casca

¹ Artigo submetido para Brazilian Journal Poultry Science

1 Introdução

Durante o desenvolvimento *in ovo*, o controle da temperatura corporal propriamente dito ainda não é exercido pelo embrião ou feto (Wekstein & Zolman, 1967, 1969; Freeman, 1971), o que os torna altamente dependentes da temperatura do ar da incubadora. Para que o desenvolvimento embrionário seja iniciado e mantido, é preciso que os ovos absorvam calor do ar da incubadora, enquanto que para que o subsequente desenvolvimento fetal ocorra, é necessário que os ovos percam calor para o ar da incubadora, uma vez que a taxa metabólica e a produção de calor fetal aumentam durante a segunda metade da incubação (French, 1997). Embora a casca exerça função de separar os meios interno e externo do ovo, ela não exerce total isolamento térmico, o que possibilita trocas de calor entre o ovo e o meio ambiente da incubadora, necessários para o desenvolvimento ontogenético *in ovo*; contudo, torna embriões e fetos vulneráveis à desvios de temperatura acima ou abaixo da temperatura ótima de incubação.

Do ponto de vista fisiológico e zootécnico, muito importante é o desenvolvimento de manejo que possibilite maximizar a obtenção de pintos de melhor qualidade, considerada aqui como pintos normais com maior potencial para expressar seu desempenho geneticamente determinado, frente ou não às condições ambientais adversas, incluindo desvios da temperatura ambiente. Temperatura de incubação acima da considerada ótima para aves domésticas (37-38°C, Romanoff, 1960; French, 1997) afeta a eclodibilidade e reduz a qualidade das aves na eclosão (Hagger *et al.*, 1986; French, 2000; Leksrisompong *et al.*, 2007; Willemsen *et al.*, 2011; Boleli & Queiroz, 2012) e seu crescimento pós-eclosão (Decuyper *et al.*, 1979; Geers *et al.*, 1982). Injeção de nutrientes *in ovo* pode ser um método alternativo para aumentar a eclodibilidade e a qualidade das aves na eclosão (Ohta *et al.*, 2001). Além de disso, esta técnica, tem sido utilizada para estudar os efeitos das vitaminas sobre a eclodibilidade dos ovos e o peso corporal dos pintos na eclosão (Robel & Christensen, 1991; Robel, 1993). O uso de AA (vitamina C) como aditivo nutricional durante a fase fetal tem mostrado efeitos positivos dose-dependentes dessa vitamina sobre a eclodibilidade e o peso corporal na eclosão (Zakaria & Al-anezi, 1996; Pires *et al.*, 2011; Ghonim *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 2011; Nowaczewski *et al.*, 2012) sob situações ou não de estresse intermitente. Falta na literatura conhecimento sobre os efeitos da injeção pré-incubação de AA em

ovos incubados ou não sob condições de estresse térmico contínuo sobre o desenvolvimento *in ovo* e a qualidade dos pintos na eclosão. Assim, o presente estudo analisou se injeção de AA intra ovo antes da incubação influencia a qualidade da incubação (temperatura e condutância da casca, perda de massa dos ovos, taxa de eclosão e mortalidade) e a qualidade dos pintos (peso corporal e dos órgãos e temperatura da superfície corporal) de ovos incubados ou não sob condições de estresse térmico contínuo.

2. Material e métodos

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (protocolo nº 7377/10), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Quinhentos ovos férteis de frango de corte (Cobb®) (Globoaves, Itirapina, SP), provenientes de matrizes com 47 semanas de idade, foram pesados e utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2, com 5 tratamentos (sem injeção, com injeção de água e injeção de 2%, 4% e 6% de AA em 100µl de água intra ovo) e 2 temperaturas de incubação (termoneutra: 37,5°C e quente: 39,0°C), com duas incubadoras/temperatura, cada uma com 50 ovos/tratamento, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de 67± 2g. As incubadoras (Premium Ecológica, IP200), com controle automático de temperatura e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas com 60% de umidade relativa até a transferência e com 70% nos dois últimos dias de incubação.

A injeção da solução foi realizada antes do início da incubação. Após a limpeza do local com etanol 100%, a casca dos ovos foi perfurada, com uma agulha estéril [Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2)]. A solução com AA (Synth, 99% de pureza) foi injetada no albúmen a, aproximadamente, 6 mm abaixo da casca. Os ovos foram posicionados de modo horizontal, e a solução foi aplicada no polo mais fino do ovo (contrário à câmara de ar). Após a injeção, o orifício foi fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. O AA foi diluído em água Mili-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido à sua foto sensibilidade.

As variáveis analisadas foram: temperatura da casca dos ovos, perda de

massa, condutância, temperatura corporal dos pintainhos, taxa de eclosão, mortalidade embrionária, duração da incubação, peso relativo do pintainho e pesos absolutos e relativos do fígado, saco de vitelo, coração e moela.

Temperatura da casca dos ovos

A TCO foi analisada em dois ovos/tratamento/temperatura/incubadora, totalizando 20 ovos. Os valores de TCO ao longo do período de incubação foram registrados por meio de mini-termopares tipo T (cobre-constant; Alutal). Os termopares foram fixados na lateral dos ovos, com auxílio de fita adesiva, cobrindo uma superfície circular de um cm de diâmetro. Os ovos foram colocados sobre as roldanas da incubadora com seu eixo longitudinal em posição horizontal. Os dados foram coletados e armazenados em um intervalo de 30 minutos, do primeiro dia de incubação até o 18º dia, armazenados em dataloggers e descarregados em um computador para posterior análise. Foi analisada a TCO durante os 18 dias de incubação e também durante as fases fetal (1-9 dias) e embrionária (10-18 dias).

Perda de massa e condutância dos ovos

A perda de massa foi calculada em porcentagem, a partir da diferença entre o peso do ovo antes do início da incubação e aos 18 dias de incubação. A condutância da casca foi calculada pela perda de massa (g) até a transferência/pressão de saturação de vapor (23,86 mm/Hg à 25°C).

Temperatura corporal e qualidade dos pitainhos

Registraram-se as temperaturas da asa, cabeça, canela e dorso através de um termômetro infravermelho de pintainhos machos, para obter-se a temperatura (T) superficial corporal média, que foi calculada pela fórmula: temperatura superficial média = (0,12 x Tasa) + (0,03 x Tcabeça) + (0,15 x Tcanela) + (0,70 x Tdorso), descrita por Richard (1971).

Os pesos frescos absolutos e relativos do fígado, saco de vitelo, coração e moela foram obtidos após a eclosão, a partir de oito pintainhos machos/tratamento, após a morte por deslocamento cervical seguido de decapitação. Os pesos relativos

dos órgãos foram calculados em relação ao peso corporal dos respectivos pintainhos.

Eclosão, mortalidade embrionária e duração da incubação

Avaliou-se a eclosão (número de pintainhos nascidos/número de ovos incubados), a mortalidade de acordo com o embriodiagnóstico (inicial (1-7 dias), intermediária (8-14 dias) e tardia (15-21 dias) e a duração de incubação (número de horas para a eclosão).

A partir do peso corporal absoluto (g) dos pintainhos recém-eclodidos, obtido após a secagem da penugem, foi calculado o peso relativo (%) dos mesmos em relação ao peso dos ovos (g).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS® (SAS Institute, 2002). Em caso de efeito significativo (probabilidade de 7%), a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey e também foram utilizados modelos de regressão: linear, quadrático e modelo cúbico, com a finalidade de verificar efeitos quanto aos níveis de aplicação de ácido ascórbico.

3. Resultados

Temperatura da casca dos ovos

A TCO nos dois períodos de incubação (1-9 e 10-18 dias) foi analisada, e foi significativamente maior ($P < 0,05$) na segunda metade do período de incubação (10-18 dias) do que na primeira (1-9 dias) (Fig. 1).

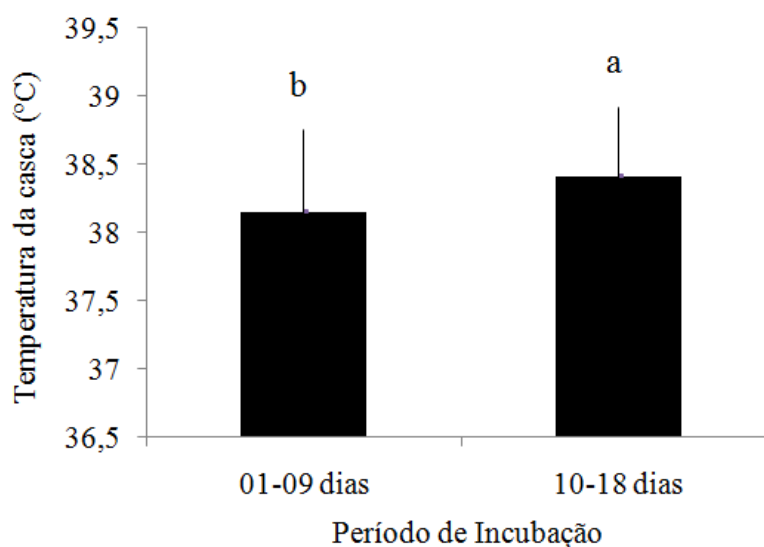


Figura 01. Temperatura da casca dos ovos de todos os tratamentos nas fases embrionária (01-09 dias) e fetal (10-18 dias) de incubação. a-b: médias com letras distintas diferem significativamente ($P \leq 0,05$).

A Figura 2 mostra a TCO injetados ou não com AA e incubados à temperatura termoneutra (37,5°C) e quente (39°C), estimadas com termopares mantidos em contato direto com a casca. Sob incubação à 37,5°C, a TCO não injetados (controle) ultrapassou os valores da temperatura de incubação a partir do 10º dia, atingindo valor máximo de aproximadamente 38,2°C nos 17º e 18º dias de incubação. Nos ovos injetados com água, a TCO ultrapassou o valor da temperatura de incubação apenas no 17º dia de incubação e em cerca de 0,2°C. A TCO injetados com AA permaneceu mais alta que a temperatura de incubação durante todo o período de incubação, atingindo valores médios acima da temperatura de incubação em torno de 0,5°C até o 10º dia de incubação e de 1,1°C por volta do 17º dia. Sob incubação à 39°C, a TCO não injetados (controle) permaneceu abaixo da temperatura de incubação até o 14º dia, enquanto que a TCO injetados com água (0% de AA) atingiu a temperatura de incubação apenas no 18º dia. A TCO injetados com 4% e 6% de AA permaneceu abaixo da temperatura de incubação ao longo de toda a incubação, atingindo a temperatura de incubação apenas aos 18 dias, enquanto que nos ovos injetados com 2% de AA a TCO ultrapassou a temperatura de incubação no 13º dia, permanecendo em torno de 0,2°C acima da mesma até o 18º dia.

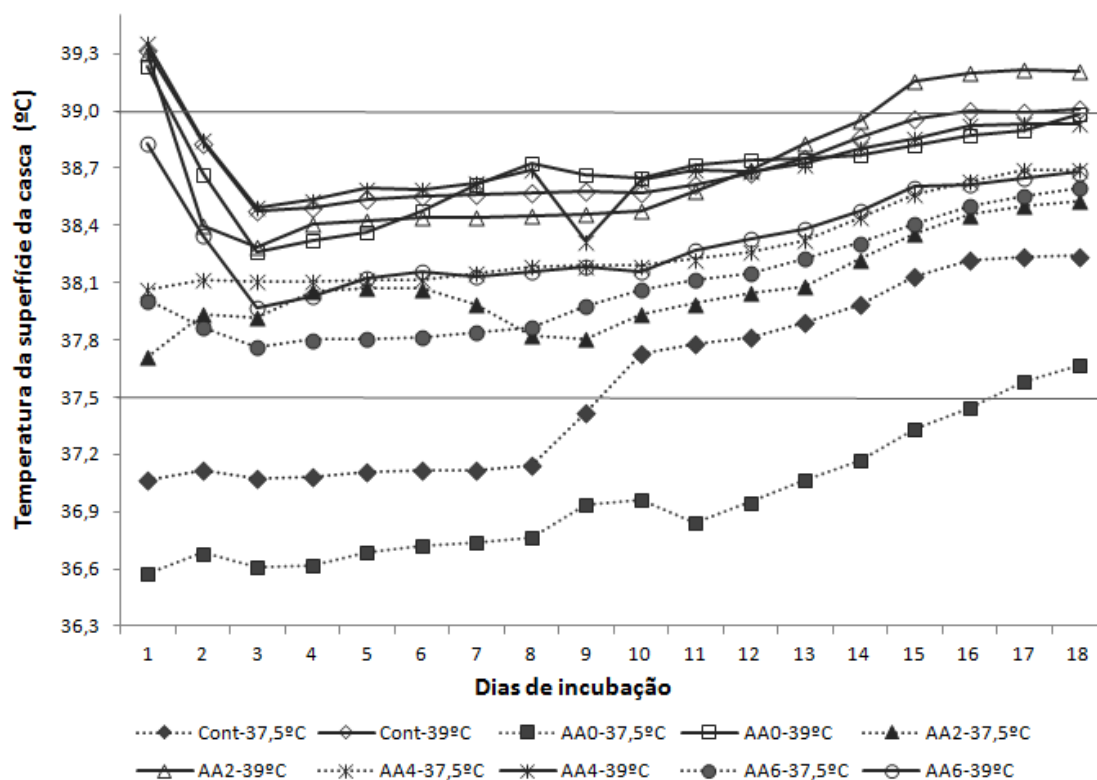


Figura 02. Temperatura da casca de ovos injetados ou não com ácido ascórbico e incubados sob 37,5°C e 39°C, de acordo com o dia de incubação. Linhas horizontais correspondem às temperaturas de incubação. Cont: controle, AA0, AA2, AA4 e AA6: injeção de 0, 2, 4 e 6% de ácido ascórbico.

Como mostrado na Tabela 1, houve interação significativa ($P < 0,05$) entre as temperaturas e os dias de incubação e entre as porcentagens de AA injetadas *in ovo* e as temperaturas de incubação para a TCO. Esta aumentou ($P < 0,05$) ao longo do período de incubação nas duas temperaturas de incubação e foi maior ($P < 0,05$) nos ovos incubados à 39°C do que nos ovos incubados à 37,5°C durante todo o período de incubação (Tab. 2). De acordo com a interação entre os tratamentos e as temperaturas de incubação (Tab. 3), a TCO não perfurados (controle) e dos injetados com água (0% de AA) foi maior sob incubação à 39°C do que à 37,5°C, enquanto que a TCO injetados com AA não foi alterada pela temperatura de incubação ($P < 0,05$). Além disso, não houve diferença na TCO entre os tratamentos quando os ovos foram incubados à 39°C ($P > 0,05$), mas quando a incubação ocorreu à 37,5°C, a TCO injetados com AA (2%, 4% e 6%) foi maior do que a dos ovos não perfurados (controle) e dos injetados com água (0% de AA) ($P < 0,07$).

Tabela 01. Efeitos da injeção de ácido ascórbico *in ovo*, das temperaturas de incubação e dos dias de incubação sobre a temperatura da casca dos ovos.

Fontes de variação	Probabilidade para a análise de variância
Temperaturas (TP)	<0.0001**
Dias de incubação (D)	<0.0001**
Tratamentos (T)	<0.0001**
TP x D	<0.0001**
T x TP	<0.0001**
T x D	0,6716 ^{NS}
Coeficiente de variação (%)	0,52

** (P≤0.05). ^{NS} não significativo.

Tabela 02. Desdobramento da interação entre temperaturas de incubação e dias de incubação para a temperatura da casca dos ovos.

Dias de Incubação	Temperatura de incubação		P
	Termoneutra	Quente	
1	37,50b	38,09a	<0.0001**
2	37,54b	38,63a	<0.0001**
3	37,50b	38,32a	<0.0001**
4	37,54b	38,37a	<0.0001**
5	37,56b	38,40a	<0.0001**
6	37,56b	38,45a	<0.0001**
7	37,54b	38,49a	<0.0001**
8	37,56b	38,53a	<0.0001**
9	37,67b	38,53a	<0.0001**
10	37,77b	38,50a	<0.0001**
11	37,79b	38,58a	<0.0001**
12	37,85b	38,62a	<0.0001**
13	37,92b	38,60a	<0.0001**
14	38,02b	38,77a	<0.0001**
15	38,16b	38,88a	<0.0001**
16	38,26b	38,92a	<0.0001**
17	38,32b	38,94a	<0.0001**
18	38,36b	38,16a	<0.0001**

** (P≤0.05). a-b: médias seguidas por letras distintas (linhas) diferem significativamente.

Tabela 03. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico *in ovo* e temperaturas de incubação para a temperatura da casca dos ovos durante a incubação.

Tratamentos	Temperatura de Incubação		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	37,56 bB	38,70a	0,0221**
Ácido Ascórbico-0%	36,96bB	38,66a	0,0023**
Ácido Ascórbico-2%	38,05A	38,70	0,1537 ^{NS}
Ácido Ascórbico-4%	38,25A	38,71	0,3017 ^{NS}
Ácido Ascórbico-6%	38,07A	38,30	0,5941 ^{NS}
P	0,0644*	0,8288 ^{NS}	

* P≤0,07. ** (P≤0.05). a-b, A-B: médias seguidas por letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente. ^{NS} não significativo.

Perda de massa, condutância dos ovos e temperatura corporal na eclosão

Os dados da Tabela 4 mostram que as porcentagens de AA injetadas não influenciaram significativamente (P>0,05) a perda de massa pelos ovos e a condutância de suas cascas, mas que ocorreu efeito significativo (P<0,05) da temperatura de incubação sobre essas variáveis, sendo que ambas foram maiores nos ovos incubados a 39°C do que a 37,5°C. Ocorreu interação significativa

($P < 0,07$) entre tratamentos e temperaturas de incubação para a temperatura média da superfície corporal dos pintos (Tab. 04), de acordo com a qual a temperatura corporal dos pintos de ovos injetados com água (0% de AA) foi menor quando os ovos foram incubados à temperatura quente ($P < 0,05$) (Tab. 05).

Tabela 04 – Efeitos da injeção de ácido ascórbico *in ovo* e das temperaturas de incubação sobre a perda de massa e a condutância da casca dos ovos e a temperatura da superfície corporal dos pintainhos na eclosão.

	Perda de massa (%)	Condutância	TSC ¹ (°C)
Tratamentos (T)			
Controle	8,86	0,371	31,21
Ácido Ascórbico -0%	9,11	0,382	30,69
Ácido Ascórbico -2%	8,80	0,369	30,74
Ácido Ascórbico -4%	9,08	0,380	30,92
Ácido Ascórbico -6%	9,63	0,404	30,79
Temperaturas (TP)			
Termoneutra	8,59b	0,360b	30,89
Quente	9,61a	0,403a	30,86
Probabilidades			
T	0,0977 ^{NS}	0,0982 ^{NS}	0,5075 ^{NS}
TP	<0,0001 ^{**}	<0,0001 ^{**}	0,5198 ^{NS}
T x TP	0,5271 ^{NS}	0,5227 ^{NS}	0,0660 [*]
Coefficiente de variação (%)	15,79	15,80	3,52

* $P \leq 0,07$. ** ($P \leq 0,05$). a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente. ^{NS} não significativo. ¹: temperatura da superfície corporal.

Tabela 05 - Desdobramento da interação entre a injeção de ácido ascórbico *in ovo* e as temperaturas de incubação para a temperatura da superfície corporal dos pintainhos pós-eclosão.

Tratamentos	Temperaturas		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	30,93	31,46	0,2659 ^{NS}
Ácido ascórbico-0%	31,31a	30,15b	0,0415 ^{**}
Ácido ascórbico-2%	30,68	30,78	0,8309 ^{NS}
Ácido ascórbico-4%	31,47	30,68	0,1804 ^{NS}
Ácido ascórbico-6%	30,44	31,03	0,1889 ^{NS}
P	0,3449 ^{NS}	0,1206 ^{NS}	
Efeito linear para os níveis	0,3005 ^{NS}	0,0926 ^{NS}	
Efeito quadrático para os níveis	0,6303 ^{NS}	0,6631 ^{NS}	
Efeito cúbico para os níveis	0,0992 ^{NS}	0,3990 ^{NS}	

** ($P \leq 0,05$). a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente. ^{NS} não significativo.

Taxa de eclosão, mortalidade embrionária e duração da incubação

Os dados da Tabela 06 mostram efeito significativo ($P < 0,05$) dos tratamentos sobre a taxa de eclosão, sendo esta maior nos ovos não injetados (controle) e menores nos ovos injetados, com a menor porcentagem de eclosão registrada para ovos injetados com 4% de AA. Não foram observados efeitos significativos dos tratamentos e das temperaturas ($P > 0,05$) sobre a mortalidade embrionária precoce

(0-7 dias), intermediária (8-14) e tardia (15-eclosão). Todavia, numericamente, verifica-se em todas as fases, que a mortalidade foi maior nos ovos injetados, do que nos não injetados e que a injeção de 4% de AA aumentou 80% a taxa de mortalidade precoce, em 67% a mortalidade intermediária e em 115% a mortalidade tardia em relação ao grupo controle, o que parece responder pela menor taxa de eclosão registrada para pintos de ovos injetados com 4% de AA. Além disso, a mortalidade embrionária precoce foi maior sob incubação à temperatura quente. Com relação à duração da incubação, houve influencia significativa ($P < 0,05$) das temperaturas de incubação sobre esta variável (Tab. 5), que foi maior sob incubação à 39°C do que à 37,5°C.

Tabela 06 – Efeitos da injeção de ácido ascórbico *in ovo* e das temperaturas de incubação sobre a taxa de eclosão, mortalidade embrionária e duração da incubação.

	Eclosão	Mortalidade embrionária (%)			DI ¹
	(%)	0-7 dias	7-14 dias	14-21 dias	(horas)
Tratamentos (T)					
Controle	86,72a	21,67	0,00	78,33	490,17
Ácido Ascórbico-0%	75,80b	31,77	22,86	45,47	491,91
Ácido Ascórbico-2%	70,40bc	21,50	20,00	45,17	492,66
Ácido Ascórbico-4%	63,20c	38,89	14,44	46,67	493,47
Ácido Ascórbico-6%	74,40b	23,24	9,05	63,71	490,52
Temperaturas (TP)					
Termoneutra	75,70	15,95	18,69	58,69	506,06 a
Quente	73,04	35,02	9,66	53,99	478,49 b
Probabilidades					
T	0,0028**	0,7553 ^{NS}	0,3859 ^{NS}	0,2387 ^{NS}	0,4566 ^{NS}
TP	0,3583 ^{NS}	0,1248 ^{NS}	0,3176 ^{NS}	0,7056 ^{NS}	<0,0001**
T x TP	0,5617 ^{NS}	0,7234 ^{NS}	0,2863 ^{NS}	0,2817 ^{NS}	0,4477 ^{NS}
CV (%)	9,27	104,85	161,33	53,49	2,23

** ($P \leq 0,05$). a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente. ^{NS} não significativo.
¹ duração de incubação. CV: coeficiente de variação.

Qualidade dos pintainhos na eclosão

A Tabela 07 apresenta os dados obtidos para as variáveis utilizadas como parâmetros de qualidade dos pintainhos. De acordo com os dados, o peso relativo dos pintainhos não foi influenciado significativamente ($P > 0,05$) pelos tratamentos e pelas temperaturas de incubação. Os pesos absoluto e relativo do saco de vitelo, fígado, coração e moela foram influenciados significativamente ($P < 0,05$) pelas

temperaturas de incubação, mas não pelos tratamentos. Os pesos absoluto e relativo do saco de vitelo e do fígado foram maiores e os do coração e da moela menores sob incubação a 39°C do que à 37,5°C.

Tabela 07 – Efeitos da injeção de ácido ascórbico *in ovo* e das temperaturas de incubação sobre a qualidade dos pintainhos machos na eclosão.

Tratamentos (T)	PC (%)	Fígado ¹	Saco de vitelo	Coração	Moela	Fígado ¹	Saco de vitelo	Coração	Moela
		(g)					(%)		
Controle	74,51	0,98 (0,90)	8,96	0,31	1,96	1,87 (2,34)	17,05	0,60	3,75
AA-0%	73,97	1,14 (0,96)	9,10	0,34	1,66	2,17 (2,35)	17,16	0,64	3,12
AA-2%	74,55	1,02 (0,92)	9,68	0,34	1,68	2,08 (2,41)	18,18	0,65	3,16
AA-4%	74,34	1,26 (1,00)	9,34	0,31	1,51	2,46 (2,37)	18,04	0,61	2,90
AA-6%	74,64	1,16 (0,97)	9,51	0,34	1,71	2,33 (2,39)	17,83	0,64	3,21
Temperaturas (TP)									
Termoneutra	74,42	0,98 (0,90) b	8,69b	0,37a	1,86a	1,99 (2,31) b	16,44b	0,70a	3,53a
Quente	74,39	1,25 (1,00) a	9,89a	0,30b	1,53b	2,39 (2,43) a	18,78a	0,56b	2,90b
P									
T	0,4179 ^{NS}	0,4564 ^{NS}	0,5933 ^{NS}	0,2427 ^{NS}	0,3227 ^{NS}	0,5369 ^{NS}	0,6345 ^{NS}	0,4253 ^{NS}	0,2877 ^{NS}
TP	0,8021 ^{NS}	0,0143 ^{**}	0,0002 ^{**}	<0,0001 ^{**}	0,0128 ^{**}	0,0002 ^{**}	<0,0001 ^{**}	<0,0001 ^{**}	0,0121 ^{**}
T x TP	0,2115 ^{NS}	0,7361 ^{NS}	0,5055 ^{NS}	0,6217 ^{NS}	0,6467 ^{NS}	0,5754 ^{NS}	0,5831 ^{NS}	0,5466 ^{NS}	0,7112 ^{NS}
CV (%)	2,88	16,31	14,50	16,42	30,92	5,25	13,52	15,66	30,65

CV=coeficiente de variação. PC: peso corporal. **: $P \leq 0,05$. a-b: médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem significativamente ($P \leq 0,05$). ¹: comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). ^{NS} não significativo. AA: ácido ascórbico

4. Discussão

A TCO é utilizada como indicativo da produção de calor metabólico intra ovo (Lourens *et al.*, 2007). No presente estudo, a TCO foi maior sob incubação a 39°C do que a 37,5°C ao longo da incubação, indicando que temperatura quente de incubação aumenta o metabolismo embrionário e fetal. A TCO aumenta na segunda metade da incubação, devido ao aumento da taxa metabólica e da produção de calor pelos fetos (Meijerhof, 1999; Tazawa & Whittow, 2000). De acordo com nossos dados, esse aumento na TCO na fase fetal ocorreu sob incubação à temperatura termoneutra e quente, independentemente da porcentagem de AA injetada *in ovo*, o que demonstra que o aumento de metabolismo durante o desenvolvimento *in ovo* não foi inviabilizado pelo aumento na temperatura de incubação e pela manipulação vitamínica dos ovos.

Transferência de energia em forma de calor, por condução, convecção e evaporação, ocorre quando há diferença de temperatura num meio ou entre meios diferentes (La Scala, 2003), o que significa que trocas de calor entre o interior do ovo e o ar da incubadora durante a incubação só ocorrem se e quando houver diferença de temperatura entre ambos. A perda de calor por condução corresponde ao calor do interior do ovo que se propaga através da casca até a sua superfície, a partir da qual será perdido principalmente por convecção, mas também por radiação (La Scala, 2003), o que possibilita que a temperatura da casca seja utilizada também como indicativo de perda de calor pelo ovo. Por sua vez, a perda de calor por evaporação corresponde ao calor perdido juntamente com a perda de massa (água) pelo ovo, e é proporcional a essa (La Scala, 2003). Segundo French (1997), os ovos absorvem calor da incubadora na primeira metade da incubação, se a temperatura do embrião for mais baixa do que a da incubadora, mas devem perder calor na segunda metade da incubação quando sua taxa metabólica e produção de calor aumentam. No presente estudo, sob incubação à temperatura termoneutra (37,5°C), ganho de calor na primeira metade da incubação e perda na segunda ocorreu apenas nos ovos não injetados e nos injetados com água, sendo que a perda de calor por condução deve ter sido menor nos últimos do que nos primeiros uma vez que a TCO ficou acima da temperatura de incubação a partir do 10° e do 17° dia de incubação, respectivamente. A TCO injetados com AA, por sua vez, permaneceu

acima da temperatura da incubadora ao longo de todo o período de incubação, indicando maior perda de calor por condução nesses ovos, do que nos ovos não injetados e nos injetados com água, o que parece responder pela redução da eclosão dos ovos injetados com AA, pois os ovos injetados com AA não perderam calor para o ar da incubadora durante a segunda metade da incubação.

Diferente do registrado para os ovos incubados à temperatura termoneutra, sob incubação à alta temperatura (39°C), os ovos não injetados e os injetados com água apresentaram maior temperatura da casca sob incubação a 39°C do que a 37,5°C por provavelmente não terem perdido calor por condução sob incubação a temperatura quente.

Condutância é a capacidade de troca de gases entre o ovo e o ambiente, e está relacionada com a perda de água (Campos *et al.*, 2003) e de calor metabólico (Hamidu *et al.*, 2007). Quanto maior for a condutância e a perda de água, maior a perda de calor dos ovos por evaporação. De acordo com nossos dados, comparados aos ovos incubados a 37,5°C, os ovos incubados a 39°C apresentaram maior perda de massa e maior condutância, mas não diferiram destes na taxa de eclosão. Isso indica que o aumento na perda de calor evaporativo pelos ovos incubados a temperatura quente, pode ter evitado os efeitos da ausência de perda de calor por condução (dados da TCO) sobre o desenvolvimento *in ovo* e, conseqüentemente, a redução da taxa de eclosão dos mesmos. A maior perda de massa pelos ovos incubados a 39°C deve ser resultante de aumento do processo evaporativo da água dos próprios constituintes do ovo e conseqüentemente do aumento de produção de água metabólica (Shafey, 2002).

Perda excessiva de água pelos ovos (>14%) causa morte embrionária por desidratação (Romanoff, 1930); contudo, perda de massa entre 11 e 12% do peso dos ovos até os 18 dias de incubação otimiza a eclodibilidade (Rosa *et al.*, 1999). No presente estudo, a perda de massa para os ovos incubados à 39°C foi de aproximadamente 9,6%, valor inferior a 14% e muito próximo dos registrados para ovos incubados a 37,8°C por Deeming (1996) e por Rosa *et al.* (2002) (10,8% e 10%, respectivamente), e não influenciou, portanto, a taxa de eclosão dos ovos.

Injeção de AA *in ovo* não interferiu na perda de calor evaporativo, mas a taxa de eclosão foi reduzida, e de forma mais acentuada pela injeção de 4% de AA.

Segundo Uni & Ferket (2003), alta concentração das soluções pode interferir no equilíbrio osmótico e afetar o desenvolvimento do embrião, e descreveram como limite máximo 800 mOsm. A solução aplicada *in ovo* no presente estudo tem uma osmolaridade inferior a este limite (113 mOsm), o que indica que a causa da menor eclosão dos ovos injetados com AA não envolveu alteração excessiva em equilíbrio osmótico dos ovos. Nossos dados, por outro lado, diferem dos obtidos por Pires *et al.* (2011), que observaram aumento na taxa de eclosão com injeção de 1% de AA *in ovo*. Efeito porcentagem-dependente de AA sobre a taxa de eclosão também registrado por Zakaria & Al-anezi (1996), Elibol *et al.* (2001), Ipek *et al.* (2004) e Nowaczewski *et al.* (2012). No entanto, os autores observaram melhora na eclodibilidade dos ovos com injeção entre 3 e 6 mg de AA, mas, realizaram o procedimento em fases mais adiantadas da incubação, o que mostra que o efeito dessa vitamina sobre o desenvolvimento *in ovo* varia com a concentração da solução e com a fase do desenvolvimento embrionário na qual a injeção é realizada.

Menor taxa de eclosão e maior incidência de anormalidades embrionárias têm sido relatadas para ovos submetidos a longo (French, 1994) ou curto tempo de hipertermia (French, 2000). Neste experimento, embora a perda de massa tenha sido maior e o período de incubação mais curto sob incubação a 39°C, a taxa de eclosão não foi alterada, indicando que incubação contínua dos ovos a temperatura de 39°C não se mostrou uma condição térmica limite para o desenvolvimento *in ovo*; o que corrobora com os resultados observados por Gualhanone (2002) para ovos incubados à 38,8°C.

Menor duração da incubação está associada com o aumento do ciclo mitótico e da taxa metabólica das células somáticas, acelerando assim o crescimento embrionário (Kojima *et al.*, 1996). De acordo com nossos resultados, a duração da incubação foi mais curta sob incubação a 39°C do que sob temperatura termoneutra, indicando que alta temperatura de incubação acelerou o desenvolvimento *in ovo*, o que é confirmado pela maior perda de calor por condução e evaporação e maior condutância, que indicam aumento de taxa metabólica. Entretanto, a duração do desenvolvimento ontogenético dos pintainhos não foi influenciada pela injeção de AA, reforçando os achados de El-Sheikh & El-Gammal (2000) e Mohammed *et al.*

(2011), que também não encontraram efeito da administração de AA *in ovo* sob a duração de incubação.

Perda de massa dos ovos até o momento da transferência é um parâmetro utilizado comercialmente para determinar o grau de desenvolvimento do embrião e tem sido relacionada com peso dos pintos na eclosão (Noy & Pinchasov, 1993). Apesar da perda de massa ter sido maior sob incubação a 39°C do que a 37,5°C, não houve diferença no peso corporal dos pintainhos entre as temperaturas. Isso pode ter sido resultante de mecanismos de regulação que limitam a dependência embrionária de variáveis ambientais, como a perda de massa durante a incubação (Simkiss, 1980 a, b), que tornam os embriões tolerantes a diferentes taxas de perda de água pelos ovos durante a incubação, variando a quantidade de água absorvida a partir do fluido do alantoide (Hoyt, 1979). Os valores encontrados para a relação entre o peso do ovo e o peso corporal dos pintos no presente estudo estão dentro do intervalo de 73 a 80% considerado por Henry & Burke (1997) como normal para pintos. No entanto, o peso hepático foi maior e os da moela e cardíaco menores sob incubação a 39°C. Segundo Lilja & Olsson (1987), o desenvolvimento ontogenético de aves selecionadas para rápido crescimento após a eclosão é caracterizado por preferencial crescimento dos órgãos de fornecimento (coração, intestino e fígado). Assim, o maior desenvolvimento hepático parece ser uma resposta adaptativa relacionada com o aumento de metabolismo e de velocidade de desenvolvimento embrionária e fetal, induzido pela alta temperatura de incubação. Chama atenção no presente estudo, todavia, que o aumento de metabolismo promovido pela incubação a 39°C ocorreu acompanhado de hipoplasia cardíaca, o que indica que temperatura quente de incubação não age de forma similar sobre os órgãos de fornecimento. Além disso, hipoplasia cardíaca pode causar um déficit cardíaco e comprometer a qualidade do seu desenvolvimento na fase pós-eclosão, propiciando, portanto, o aparecimento de síndrome ascítica nas aves ao longo da criação. Além disso, observou-se um menor aproveitamento do saco de vitelo pelos pintainhos incubados em alta temperatura. Semelhante a estes resultados, Molenaar *et al.* (2011) observaram maior peso do saco de vitelo para os pintainhos incubados em uma temperatura de 38,9°C, estes dados remetem a uma queda na qualidades dos

pintainhos, resultando em diferenças na mortalidade na primeira semana por infecções do umbigo/saco vitelino.

5. Conclusões

Injeção de AA in ovo reduziu a taxa de eclosão dos ovos alterando a perda de calor por condução e não minimizou os efeitos causados pela alta temperatura de incubação sobre os parâmetros de incubação e de qualidade dos pintos.

6. Referências bibliográficas

Campos EJ, Santos JEC. O efeito de linhagens sobre o desenvolvimento embrionário. In: Macari M, Gonzales E, editors. Manejo da Incubação. Campinas: Facta; 2003. p. 97-124.

Decuypere E, Nouwen EJ, Kühn ER, Geers R, Michels H. Differences in serum iodohormone concentration between chick embryos with and without the bill in the air chamber at different incubation temperatures. *General Comparative Endocrinology* 1979; 37:264-267.

Deeming DC. Turning helps hatchability. *Poultry Misset* 1996; 4(4): 27.

Elibol O, Türkoglu M, Akan M, Erol H. Inkubasyon sırasında Agr Yumurtalara Askorbik Asit Enjeksiyonunun Kulucka zelliklerine Etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2001; 25:245–248.

El-Sheikh TM, El-Gammal AM. Effect of the holding temperature, holding period as well as vitamin C supplementation on hatching traits of Dandarawi eggs. *Egypt Poultry Science Journal* 2000; 20:839- 855.

Freeman BM. Body temperature and thermoregulation. In: Bell DJ, Freeman BM, editors. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. London:Academic Press; 1971. p. 1115-1151.

French NA. Modeling incubator temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry Science* 1997; 76:124–133.

French NA. Effect of short periods of high incubation temperature on hatchability and incidence of embryo pathology of turkey eggs. *British Poultry Science* 2000; 41:377–382.

- French NA. Effect of incubation temperature on the gross pathology of turkey embryos. *British Poultry Science* 1994; 35:363–371.
- Geers R, Michels H, Tanghe P. Growth, maintenance requirements and feed efficiency of chickens in relation to prenatal environmental temperatures. *Growth* 1982; 46:26–35.
- Ghonim AIA, Awad AL, Fattouh MHA, El-Shhat AM. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. *Egypt Poultry Science* 2009; 29:1085-1099.
- Gualhanone A. Estudo da variação da temperatura da superfície da casca de ovos provenientes de matrizes de 30 e 60 semanas de idade durante a incubação. [Dissertação]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2002.
- Hagger C, Steiger-Staff D, Marguerat C. Embryonic mortality in chicken eggs as influenced by egg weight and inbreeding. *Poultry Science* 1986; 65:812–814.
- Hamidu JA, Fasenko GM, Feddes JJR, O’dea EE, Ouellette CA, Wineland MJ, Christensen VL. The effect of broiler breeder genetic strain and parent flock age on eggshell conductance and embryonic metabolism. *Poultry Science* 2007; 86:2420–2432.
- Henry MH, Burke WH. Sexual Dimorphism in broiler chick embryos and embryonic muscle development in late incubation. *Poultry Science* 1997; 77:728-36.
- Hoyt PF. Osmoregulation by avian embryos: the allantois functions like a toad’s bladder. *Physiological Zoology* 1979; 25:354–362.
- Ipek A, Sahan U, Ylmaz B. The effect of *in ovo* ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. *Archives Geflügelk* 2004; 68:132-135.
- Kojima T, Udagawa K, Onishi A, Iwahashi H, Komatsu Y. Effect of heat stress on development *in vitro* and *in vivo* and on synthesis of heat shock proteins in porcine embryos. *Molecular Reproduction Development* 1996; 43:452-557.
- La Scala JR. Aspectos físicos da incubação. In: Macari M, Gonzales E, editors. *Manejo da Incubação*. Campinas: Facta; 2003. p. 97-124.
- Leksrisompong N, Romero-Sanchez H, Plumstead PW, Brannan KE, Brake J. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poultry Science* 2007; 86:2685–2691.

- Lilja C, Olsson N. Changes in embryonic development associated with long-term selection for high growth rate in Japanese quail. *Growth* 1987;51:301–308.
- Lourens A, Brand van den H, Heetkamp MJW, Meijerhof R, Kemp B. Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. *Poultry Science* 2007; 86:2194–2199.
- Meijerhof R. Embryo temperature is the key factor in incubation. *World Poultry – Elsevier* 1999; 15:42-43.
- Mohammed KA, El-Boghdady A, Soliman MAH, Abd Al-Galil MA, Abd Al-Aleem NM. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. *Egypt Poultry Science* 2011; 31(2):379-392.
- Molenaar R, Anker van den I, Meijerhof R, Kemp B, Brand van den H. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration during incubation on the developmental and physiological status of broiler hatchlings in the perinatal period. *Poultry Science* 2011; 90:1257–1266.
- Nowaczewski S, Kontecka H, Krystianiak S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia Biologica (Krakow)* 2012; 60:93-97.
- Noy Y, Pinchasov Y. Effect of a single post hatch incubation of nutrients on subsequent early performance of broiler chicks and turkey poults. *Poultry Science* 1993; 72:1861-1866.
- Ohta Y, Kidd MT, Ishibashi T. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after *in ovo* administration of amino acids. *Poultry Science* 2001; 80:1430-1436.
- Pires DL, Sgavioli Sarah, Malheiros EB, Boleli IC . Acido ascórbico *in ovo* sobre a eclodibilidade de ovos. In: 21^o Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal – ALPA; 2011; Montevideo, Uruguay.
- Richards SA. The significance of changes in the temperature of the skin and body core of the chicken in the regulation of heat loss. *Journal of Physiology* 1971; 216:1-10.
- Robel EJ, Christensen VL. Increasing hatchability of turkey eggs by injecting eggs with pyridoxine. *British Poultry Science* 1991; 32:509–513.

- Robel EJ. Evaluation of egg injection method of pantothenic acid in turkey eggs and effect of supplemental pantothenic acid on hatchability. *Poultry Science* 1993; 72:1740–1745.
- Romanoff AL. Biochemistry and biophysics of the development hen's egg. *Memoirs of Cornell University Agricultural Experimental Station* 1930; 132:1-27.
- Romanoff AL. The extraembryonic membranes in the avian embryo, structural and functional development. New York (NY):MacMillan Company;1960.
- Rosa PS, Scheurmann GN, Figueiredo EAP. 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, São Paulo. Brasil. p.10.
- Rosa PS, Guidoni AL, Lima IL. 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* 2002; 31(2):1011-1016.
- SAS Institute. SAS Proprietary Software Release 9.2. 2002; SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Shafey TM. Egg shell conductance, embryonic growth, hatchability and embryonic mortality of broiler breeder eggs dipped into ascorbic acid solution. *British Poultry Science* 2002; 43:135-140.
- Simkiss K. Eggshell porosity and the water metabolism of the chick embryo. *Journal of Zoology* 1980a; 12:1-8.
- Simkiss K. Water and ionic fluxes inside the egg. *American Zoologist* 1980b; 20:385–393.
- Tazawa H, Whittow GC. Incubation physiology. In: *Sturkey's Avian Physiology*; 2000; Academic Press. p. 617-634.
- Uni Z, Ferket RP. Enhancement of oviparous species by *in ovo* feeding. US Patent 6.592.878 B2. North Carolina State University, Raleigh, NC; and Yissum Research Development Company of Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem. 31 Jul. 2001, 15 Jul. 2003.
- Wekstein DR, Zolman IF. Homeothermic development of the young chick. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1967;125:294-297.

Wekstein DR, Zolman JF. Ontogeny of heat production in chicks. Federation of American Societies for Experimental Biology 1969; 28:1023-1028.

Willemsen H, Li, Willems Y, Franssens E, Wang Y, Decuypere E. Intermittent thermal manipulations of broiler embryos during late incubation and their immediate effect on the embryonic development and hatching process. Everaert Poultry Science 2011; 90:1302-1312.

Zakaria AH, Al-Anezi MA, Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality and the body weights of broiler chickens. Poultry Science 1996; 75:1204–1209.

CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE VITAMINA C INTRA OVO SOBRE A ABSORÇÃO MINERAL DA CASCA DO OVO, MORTALIDADE EMBRIONÁRIA E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS EM PINTOS INCUBADOS EM TEMPERATURA QUENTE²

RESUMO - Estresse térmico na incubação altera a velocidade de desenvolvimento e o metabolismo embrionário, o que demanda otimização no transporte sanguíneo dos gases, principalmente na segunda metade da incubação, quando ocorre grande crescimento corporal. A suplementação com vitamina C tem sido associada à melhora no sistema imune e parâmetros respiratórios de frangos e à efeitos anti-estressores. Faltam dados dos efeitos do ácido ascórbico e da manipulação da temperatura de incubação sobre os parâmetros hematológicos de pintos. O presente estudo analisou se injeção pré-incubação de vitamina C influencia os parâmetros hematológicos e bioquímicos de pintos de corte de ovos incubados à temperatura termoneutra e quente. Quinhentos ovos férteis de matrizes de frango de corte (Cobb®) com 47 semanas de idade foram utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 5x2 (5 níveis de injeção de ácido ascórbico in ovo: 0%, 2%, 4% e 6% em 100µl de água; e 2 temperaturas de incubação: 37,5°C e 39,0°C), com duas incubadoras com 50 ovos/tratamento para cada temperatura de incubação. As incubadoras foram mantidas a 37,5° C (termoneutra) e a 39° C (quente), com 60% de umidade relativa, até o momento da transferência e 70% nos dois últimos dias. As porcentagens de vitamina C injetadas nos ovos não influenciaram os parâmetros hematológicos dos pintos, quando comparados ao grupo controle não injetado. Todavia, injeção de 4% de vitamina C aumentou os valores do número total de hemácias (RBC), valores de hematócrito (HCT) e teor de hemoglobina (HGB) dos pintos quando os ovos foram incubados sob temperatura quente. A porcentagem de fósforo (P) da casca dos ovos incubados à temperatura quente foi menor com 2% de vitamina C e aumentou com a porcentagem de 6%. Os dados indicam que manipulação nutricional do ovo pode ser realizada antes da incubação, que o ácido ascórbico influencia a absorção de

² Artigo aceito para a publicação na International Journal Poultry Science.

minerais da casca, e que injeção de 4% de vitamina C melhora o potencial de transporte de gases no sangue dos pintos oriundos de ovos incubados sob temperatura quente.

Palavras-chave: ácido ascórbico, eritrocitário, hemácia, hematócrito, hemoglobina

1. Introdução

Estresse térmico na incubação diminui a taxa de eclosão e a qualidade dos pintos influenciando no seu desempenho pós-eclosão (MOLENAAR et al., 2011). Ao mesmo tempo, entretanto, ainda na fase embrionária, ele pode imprimir na ave uma maior termotolerância à desvios da temperatura ambiente na fase de criação, que saiam de sua zona de tolerância térmica (TZSCHENTKE & PLAGEMANN, 2006; TZSCHENTKE, 2007). Do ponto de vista prático, de interesse para o setor avícola, seria a otimização da eclosão de pintos mais termotolerantes.

Alta temperatura acelera o desenvolvimento embrionário intra ovo, o que demanda aumento de metabolismo e, conseqüentemente, maior obtenção de oxigênio (O_2) e eliminação de dióxido de carbono (CO_2), para o que se faz necessário uma adaptação cardiovascular e/ou hematológica. O potencial respiratório, cardiovascular e metabólico pode ser analisado por parâmetros respiratórios e bioquímicos do sangue, os quais são particularmente sensíveis às mudanças de temperatura, o que os torna importantes indicadores das respostas fisiológicas da ave a agentes estressores. Estresse térmico pode ocasionar alterações nos valores de hematócrito (HCT), conteúdo de eritrócitos e teor de hemoglobina (HGB) no eritrócito (BORGES, et al., 2003b). Aumento na taxa respiratória pode resultar em perdas significativas de CO_2 fazendo com que a pressão parcial de CO_2 (pCO_2) diminua, levando à queda na concentração de ácido carbônico (H_2CO_3), hidrogênio (H^+) e elevação do pH sanguíneo. Em resposta, os rins aumentam a excreção de bicarbonato (HCO_3^-) e reduzem a excreção de H^+ para manter o equilíbrio ácido-base da ave (RONDÓN et al., 2000; BORGES, et al., 2003b; MUSHTAQ et al., 2005), sendo esta alteração do equilíbrio ácido-base denominada de alcalose respiratória. O sódio (Na^+), o potássio (K^+) e o cloreto (Cl^-) são íons fundamentais na manutenção da pressão osmótica e equilíbrio ácido-base dos líquidos corporais sendo o K^+ o principal cátion do fluido intracelular, enquanto

que o Na^+ e o Cl^- são os principais íons do fluido extracelular (RONDÓN et al., 2000). A concentração de K^+ e Na^+ no sangue diminui à medida que a temperatura aumenta (BORGES et al., 2002), enquanto que o Cl^- aumenta (BELAY & TEETER, 1993). Conseqüentemente, mudanças na homeostase de Na^+ , K^+ e Cl^- podem afetar as funções celulares (BORGES, et al., 2003b; MUSHTAQ et al., 2005).

Dados de literatura têm mostrado que vitamina C pode minimizar ou evitar os efeitos do estresse por calor (MAHMOUD et al., 2004), bem como melhorar o desenvolvimento das aves em ambiente termoneuro (PARDUE & THAXTON, 1986). Ela aumenta a absorção de ferro (Fe^+) e, conseqüentemente, ocorre o aumento no número total de hemácias (RBC) e HGB (MOURA & PEDROSO, 2002), o que concede melhora no potencial respiratório do animal. O embrião em desenvolvimento depende nutricionalmente da composição dos ovos, a qual pode, portanto, influenciar a taxa de eclosão e a qualidade dos pintos na eclosão (FINKLER et al., 1998). Assim, administração de nutrientes intra ovo pode ser um método alternativo para manipular-se a qualidade dos pintos e seu desempenho pós-eclosão. Se ácido ascórbico é um agente anti-estressor e se melhora o desempenho da ave (PARDUE & THAXTON, 1986; MAHMOUD et al., 2004), é possível que sua injeção intra ovo seja benéfica para embriões em condições termoneutras ou de estresse térmico. Embora existam registros na literatura do efeito do ácido ascórbico sobre o desenvolvimento de aves (ZAKARIA & AL-ANEZI, 1996; GHONIM et al., 2009; MOHAMMED et al., 2011; NOWACZEWSKI et al., 2012), os mesmos se referem a injeção de vitamina C intra ovo em fases mais adiantadas do desenvolvimento embrionário. Faltam dados na literatura sobre os efeitos da injeção de vitamina C intra ovo pré-incubação, sobre as características hematológicas dos pintos eclodidos de ovos incubados sob condições termoneutra e de estresse térmico. O presente estudo analisou os efeitos da injeção pré-incubação de vitamina C intra ovo sobre parâmetros hematológicos respiratórios e bioquímicos de pintos machos de ovos incubados sob condições termoneutra e de estresse por calor e sobre as características da casca ao final da incubação.

2. Material e métodos

Delineamento experimental

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (protocolo nº 7377/10), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Quinhentos ovos ($67\text{g} \pm 2\text{g}$) férteis de frango de corte (Cobb®), provenientes de matrizes com 47 semanas de idade, foram pesados e utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2, com 5 tratamentos (sem injeção, com injeção de água e injeção de 2%, 4% e 6% de ácido ascórbico em 100µl de água intra ovo) e 2 temperaturas de incubação (termoneutra: 37,0°C e quente: 39,0°C), com duas incubadoras com 50 ovos/tratamento para cada temperatura, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de $67 \pm 2\text{g}$. As incubadoras (Premium Ecológica, IP-200), com controle automático de temperatura e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas com 60% de umidade relativa até a transferência e com 70% nos dois últimos dias de incubação.

A injeção de solução aquosa de ácido ascórbico foi realizada antes do início da incubação e com os ovos mantidos na posição horizontal. Após desinfecção local da casca com etanol 100%, a solução de ácido ascórbico foi injetada no albúmen, aproximadamente a 1 cm da extremidade afilada do ovo e à 5mm de profundidade, utilizando-se agulha estéril [Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2")]. Após a injeção, o orifício foi fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. A solução de ácido ascórbico foi preparada com água Milli-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido a sua foto sensibilidade, pouco antes da aplicação.

Parâmetros sanguíneos

As variáveis sanguíneas analisadas foram: número total de hemácias [RBC (n° células/ mm^3)], valores de hematócrito [HCT (% PCV)], teores de hemoglobina [HGB (g/dL)], pH, pCO_2 (mmHg), pO_2 (mmHg), BE_{ecf} (mmol/l), TCO_2 (mmol/l), sO_2 (%), Na^+ (mmol/l), K^+ (mmol/l), Ca_i (mmol/l), HCO_3^- (mmol/l), glicose (mg/dL).

Para as análises sanguíneas foram utilizados oito pintos por tratamento. O sangue foi coletado da veia jugular e imediatamente analisados com heparina como anticogulante, com exceção do RBC, onde o sangue foi mantido em tubo plástico

tipo “ependorf” contendo 15µl de anticoagulante/1 ml de sangue (Glistab, cat. 29, Labtest Diagnóstica) em gelo para serem utilizados nas análises. As contagens do número de hemáceas (RBC, nº de células/mm³) foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando amostras de sangue diluídas (1:100) com solução de Natt & Henrick (1952), de acordo com Sterzo (2007). Os dados dos demais parâmetros sanguíneos foram obtidos utilizando-se analisador clínico portátil (i-STAT[®]Co. – Abbott Laboratories – EUA, cartucho Cg8+[®]). Os valores de pH, pCO₂, pO₂ foram corrigidos pela temperatura superficial média (TSM) calculada de acordo com Malheiros et al. (2000).

Porcentagem, espessura e minerais da casca

A porcentagem, espessura e composição mineral das cascas ao final da incubação foram obtidos a partir da análise de 10 ovos por tratamento, ambos após a remoção das membranas interna e externa e a cutícula, realizada seguindo metodologia de Rahn et al. (1981), mantendo fragmentos da casca em solução aquosa fervente de NaOH 0,5%. Em seguida, as cascas foram lavadas em água destilada e mantidas à temperatura ambiente durante 72 horas para secagem e posterior análises. O peso das cascas foi dado como porcentagem em relação ao peso do ovo pré-incubação. A espessura de casca foi obtida a partir da mensuração de fragmentos da região equatorial das cascas, utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo – resolução 0,001 mm). A composição mineral (porcentagem de cálcio, fósforo e cinzas) das cascas foram realizadas de acordo com metodologias descritas por Silva & Queiroz (2002).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS[®] (SAS Institute, 2002). Em caso de efeito significativo, a comparação de médias foi realizada a 5% de probabilidade através dos contrastes ortogonais polinomiais: contraste 1 – comparação entre o tratamento controle versus a média dos tratamentos com 0%, 2%, 4% e 6% de ácido ascórbico; contrastes 2, 3 e 4 - foram utilizados três modelos de regressão: modelo

linear, modelo quadrático e modelo cúbico, com a finalidade de verificar efeitos quanto aos níveis de aplicação de ácido ascórbico.

3. Resultados

Parâmetros hematológicos

Os efeitos das diferentes porcentagens de ácido ascórbico injetados intra ovo sobre os parâmetros respiratórios de pintos eclodidos de ovos incubados a 37,5°C e 39°C (temperaturas termoneutra e quente, respectivamente) são mostrados na Tabela 1. Houve interação significativa ($P \leq 0,05$) entre as porcentagens de ácido ascórbico e as temperaturas de incubação para os três parâmetros eritrocitários analisados – número total de hemácias (RBC), valores de hematócrito (HCT) e teores de hemoglobina (HGB).

Tabela 01. Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre os parâmetros eritrocitários de pintos de corte.

Tratamentos	RBC ¹	HCT	HGB
	(células/mm ³)	(%PCV)	x(g/dL)
Ácido ascórbico (AA)			
Controle	352.920 (12,58)	15,36	5,24
AA-0%	373.511 (12,63)	14,00	4,75
AA-2%	194.400 (12,05)	14,17	4,80
AA-4%	642.300 (12,59)	15,67	5,33
AA-6%	431.000 (12,73)	13,77	4,68
Temperaturas (TP)			
Termoneutra	298.527 (12,20)	14,90	5,06
Quente	491.721 (12,81)	14,41	4,90
Probabilidade para a análise de variância			
Ácido ascórbico	0,2746 ^{NS}	0,8123 ^{NS}	0,7972 ^{NS}
Temperatura	0,0089*	0,8441 ^{NS}	0,8703 ^{NS}
Interação AA x TP	0,0154*	0,0465*	0,0466*
Coeficiente de variação (%)	6,64	26,15	26,31

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). AA=ácido ascórbico.

De acordo com o desdobramento da interação (Tab. 2), os valores de RBC foram maiores ($P \leq 0,05$) sob incubação a 39°C do que a 37,5°C apenas nos pintos de ovos injetados com 4% de ácido ascórbico. Além disso, não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) nos valores de RBC entre os pintos de ovos injetados com as

diferentes porcentagens de ácido ascórbico e os não injetados, em nenhuma das temperaturas de incubação analisadas.

Tabela 02. Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico e temperatura de incubação para contagem de células vermelhas (RBC¹, células/mm³) de pintos de corte.

Tratamentos	Temperaturas (°C)		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	293.533 (12,35)	442.000 (12,93)	0,2891 ^{NS}
AA-0%	474.800 (12,95) **	292.480 (12,38) **	0,3153 ^{NS}
AA-2%	129.600 (11,59) **	226.800 (12,28) **	0,2469 ^{NS}
AA-4%	279.040 (11,54) b **	1098.400 (13,90) a **	0,0002*
AA-6%	280.800 (12,50) **	581.200 (12,95) **	0,4505 ^{NS}
Probabilidade para os contrastes			
Controle vs níveis	0,6848 ^{NS}	0,8721 ^{NS}	
Linear para os níveis	0,5606 ^{NS}	0,0127*	
Quadrático para os níveis	0,0426*	0,1242 ^{NS}	
Cúbico para os níveis	0,9017 ^{NS}	0,001*	

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade, a-b comparação na linha. ** médias estatisticamente iguais a do controle pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). AA=ácido ascórbico.

Adicionalmente, houve efeito quadrático dos níveis de inoculação de ácido ascórbico sobre os valores de RBC, sob incubação à temperatura termoneutra ($P \leq 0,05$) e efeito cúbico dos níveis de inoculação de ácido ascórbico sob temperatura quente ($P \leq 0,05$) (Fig. 01). A injeção de apenas água (0% de ácido ascórbico) aumentou o RBC na temperatura termoneutra, enquanto, que na quente observou-se o maior RBC para o nível de 4% (Fig. 1).

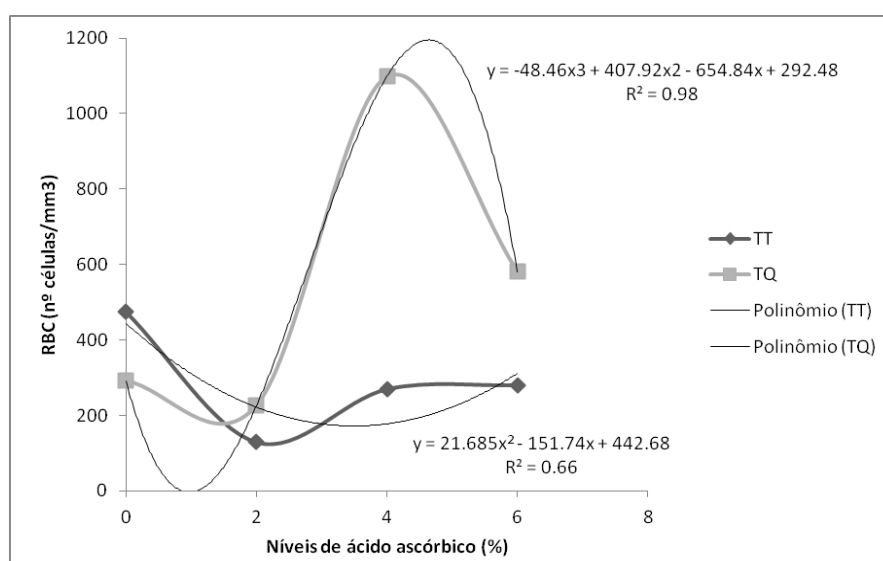


Figura 01. Número total de hemácias (RBC) de pintos de ovos incubados sob temperatura termoneutra (TT) e quente (TQ) em função dos níveis de ácido ascórbico injetados nos ovos.

As Tabelas 03 e 04 mostram o desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para o HCT e a HGB. Não ocorreu diferença significativa ($P \geq 0,05$) nos valores de HCT e HGB entre pintos de ovos não injetados e os pintos de ovos injetados com as diferentes porcentagens de ácido ascórbico, em nenhuma das temperaturas analisadas. Também não ocorreu contraste significativo ($P \geq 0,05$) entre tratamento controle e porcentagens de ácido ascórbico e regressão significativa ($P \geq 0,05$) para porcentagens de ácido ascórbico para os valores de HCT e HGB. Todavia, os valores de HCT e HGB dos pintos de ovos injetados com 4% de ácido ascórbico foram maiores ($P \leq 0,05$) sob incubação a 39°C do que a 37,5°C.

Tabela 03. Desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para HCT¹ (%) de pintos de corte.

Tratamentos	Temperaturas (T)		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	17,50 (17,40)	14,50 (13,67)	0,1171 ^{NS}
AA-0%	11,00 (14,50) **	10,00 (13,50) **	0,7957 ^{NS}
AA-2%	13,00 (14,25) **	14,00 (14,00) **	0,9404 ^{NS}
AA-4%	10,00 (12,00) b **	24,00 (18,60) a **	0,0150*
AA-6%	16,50 (15,33) **	11,00 (12,43) **	0,1822 ^{NS}
Probabilidade para os contrastes			
Controle vs níveis	0,1401 ^{NS}	0,5874 ^{NS}	
Linear para os níveis	0,9815 ^{NS}	0,8778 ^{NS}	
Quadrático para os níveis	0,4376 ^{NS}	0,1171 ^{NS}	
Cúbico para os níveis	0,4350 ^{NS}	0,1240 ^{NS}	

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade, a-b comparação na linha. ** média estatisticamente igual a do controle pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, comparação na coluna.

¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). AA=ácido ascórbico.

Tabela 04. Desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para HGB¹ x(g/dL) de pintos de corte.

Tratamentos	Temperaturas (T)		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	5,95 (5,92)	4,95 (4,67)	0,1238 ^{NS}
AA-0%	3,70 (4,90) **	3,40 (4,60) **	0,8203 ^{NS}
AA-2%	4,40 (4,83) **	4,75 (4,75) **	0,9477 ^{NS}
AA-4%	3,40 (4,07) b **	8,20 (6,34) a **	0,0146*
AA-6%	5,65 (5,21) **	3,75 (4,21) **	0,1784 ^{NS}
Probabilidade para os contrastes			
Controle vs níveis	0,1381 ^{NS}	0,6093 ^{NS}	
Linear para os níveis	0,9569 ^{NS}	0,8878 ^{NS}	
Quadrático para os níveis	0,4423 ^{NS}	0,1164 ^{NS}	
Cúbico para os níveis	0,4412 ^{NS}	0,1177 ^{NS}	

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade, a-b comparação na linha. ** média estatisticamente igual a do controle pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). AA=ácido ascórbico

Parâmetros bioquímicos do sangue

Os valores registrados para pH, pCO₂, pO₂, BE_{ecf}, TCO₂, sO₂, HCO₃⁻ são mostrados na Tabela 5. Nenhuma dessas variáveis foi influenciada pelas diferentes porcentagens de ácido ascórbico injetadas nos ovos e nem pelas temperaturas de incubação (P≥0,05).

Tabela 05. Efeitos das porcentagens de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre as variáveis do sangue venoso de pintos de corte.

Tratamentos	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	BE _{ecf} (mmol/l)	TCO ₂ (mmol/l)	sO ₂ (%)	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)
Ácido ascórbico (AA)							
Controle	7,43	20,97	19,00	-10,47	15,93	50,20	15,07
AA-0%	7,46	19,11	19,60	-10,71	15,14	59,00	14,53
AA-2%	7,43	20,27	17,87	-10,71	15,50	46,79	14,70
AA-4%	7,47	18,74	18,08	-10,15	15,54	53,00	14,77
AA-6%	7,45	19,19	18,78	-11,20	15,13	53,00	14,39
Temperaturas (TP)							
Termoneutra	7,44	20,74	19,03	-10,45	15,93	52,14	15,19
Quente	7,46	18,92	18,33	-10,83	15,11	51,23	14,31
Probabilidade para a análise de variância							
Ácido ascórbico	0,6424 ^{NS}	0,2136 ^{NS}	0,8337 ^{NS}	0,9645 ^{NS}	0,8548 ^{NS}	0,5482 ^{NS}	0,9060 ^{NS}
Temperatura	0,4346 ^{NS}	0,0891 ^{NS}	0,7184 ^{NS}	0,8522 ^{NS}	0,5107 ^{NS}	0,6821 ^{NS}	0,4470 ^{NS}
Interação AA x TP	0,0071*	0,0939 ^{NS}	0,0925 ^{NS}	0,0618 ^{NS}	0,0748 ^{NS}	0,1518 ^{NS}	0,0736 ^{NS}
CV (%)	0,96	16,74	20,62	-36,32	20,61	27,13	21,33

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação. AA=ácido ascórbico.

Contudo, ocorreu interação significativa ($P \leq 0,05$) entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas para o pH sanguíneo, cujos dados mostram que os pintos de ovos injetados com 6% de ácido ascórbico apresentaram maior valor de pH sob incubação à temperatura quente, do que à temperatura termoneutra (Tab. 6).

Tabela 06. Desdobramento da interação entre porcentagens de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para pH sanguíneo de pintos de corte.

Tratamentos	Temperaturas (T)		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	7,45	7,42	0,4167 ^{NS}
AA-0%	7,44 **	7,47 **	0,5279 ^{NS}
AA-2%	7,47 **	7,40 **	0,0694 ^{NS}
AA-4%	7,46 **	7,48 **	0,7212 ^{NS}
AA-6%	7,39 b **	7,52 a **	0,0012*
Probabilidade para os contrastes			
Controle vs níveis	0,7378 ^{NS}	0,1044 ^{NS}	
Linear para os níveis	0,3720 ^{NS}	0,1168 ^{NS}	
Quadrático para os níveis	0,1515 ^{NS}	0,0429*	
Cúbico para os níveis	0,8186 ^{NS}	0,1015 ^{NS}	

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade, a-b comparação na linha. ** média estatisticamente igual a do controle pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. AA=ácido ascórbico.

Além disso, ocorreu efeito quadrático significativo ($P \leq 0,05$) das porcentagens de ácido ascórbico sobre o pH do sangue dos pintos de ovos incubados a 39°C (Fig. 2), sendo que os menores valores foram registrados para os pintos de ovos injetados com 2% de ácido ascórbico e os maiores para os pintos de ovos injetados com 6%.

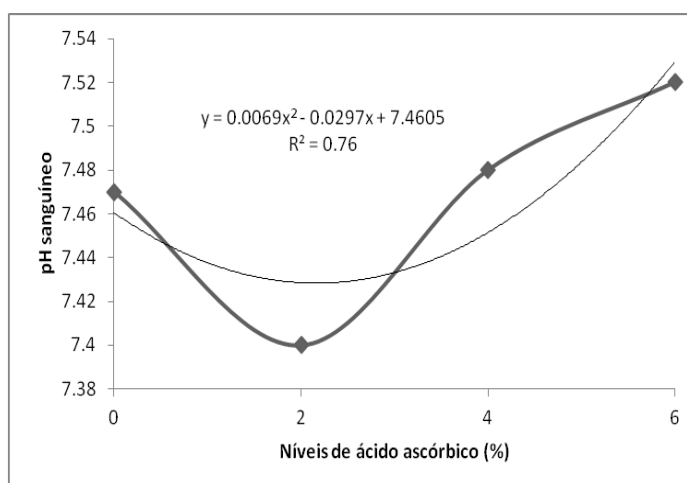


Figura 02. pH sanguíneo de pintos de ovos incubados à temperatura quente em função dos níveis de ácido ascórbico injetados nos ovos.

Adicionalmente, não foi registrado diferença significativa ($P \geq 0,05$) no pH do sangue entre pintos de ovos injetados e não injetados com ácido ascórbico. Com relação às concentrações de Na^+ , K^+ , cálcio ionizado (Cai) e glicose (Tab. 7), não foram registrados efeitos significativos ($P \geq 0,05$) das porcentagens de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação, e nem interação significativa entre esses dois fatores para tais variáveis sanguíneas.

Tabela 07. Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre íons Na^+ e K^+ , Cai e glicose no sangue venoso de pintos de corte.

Tratamentos	Na^+ (mmol/l)	K^+ (mmol/l)	Cai (mmol/l)	Glicose (mg/dL)
Ácido ascórbico (AA)				
Controle	130,00	4,53	0,595	156,87
AA-0%	129,75	3,63	0,320	136,11
AA-2%	129,31	4,32	0,486	156,50
AA-4%	130,92	4,04	0,540	149,50
AA-6%	128,17	4,91	0,360	141,11
Temperaturas (TP)				
Termoneutra	129,41	4,17	0,483	156,53
Quente	129,56	4,55	0,434	143,95
Probabilidade para a análise de variância				
Ácido ascórbico	0,1362 ^{NS}	0,2648 ^{NS}	0,3577 ^{NS}	0,3054 ^{NS}
Temperatura	0,7539 ^{NS}	0,2816 ^{NS}	0,4384 ^{NS}	0,1919 ^{NS}
Interação AA x TP	0,7025 ^{NS}	0,8730 ^{NS}	0,1602 ^{NS}	0,4487 ^{NS}
Coeficiente de variação (%)	2,28	32,59	40,55	18,51

^{NS} não significativo. AA=ácido ascórbico.

Porcentagem, espessura e minerais da casca

Como mostrado na Tabela 8, a porcentagem, a espessura e a quantidade de cinzas e cálcio da casca dos ovos ao final da incubação não foram influenciadas significativamente ($P \geq 0,05$) pelas porcentagens de ácido ascórbico e nem pelas temperaturas de incubação; mas, houve interação significativa entre esses fatores para a porcentagem de P na casca.

Tabela 08 – Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas de incubação sobre os parâmetros de qualidade da casca do ovo ao final da incubação.

Tratamentos	Porcentagem (%)	Espessura (mm)	Cinzas (%)	Fósforo (%)	Cálcio (%)
Ácido ascórbico (AA)					
Controle	8,01	0,534	96,89	0,154	38,23
AA-0%	7,98	0,542	96,92	0,156	38,16
AA-2%	8,02	0,540	96,95	0,146	38,12
AA-4%	8,32	0,555	96,87	0,147	38,17
AA-6%	8,29	0,555	97,18	0,146	38,30
Temperaturas (TP)					
Termoneutra	8,20	0,544	96,99	0,150	38,21
Quente	8,04	0,546	96,95	0,150	38,19
Probabilidade para a análise de variância					
Ácido ascórbico	0,4925 ^{NS}	0,3928 ^{NS}	0,1109 ^{NS}	0,4852 ^{NS}	0,3025 ^{NS}
Temperatura	0,3518 ^{NS}	0,7417 ^{NS}	0,4364 ^{NS}	0,9253 ^{NS}	0,6187 ^{NS}
Interação AA x TP	0,1001 ^{NS}	0,1385 ^{NS}	0,8181 ^{NS}	0,0197*	0,0923 ^{NS}
CV (%)	7,96	6,07	0,34	13,33	0,59

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade. CV=coeficiente de variação. AA=ácido ascórbico.

De acordo com o desdobramento desta interação (Tab. 9), houve diferença na porcentagem de P na casca entre ovos incubados a 37,5°C e 39°C, mas somente nos ovos injetados com 0 e 2% de ácido ascórbico ($P \leq 0,05$). A porcentagem de P foi maior sob incubação a 39°C do que a 37,5°C nos ovos injetados com água (0% de ácido ascórbico) e menor nos ovos que receberam 2% de injeção de ácido ascórbico.

Tabela 09. Desdobramento da interação entre tratamentos e temperaturas para a porcentagem de fósforo na casca dos ovos ao final da incubação.

Tratamentos	Temperaturas		P
	Termoneutra	Quente	
Controle	0,156	0,153	0,7899 ^{NS}
AA-0%	0,144 b **	0,167 a **	0,0364*
AA-2%	0,160 a **	0,131 b **	0,0096*
AA-4%	0,147 **	0,148 **	0,9418 ^{NS}
AA-6%	0,140 **	0,150 **	0,3460 ^{NS}
Probabilidades para os contrastes			
Controle vs níveis	0,3941 ^{NS}	0,6394 ^{NS}	
Efeito linear para os níveis	0,4985 ^{NS}	0,2540 ^{NS}	
Efeito quadrático para os níveis	0,1769 ^{NS}	0,0130 *	
Efeito cúbico para os níveis	0,3531 ^{NS}	0,0570 ^{NS}	

^{NS} não significativo, * significativo ao nível de 5% de probabilidade, a-b comparação na linha. AA=ácido ascórbico.

Além disso, ocorreu efeito quadrático significativo ($P \leq 0,05$) das porcentagens de ácido ascórbico sobre as porcentagens de fósforo na casca ao final da incubação (Fig. 3), para a temperatura quente, sendo as menores porcentagens de fósforo na casca ao final da incubação registradas para os ovos injetados com água (0% de ácido ascórbico).

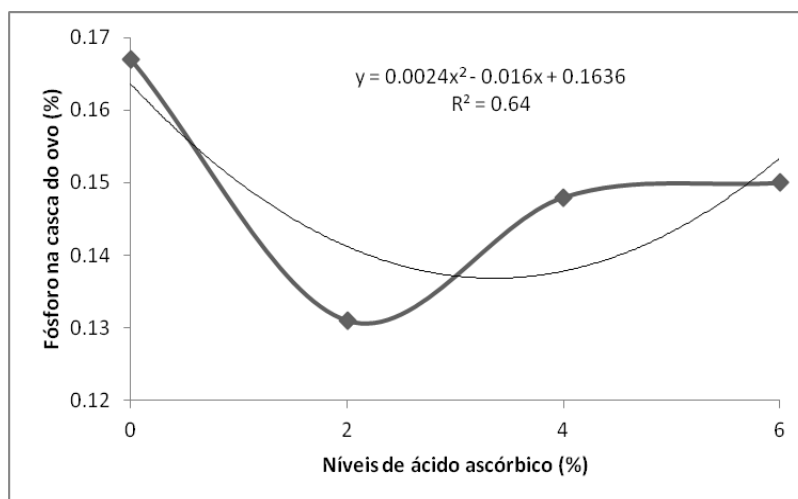


Figura 03. Fósforo na casca dos ovos ao final da incubação à temperatura quente em função dos níveis de ácido ascórbico injetados nos ovos.

4. Discussão

A segunda metade da incubação dos ovos de aves é caracterizada por intenso crescimento fetal, que envolve aumento do metabolismo (TULLETT, 1990,

FRENCH, 1997, MEIJERHOF, 1999; TAZAWA & WHITTOW, 2000) e, conseqüentemente, aumento na demanda por trocas gasosas (obtenção de O₂ e eliminação CO₂), a qual se torna maior sob incubação a temperaturas acima da termoneutra (quente). Considerando que o ácido ascórbico está relacionado com aumento nos valores de RBC, HCT e HGB (MOURA & PEDROSO, 2002), o presente estudo analisou se injeção de ácido ascórbico intra ovo influenciaria tais variáveis hematológicas respiratórias e variáveis bioquímicas relacionadas com o metabolismo respiratório (pH, pCO₂, pO₂, BE_{ecf}, TCO₂, sO₂, HCO₃⁻, Na⁺, K⁺, Cai e glicose), de modo a minimizar os efeitos da aumentada demanda metabólica e conceder aos pintos de ovos incubados sob condições termoneutras e de estresse por calor um maior potencial respiratório.

Pintos de ovos injetados com 4% de ácido ascórbico apresentaram valores maiores de RBC, HCT e HGB quando a incubação ocorreu à temperatura quente, indicando que ocorreu melhora no potencial de trocas gasosas do sangue destes pintos resultante, conseqüentemente, de aumento no processo hematopoiético e potencial respiratório. Aumento dos valores de HCT e HGB podem estar relacionados com a desidratação (CAMPBELL, 1995). Entretanto, embora a perda de massa pelos ovos seja maior sob incubação a 39°C, não observou-se influencia dessa temperatura sobre o peso relativo dos pintos na eclosão e nem a presença de pintos com características de desidratação (Sgavioli et al., submetido), o que nos leva a descartar a possibilidade de desidratação. Do ponto de vista fisiológico, essa maior sensibilidade embrionária parece explicitada pela menor eclodibilidade para ovos injetados com 4% de ácido ascórbico intra ovo, observada por Sgavioli et al. (submetido). Embora os autores tenham registrado redução de 26% na eclodibilidade desses ovos, não se pode deixar de considerar que valores maiores de RBC, HGB e HCT concedem maior potencial de trocas gasosas aos pintos, o que sugere a possibilidade dos pintos de ovos injetados com 4% de vitamina C apresentarem maior termotolerância, o que será analisado pelos autores nos próximos estudos. Ghonim et al., (2009) e Pires et al. (2011) não registraram efeitos da injeção de ácido ascórbico sobre os parâmetros eritrocitários de pintos de corte; no entanto, os autores só analisaram os efeitos dessa vitamina em ovos incubados sob condições termoneutras.

De acordo com os dados para o pH sanguíneo ocorreu um efeito dose-dependente do ácido ascórbico, incubados em temperatura quente. Aumento de pH sanguíneo de frangos sob condições de estresse por calor decorre de redução na $p\text{CO}_2$, resultante do aumento da taxa respiratório e de desequilíbrio ácido-básico (FURLAN & MACARI, 2002), que pode ser acompanhado de redução no nível sanguíneo de Ca (MACARI et al., 2002). No presente estudo, entretanto, não foram registradas alterações nos valores das variáveis sanguíneas analisadas ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, BE_{ecf}, TCO_2 , $s\text{O}_2$, HCO_3^- , Na^+ , K^+ , Cai) que pudessem ser relacionadas com o aumento de pH sanguíneo. Para manter o pH sanguíneo, o organismo dispõe da ação de tampões e da regulação respiratória e renal. Os sistemas tampões envolvidos são: o sistema tampão ácido carbônico/bicarbonato, o de fosfato, o de proteínas e o de hemoglobina das hemácias (MARGOTTO, 2004). De acordo com os resultados do estudo, efeito quadrático dos níveis mostrou que a absorção de P a partir da casca aumentou com o aumento da porcentagem injetada de ácido ascórbico nos ovos incubados sob temperatura quente. Assim, não podemos deixar de considerar que o aumento de pH sanguíneo esteja relacionado com alterações nos níveis de fosfatos. Segundo Borges (2001) os elementos traços têm a capacidade de funcionar com eletrólitos, podendo ter efeito no equilíbrio ácido básico e balanço eletrolítico nas aves. Esse dado é interessante, pois chama atenção para a importância da absorção de P a partir da casca para a manutenção do pH sanguíneo via tampão fosfato.

5. Conclusões

Injeção de 4% ácido ascórbico em ovos incubados sob estresse por calor aumenta os valores dos parâmetros hematológicos dos pintos.

6. Referências bibliográficas

Belay, T.; Teeter, R. G. Broiler water balance and thermobalance during thermoneutral and high ambient temperature exposure. *Poult. Sci.*, Champaign, v.72, n.2, p.116-124, 1993.

Borges, S.A. Balanço eletrolítico e sua interrelação com o equilíbrio ácido-base em frangos de corte submetidos a estresse por calor. Jaboticabal : Unesp, 2001. 97f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2001.

Borges A. S.; Maiorka, A.; Laurentiz, A. C.; Fischer, A. V. S.; Santini, E.; Ariki, J. Balanço Eletrolítico para Frangos de Corte na Primeira Semana de Idade. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* v.4, n.2, p.149-153, 2002.

Borges, S. A., A. V. Fischer da Silva, J. Ariki, D. M. Hooge, and K. R. Cummings. 2003b. Dietary electrolyte balance for broiler chickens exposed to thermoneutral or heat-stress environments. *Poult. Sci.* 82:428–435.

Campbell, T.W. Hematology. In: Ritchie, B.W.; Harrison, G.J.; Harrison, L.R. *Avian Medicine: Principles and application*. Fort Worth-FL: Wingers Publishing, 1994. p.177-198.

Finkler, M. S., et al. Experimental manipulation of egg quality in chickens: influence of albumen and yolk on the size and body composition of near-term embryos in a precocial bird. *Journal of Comparative Physiology B*, Berlin, v.168, p.17-24, 1998.

French NA. 1997. Modeling incubator temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poult. Sci.* 76:124–133.

Furlan, R.L.; Macari, M. Termorregulação. In: Macari, M.; Furlan R.L.; Gonzales, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 2ed. Jaboticabal: Funesp, 2002. p.209-230.

Ghonim AIA, Awad AL, Fattouh MHA, El-Shhat AM. 2009. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. *Egypt Poultry Sci.* 29: 1085-1099.

Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzalez, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375p.

Mahmoud KZ, Edens FW, Eisen EJ, Havenstein GB. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol.* v.137, p.35–42, 2004.

Malheiros RD. et al. Environmental temperature and cloacal and surface temperatures of broilers of broilers chicks in first week post-hatch. *Journal Applied Poultry Research Athens*, v. 9, p. 111-117, 2000.

- Margotto PR. Distúrbios do equilíbrio ácido-básico (interpretação da gasometria). 2ª Edição, 2004
- Meijerhof R. 1999. Embryo temperature is the key factor in incubation. *World's Poultry Science Journal* 15, 42-43.
- Mohammed KA, El-Boghdady A, Soliman MAH, Abd Al-Galil MA, Abd Al-Aleem NM. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. *Egypt Poultry Science Vol (31) (II):* 2011.
- Molenaar R, van den Anker I, Meijerhof R, Kemp B, van den Brand H. 2011. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration during incubation on the developmental and physiological status of broiler hatchlings in the perinatal period. *Poultry Science* 90:1257–1266.
- Moura LC, Pedroso MA. Anemia ferropriva na gestação. *Rev Enferm UNISA* 2003; 4: 70-5.
- Mushtaq, T.; Sarwar, M.; Nawaz, H.; Mirza, M. A.; Ahmad, T. Effect and interactions of dietary sodium and chloride on broiler starter performance (hatching to twenty-eight days of age) under subtropical summer conditions. *Poultry Science*. v.84 (11): 1716-1722, 2005.
- Nowaczewski S, Kontecka H, Krystianiak S. 2012. Effect of in ovo injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia Biol. (Krakow)*. 60:93-97.
- Pardue SL, Thaxton JP. 1986: Ascorbic Acid in Poultry: A Review. *World's Poultry Science Journal* 42, 107–123.
- Pires, DL ; Sgavioli, S ; Malheiros, EB ; Boleli, IC . Ácido ascórbico in ovo e jejum sobre parâmetros sanguíneos. In: XXII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal - ALPA, 2011, Montevideo. XXII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal - ALPA, 2011.
- Rondón EOO, Murakami AE, Furlan AC, Garcia, J. Exigências nutricionais de sódio e cloro e estimativa do melhor balanço eletrolítico da ração para frangos de corte na fase pré-inicial (1-7 dias de idade). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2000; 29(4): 1162-1166.
- SAS Institute. 2002. SAS Proprietary Software Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

- Silva, D.J.; Queiroz, A.C. *Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos*. 3 ed. Viçosa:UFV, 2002. 235p.
- Sterzo, E. V. Avaliação morfológica do intestino e hematológica de aves de corte (*Gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente por *Salmonella enteritidis* e submetidos ao tratamento por exclusão competitiva. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- Tazawa H, Whittow GC. Incubation physiology, in: *Sturkey's Avian Physiology*, p. 617-634, Fifth edition, Academic Press, 2000.
- Tullet SG. Science and art of incubation. *Poultry Science* v.69, p.1-15, 1990.
- Tzschentke B, Plagemann A. 2006. Imprinting and critical periods in early development. *World's Poultry Science Journal* 62:626–638.
- Tzschentke B. 2007. Attainment to thermoregulation as affected by environmental factors. *Poultry Science* 86:1025–1036.
- Zakaria AH, Al-Anezi MA. 1996: Effect of Ascorbic Acid and Cooling During Egg Incubation On Hatchability, Culling, Mortality and The Body Weights of Broiler Chickens. *Poultry Science* 75, 1204–1209.

CAPÍTULO 4 – INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO INTRA OVO ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO CELULAR NA BURSA DE FABRICIUS E LINFOCITOSE DURANTE A INCUBAÇÃO

RESUMO - De grande interesse para a indústria avícola é a obtenção de pintos com maior potencial imune na eclosão. É conhecido que o estresse térmico pode exercer efeito imunossupressor ou imunoestimulador e que o ácido ascórbico (AA) exerce funções fisiológicas importantes no desenvolvimento do sistema imune das aves e atua como anti-estressor. Os objetivos do presente estudo foram analisar a influência da injeção de AA intra ovo antes da incubação sobre o desenvolvimento da bursa de Fabrícious e os parâmetros leucocitários de pintos de ovos incubados à temperatura termoneutra e quente. Ovos férteis de matrizes de frango de corte foram utilizados em esquema fatorial 5x2, sendo 5 tratamentos (não injetados e portanto não perfurados e injetados com 0%, 2%, 4% e 6% de AA em 100µl de água) e 2 temperaturas de incubação (termoneutra: 37,5°C e quente: 39,0°C). A contagem total de leucócitos, as porcentagens de trombócitos, basófilos, eosinófilos, heterófilos e monócitos, e o peso e índice bursal não foram alterados pela temperatura de incubação e pelo nível de AA. A área dos folículos da bursa diminuiu sob incubação à temperatura quente nos pintos de ovos não injetados. Com a injeção de 4% e 6% de AA intra ovo, o tamanho dos folículos bursais aumentou sob incubação à temperatura termoneutra e diminuiu sob temperatura quente em relação a não injeção de AA. A proliferação celular nos folículos aumentou com a injeção de 2% de AA, enquanto que a porcentagem de linfócitos aumentou com a injeção de 4% e 6% de AA. Os dados mostram que o AA age como imunomodulador com dose e temperatura-dependentes e que os níveis de 4% e 6% de AA estimulam o desenvolvimento da bursa in ovo e a linfocitose.

Palavras-chave: bolsa cloacal, glóbulos brancos, pintos, mitose, vitamina C

1. Introdução

A partir da bicagem externa, os pintos se tornam expostos a novos antígenos, contra os quais age na linha de frente seu sistema imune inato, uma vez que seu sistema imune adquirido depende do desenvolvimento pós-eclosão dos órgãos linfóides - bursa de Fabricius, timo e baço - e da interação desses órgãos com os antígenos, sendo mediada por células e anticorpos. A indústria avícola procura selecionar linhagens com crescimento mais rápido e menor conversão. Isso reduz a disponibilidade de tempo e de nutrientes para o desenvolvimento do sistema de defesa imune das aves, uma vez que seus órgãos linfóides se desenvolvem e estão ativos durante o período de rápido crescimento do animal, após o qual regridem (SZEMBERG, 1976; KINCADE & MOORE, 1977). Nesse contexto, de grande interesse se torna a aquisição de pintos com maior potencial de defesa imunológica inata e com maior desenvolvimento dos órgãos linfóides.

Estresse térmico pode deprimir o sistema imune das aves na incubação e pós-eclosão (ROSALES et al., 1989; PUVADOLPIROD & THAXTON, 2000), alterando seu potencial de resposta imunológica. A ação do estresse sobre a imunidade varia com a intensidade e duração do estímulo estressor e entre linhagens e indivíduos (MORGULIS, 2002), podendo causar imunossupressão (THAXTON & SIEGEL, 1970; BRAKE, 1989; MILLER & QURESHI, 1991) ou imunoestimulação (COLES, 1986; RUCKEBUSH et al., 1994; CUNNINGHAM, 1999). Estresse térmico na incubação tem sido analisado quanto ao desenvolvimento de adaptações epigenéticas, que propiciem às aves apresentarem termotolerância no período de criação; contudo, não é interessante que ele afete o potencial imune dos pintos.

As vitaminas participam no metabolismo como imunomoduladores, melhorando as funções imunológicas e a resistência às infecções em aves e outros animais domésticos (RUTZ, 2000). De maneira geral, pesquisas têm demonstrado que aves estressadas necessitam de maior aporte de vitaminas e minerais (EL-BOUSHY, 1988; COELHO & MCNAUGHTON, 1995; MILTENBURG, 1999). O ácido ascórbico (AA) tem se mostrado efetivo em diminuir os efeitos do estresse térmico (MAHMOUD et al., 2004), uma vez que temperaturas elevadas impedem a absorção de vitamina C, reduzindo seus níveis no sangue e aumentando sua exigência (THORNTON, 1961; BRIGGS et al., 1994). Características de desempenho e função

imune de aves que sofreram estresse por calor são significativamente melhoradas com o aumento nos níveis de vitamina C (PARDUE & THAXTON, 1984; PARDUE et al., 1985; CAMPO & DÁVILA, 2002; FURLAN & MACARI, 2002).

A injeção de AA intra ovo antes da incubação pode ser uma técnica de manejo nutricional viável para melhorar o potencial imunológico dos pintos e/ou minimizar os efeitos imunossupressores do estresse por calor durante a incubação. Além disso, ela elimina a necessidade de manusear e retirar os ovos da incubadora ou nascedouro, o que pode prejudicar a eclodibilidade dos ovos. Embora alguns autores tenham dedicado atenção ao desenvolvimento de mecanismos de manejo durante a incubação para melhorar a resistência imunológica dos pintos (KIDD, 2004; YAHAV et al., 2004; YAÇIN et al., 2005; YAÇIN et al., 2008; GHONIM et al., 2009; SELIM et al., 2012), faltam informações sobre a eficácia relativa do AA, injetado intra ovo antes da incubação, em melhorar a resposta imunológica de pintos de corte frente ou não ao estresse térmico contínuo na incubação. A proposta do presente estudo foi avaliar se injeção de AA intra ovo antes da incubação influencia o desenvolvimento do potencial de resposta imune dos pintos sob temperatura termoneutra ou estresse por calor contínuo na incubação. Foram também analisados os parâmetros leucocitários sanguíneos e as características histomorfométricas e proliferação celular da bursa de Fabricius de pintos

2. Material e métodos

Ovos e delineamento experimental

Os procedimentos utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (protocolo nº 7377/10), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal.

Quinhentos ovos férteis de matrizes de frango de corte (Cobb®) com 47 semanas de idade, obtidos de incubatório comercial (Globoaves, Itirapina, São Paulo), foram utilizados neste estudo. Os ovos foram pesados e distribuídos homogeneamente pelo peso ($67g \pm 2g$) em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2, com 5 tratamentos (sem injeção e portanto sem perfuração, com injeção de 0%, 2%, 4% e 6% de ácido ascórbico em

100µl de água) e 2 temperaturas de incubação (termoneutra:37,5°C e quente: 39,0°C), sendo 2 incubadoras por temperatura e 25 ovos/tratamento/incubadora, com controle automático de temperatura e giro dos ovos a cada 2h (Premium Ecológica IP200). A umidade relativa no interior das incubadoras foi de 60% até a transferência e 70% nos dois últimos dias de incubação. Enquanto que a temperatura foi reduzida em 1°C para ambas as temperaturas utilizadas, no momento da transferência.

Os ovos foram injetados com solução aquosa de ácido ascórbico (AA) (Synth, 99% de pureza) nos níveis supracitados, antes do início da incubação, exceto nos ovos controle, onde não foi realizada a perfuração dos ovos. Após a limpeza do local com etanol 100%, com os ovos mantidos na posição horizontal, 100µl de solução foi injetada no albúmen, próximo à extremidade afilada do ovo, a 6 mm de profundidade, utilizando-se seringa com agulha estéril (13 x 0,38; 27,5 G1/2"). Após a injeção, o orifício foi fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. O AA foi diluído em água Mili-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido sua foto sensibilidade.

Contagem total e específica de leucócitos e relação heterófilo/linfócito

Após pesagem dos pintos recém-eclodidos, oito pintos por tratamento foram utilizados para a coleta e análise leucocitária. O sangue foi coletado a partir da jugular e mantido em tubos de plásticos com 15µl de anticoagulante/1 ml de sangue (Glistab, cat. 29, Labtest Diagnóstica) sobre gelo. Para as contagens diferenciais dos leucócitos, imediatamente após a coleta, foi realizado um esfregaço sanguíneo por ave. Posteriormente, os esfregaços foram corados com kit Panótico, rapidamente desidratados em série de concentração crescente de etanol e diafanizados em xilol, e montados com entelan. As porcentagens dos diferentes tipos de leucócitos (linfócitos, monócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e trombócitos) e da relação heterófilo/linfócito (H/L), calculadas a partir da análise de 100 leucócitos por ave. As contagens totais de leucócitos (número de leucócitos/mm³) foram realizadas em câmara de Neubauer logo após a coleta de amostras de sangue e, com uma diluição de (1:100) com solução de Natt & Herrick (1952).

Pesos da bursa

Após coleta do sangue, os oito pintos de cada tratamento foram sacrificados por deslocamento cervical e submetidos à necropsia, após serem decapitados. As bursas foram removidas da cavidade celomática e imediatamente pesadas. O peso relativo de cada bursa foi calculado como porcentagem em relação ao peso corporal do pinto.

Histologia e morfometria da bursa

Para observação histológica e mensuração da área dos folículos, da espessura do epitélio interno e da parede externa, foram utilizadas bursas de oito pintos para cada tratamento. Assim que coletadas, as bursas foram fixadas em solução de formaldeído 10%. Em seguida, processadas pelo método de rotina para microscopia de luz. Cortes histológicos semi-seriados, de 6 µm de espessura, foram corados com hematoxilina-eosina. Os dados foram obtidos utilizando-se um sistema de captura e análise de imagens (Leica), sendo realizadas 60 mensurações morfométricas de cada variável por ave.

Proliferação celular na bursa

As células em mitose nos folículos da bursa foram marcadas imunohistoquímicamente para Proteína Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), as quais são sintetizadas durante a interfase e estão presentes na célula até o final do processo de mitose (MIYACHI et al., 1978; CELIS & CELIS, 1985). Para tal reação, utilizou-se o complexo Avidina- Biotina³.

Cortes com 6 µm de espessura foram obtidos a partir das bursas fixadas em formaldeído 10% e incluídas em histosec e montados em lâminas carregadas eletricamente (Starfrost® Green, tissue-tek® auto write). Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em série de concentração decrescente de etanol até água. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi retirada e os cortes foram cobertos com soro inespecífico (equino, 2% em PBS 0,19M pH7,2) durante 1 hora à

³ Kit of detection Starr Trek Universal HRP, Biocare Medical, USA.

temperatura ambiente, para bloqueio de ligações inespecíficas. Após bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo primário camundongo anti-PCNA⁴ diluído em Tris-HCl 0,05M pH 7.4 (1:100) à 4°C por um hora, em câmara úmida. Depois, os cortes foram incubados durante 10 minutos com anticorpo secundário biotinizado e, em seguida, por 20 minutos com o complexo estreptavidina-peroxidase², à temperatura ambiente. Nas lavagens foram realizadas solução tampão Tris-HCl 0.05M, (pH 7,4). A solução cromógena diaminobenzidina betazóide (DAB)² foi usada para revelação da reação antígeno-anticorpo. As lâminas foram desidratadas com série de concentração crescente de etanol, diafanizadas com xilol e montadas com entelan. Controles negativos foram obtidos omitindo-se a incubação de cortes histológicos com anticorpo primário. A taxa de proliferação celular correspondeu ao número de células PCNA⁺ presentes em áreas de 2.700 μm^2 de 25 folículos por ave. As contagens do número células em mitose foram realizadas utilizando-se um sistema de captura e análise de imagens (Leica Q win V3) acoplado a um estereomicroscópio (Leica-DM 2500) (Fig. 1).

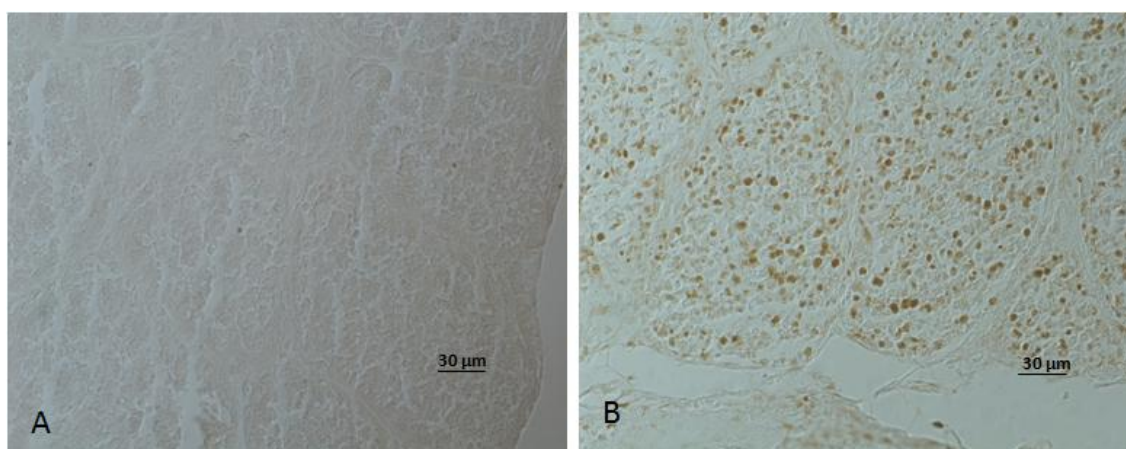


Figura 1. Fotomicrografia de cultura de células não induzidas (A) e induzidas à mitose (B), de secções histológicas da Bursa de Fabricius de pintainhos recém-eclodidos, submetidas à técnica de marcação de células em mitose (PCNA).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS ® (SAS Institute, 2002), segundo um

⁴ PCNA Clone PC10, Biocare Medical, USA, origem: anticorpo monoclonal de camundongo.

delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (5 tratamentos x 2 temperaturas de incubação), anteriormente descrito. Havendo diferença significativa entre médias pelo teste F da análise de variância, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Por meio da técnica de contrastes foi também comparada a média do tratamento controle versus a média conjunta dos tratamentos com 0%, 2%, 4% e 6% de AA e testados os modelos de regressão: linear, quadrático e cúbico, quanto aos níveis de aplicação de AA sobre as variáveis estudadas.

3. Resultados

Pesos da bursa

Os pesos absoluto e relativo da bursa de Fabricius não foram influenciados significativamente ($P>0,05$) pelas porcentagens de ácido ascórbico (AA) injetadas intra ovo e nem pelas temperaturas de incubação (Tab. 1).

Tabela 01 - Efeito da injeção de ácido ascórbico e das temperaturas sobre o peso e índice bursal ((peso bursa:peso corporal) x 100) de pintos recém-eclodidos machos.

	Peso bursa (g)	Índice bursal (%)
Tratamentos (T)		
Controle	0,058	0,114
Ácido Ascórbico-0%	0,051	0,100
Ácido Ascórbico-2%	0,055	0,109
Ácido Ascórbico-4%	0,061	0,120
Ácido Ascórbico-6%	0,056	0,109
Temperaturas (TP)		
Termoneutra	0,056	0,110
Quente	0,056	0,110
Valores de P para o teste F		
T	0,3670	0,3945
TP	0,7730	0,9073
T x TP	0,4504	0,4812
CV (%)	26,45	26,65

CV: coeficiente de variação.

Proliferação celular, histologia e morfometria da bursa

Como mostrado na Tabela 2, ocorreu efeito significativo ($P \leq 0,05$) dos tratamentos, mas não da temperatura sobre o número de células em mitose nos folículos da bursa, sugerindo que a injeção de 2% de AA aumentou e a de 6% diminuiu o número de mitoses.

Tabela 02 - Efeito da injeção de ácido ascórbico (AA) e das temperaturas de incubação sobre a área dos folículos, a espessura do epitélio interno e da parede e a proliferação celular folicular da bursa de pintos machos recém-eclodidos.

	Área Folicular (μm^2) ¹	Epitélio Interno (μm) ¹	Parede (μm) ¹	Proliferação Celular (n°) ¹
Tratamentos (T)				
Controle	217.485 (12,17)	69,11 (4,17)	193,24 (5,20)	12,52 (2,57A)
AA-0%	225.457 (12,22)	66,65 (4,12)	196,70 (5,22)	11,08 (2,52B)
AA-2%	225.865 (12,21)	65,16 (4,13)	203,49 (5,21)	13,67 (2,65A)
AA-4%	213.185 (12,13)	61,06 (4,08)	193,12 (5,22)	12,33 (2,55A)
AA-6%	224.999(12,30)	66,53 (4,15)	157,01 (4,98)	10,57 (2,47B)
Temperaturas (TP)				
Termoneutra	239.992 (12,29)	70,10 (4,20)	184,97 (5,17)	12,40 (2,57)
Quente	202.805 (12,09)	61,30 (4,06)	192,58 (5,17)	11,70 (2,54)
Probabilidades				
T	0,1143	0,1196	<0,0001	0,0008
TP	<0,0001	<0,0001	0,8456	0,2923
T x TP	<0,0001	<,0001	0,0002	0,0892
CV (%)	3,84	9,04	7,56	13,44
Contraste				
Quadrático para os níveis	-	-	-	0,0004

A-B: médias seguidas de letras distintas (coluna) diferem significativamente ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.
¹comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses).

Houve efeito quadrático significativo ($P=0,0004$) das porcentagens de AA sobre o número de células em mitose nos folículos da bursa (Fig. 2), indicando que o número de células aumentou no nível de 2% de AA injetado, decrescendo daí em diante.

Nenhuma alteração histológica evidente foi observada na bursa dos pintos de ovos injetados com AA e incubados sob temperatura termoneutra ou quente. Houve interação significativa ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos e as temperaturas de

incubação para a área do folículo e espessuras do epitélio interno e da parede externa da bursa (Tab. 2). O desdobramento dessa interação para área dos folículos (Tab. 3) mostrou que não ocorreu diferença significativa ($P>0,05$) nessa variável entre os pintos de ovos injetados, e os de ovos não injetados na temperatura termoneutra. No entanto, na temperatura quente, a diferença foi significativa ($P\leq 0,05$), sendo que a menor área de folículos ocorreu para pintos de ovos injetados com 4% de AA. A área dos folículos da bursa dos pintos, após incubação à temperatura quente, foi menor ($P\leq 0,05$) do que à temperatura termoneutra, tanto para os ovos não injetados, como para os injetados com 4% e 6% de AA. Todavia, as áreas dos folículos da bursa de pintos de ovos injetados com água e 2% de AA não foram alteradas pela temperatura quente de incubação ($P>0,05$). Adicionalmente, foi registrado efeito cúbico ($P\leq 0,05$) dos níveis de AA sobre a área dos folículos da bursa para pintos de ovos incubados à temperatura termoneutra e quente (Tab. 3, Fig. 2), sendo que a injeção de 4% de AA resultou na maior área de folículo para os pintos de ovos incubados à temperatura termoneutra e na menor área de folículos para os incubados à temperatura quente.

Tabela 03 - Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico (AA) e temperaturas de incubação para a área (μm^2)¹ do folículo da bursa de pintos machos recém-eclodidos.

Tratamentos	Temperaturas (T)		Valor de P para o teste de F
	Termoneutra	Quente	
Controle	229.518 (12,24) Aa	207.345 (12,11) Ab	0,0311
Ácido Ascórbico-0%	225.414 (12,22) A	225.501 (12,22) A	0,9800
Ácido Ascórbico-2%	223.596 (12,23) A	228.135 (12,19) A	0,4693
Ácido Ascórbico-4%	269.959 (12,41) Aa	157.718 (11,85) Bb	<0,0001
Ácido Ascórbico-6%	253.366 (12,36) Aa	196.632 (12,10) Ab	<0,0001
Valor de P para o teste de F	0,0621	<0,0001	
Contrastes	Valor de P para o teste de F		
Controle vs. níveis	0,1290	0,7180	
Linear para os níveis	0,0008	0,0004	
Quadrático para os níveis	0,4867	0,0017	
Cúbico para os níveis (0,0246	<0,0001	

¹comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). a-b, A-B: médias seguidas por letras distintas (linhas e colunas) diferem significativamente ($P\leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

O desdobramento da interação entre tratamentos e temperatura de incubação para espessura do epitélio interno da bursa (Tab. 4) mostrou que esta característica nos pintos de ovos injetados com as diferentes porcentagens de AA foi maior ($P \leq 0,05$) que nos pintos de ovos não injetados na temperatura termoneutra e menor ($P \leq 0,05$) na quente. Quando a incubação dos ovos ocorreu à temperatura termoneutra, a espessura do epitélio interno da bursa foi significativamente maior ($P \leq 0,05$), nos pintos de ovos injetados com 0% de AA e com incubação à temperatura quente maior nos pintos de ovos não injetados, e significativamente menor ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos injetados com 0, 4 e 6% de AA. Ocorreu efeito linear decrescente significativo ($P \leq 0,05$) das porcentagens de AA sobre a característica em questão, nos pintos de ovos incubados à 39°C e efeito quadrático significativo ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos incubados à 37,5°C (Tab. 4, Fig. 2).

Tabela 04 - Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico (AA) e temperaturas de incubação para a espessura do epitélio interno (μm)¹ da bursa de pintos machos recém-eclodidos.

Tratamentos	Temperaturas (T)		Valor de P para o teste de F
	Termoneutra	Quente	
Controle	61,72 (4,07) Bb	76,49 (4,28) Aa	<0,0001
Ácido Ascórbico-0%	84,62 (4,39) Aa	49,01 (3,85) Cb	<0,0001
Ácido Ascórbico-2%	71,98 (4,23) ABa	58,33 (4,02) Bb	<0,0001
Ácido Ascórbico-4%	63,99 (4,13) Ba	58,13 (4,04) Bb	0,0481
Ácido Ascórbico-6%	69,19 (4,18) B	64,87 (4,12) B	0,2626
Valor de P para o teste de F	<0,0001	<0,0001	
Contrastes	Valor de P para o teste de F		
Controle vs. níveis	<0,0001	<0,0001	
Linear para os níveis	<0,0001	<0,0001	
Quadrático para os níveis	0,0021	0,2418	
Cúbico para os níveis	0,5983	0,1543	

¹comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). a-b, A-B: médias seguidas por letras distintas (linhas e colunas) diferem significativamente ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A espessura da parede da bursa dos pintos de ovos injetados com as diferentes porcentagens de AA foi maior ($P \leq 0,05$) que nos pintos de ovos não injetados na temperatura termoneutra e menor ($P \leq 0,05$) na quente (Tab. 5). Comparado aos pintos de ovos não injetados, essa característica foi maior ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos injetados com 0% de AA (somente com água) e menor ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos injetados com 6% de AA. Com incubação dos ovos à 39°C e à

37,5°C, a espessura da parede da bursa foi maior ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos injetados com 2% de AA e menor ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos injetados com 6% de AA. A espessura da parede deste órgão foi maior ($P \leq 0,05$) com incubação à temperatura quente nos pintos de ovos não injetados e menor ($P \leq 0,05$) nos pintos de ovos injetados com 0, 4 e 6% de AA. Foram verificados efeitos quadrático e linear decrescente significativos ($P \leq 0,05$) dos níveis de AA sobre a referida característica com incubação dos ovos à 37,5°C e 39°C, respectivamente (Tab. 5, Fig 2), mostrando, no caso do efeito linear, redução da mesma com o aumento da porcentagem de injeção de AA .

Tabela 05 - Desdobramento da interação entre injeção de ácido ascórbico e temperaturas de incubação para a espessura da parede (μm)¹ da bursa.

Tratamentos	Temperaturas (T)		Valor de P para o teste de F
	Termoneutra	Quente	
Controle	168,63 (5,10) BCb	218,05 (5,29) Aa	<0,0001
Ácido Ascórbico-0%	191,89 (5,21) ABa	201,51 (5,24) Ab	<0,0001
Ácido Ascórbico-2%	205,54 (5,27) Aa	201,45 (5,15) Ab	<0,0001
Ácido Ascórbico-4%	199,33 (5,25) ABa	186,91 (5,20) Ab	0,0485
Ácido Ascórbico-6%	159,94 (5,02) C	154,55 (4,94) B	0,2555
Valor de P para o teste de F	<0,0001	<0,0001	
Contrastes	Valor de P para o teste de F		
Controle vs. níveis	<0,0001	<0,0001	
Linear para os níveis	<0,0001	<0,0001	
Quadrático para os níveis	0,0030	0,1974	
Cúbico para os níveis	0,6238	0,165	

¹comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). a-b, A-B: médias seguidas por letras distintas (linhas e colunas) diferem significativamente ($P \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

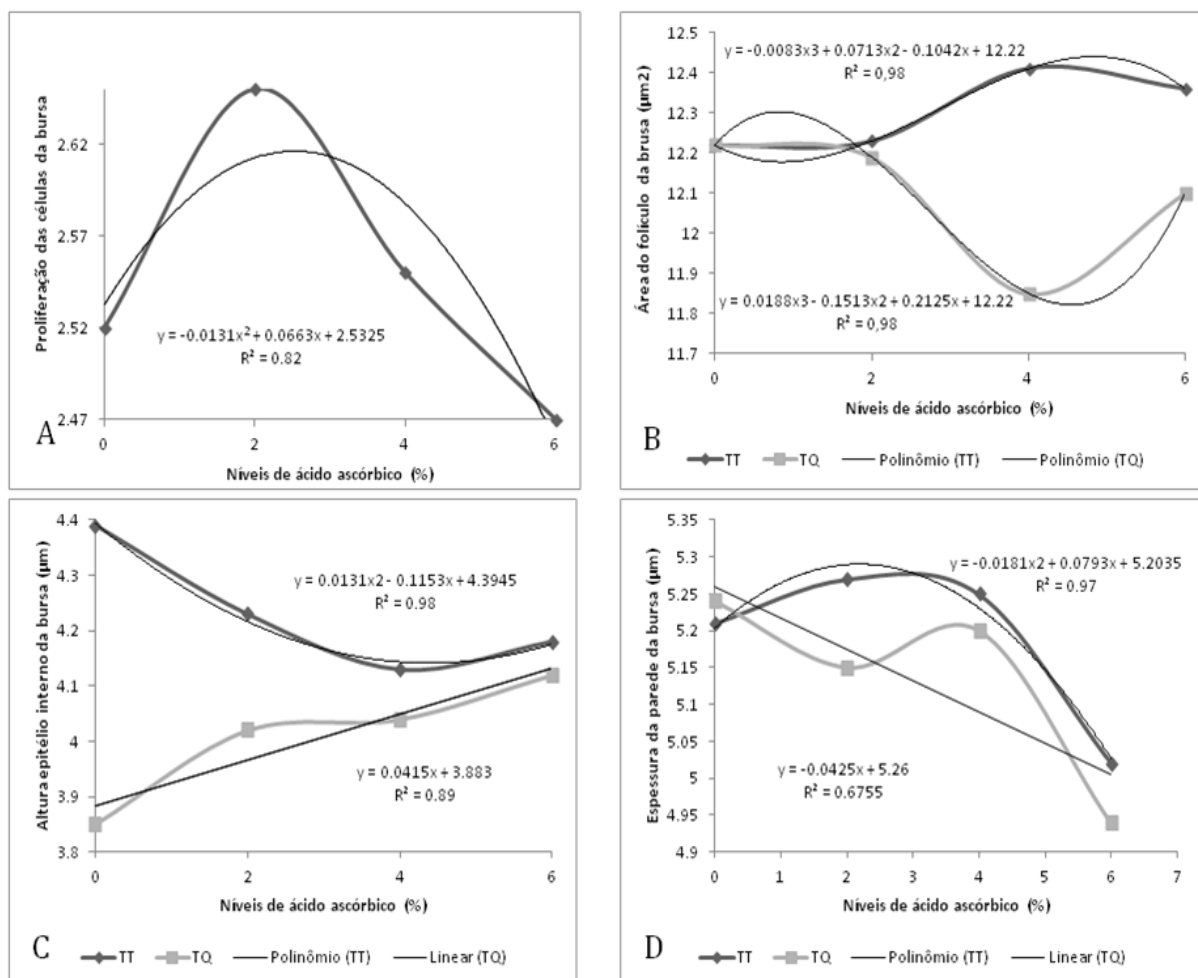


Figura 2. Equações para o desenvolvimento da bursa. Proliferação (A), área dos folículos (B), altura do epitélio interno (C) e espessura da parede da bursa (D), em função das porcentagens de ácido ascórbico injetado intra ovo antes da incubação e das temperaturas de incubação.

Contagem total e diferencial de leucócitos e relação heterófilo/linfócito (H/L)

Não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) dos tratamentos e das temperaturas de incubação sobre a contagem total de leucócitos e porcentagens de trombócitos, basófilos, eosinófilos, heterófilos e monócitos e sobre a relação H/L (Tab. 6). Todavia, ocorreu efeito significativo ($P \leq 0,05$) das temperaturas de incubação sobre a porcentagem de linfócitos, a qual foi menor nos pintos de ovos incubados à temperatura quente.

Tabela 06 – Efeito da injeção de ácido ascórbico (AA) e das temperaturas de incubação sobre o leucograma, de pintos recém-eclodidos machos.

	CTLeu ¹ (mm ³)	Trombócito (%)	Basófilo ¹ (%)	Eosinófilo ¹ (%)	Heterófilo (%)	Monócito (%)	Límfócito ¹ (%)	H/L
Tratamentos (T)								
Controle	53.280 (10,77)	72,78	1,22 (0,89)	1,33 (0,90)	7,33	14,89	2,44 (1,19AB)	2,73
Ácido Ascórbico-0%	53.733 (10,71)	75,73	0,55 (0,67)	1,00 (0,85)	6,73	14,46	1,27 (0,77B)	1,45
Ácido Ascórbico-2%	36.480 (10,34)	65,10	1,10 (0,89)	2,10 (1,23)	7,40	15,80	1,75 (0,93B)	1,05
Ácido Ascórbico-4%	39.200 (10,34)	70,20	1,30 (0,92)	1,00 (0,81)	4,80	15,00	5,00 (1,48AB)	1,50
Ácido Ascórbico-6%	42.500 (10,58)	70,36	1,09 (0,86)	1,36 (0,88)	3,73	12,73	7,30 (1,78A)	0,37
Temperaturas (TP)								
Termoneutra	45.890 (10,58)	70,67	1,25 (0,92)	1,33 (0,94)	6,83	12,96	5,13 (1,49A)	1,31
Quente	44.573 (10,52)	71,07	0,85 (0,78)	1,39 (0,44)	5,15	15,93	2,08 (0,98B)	1,83
Valores de P para o teste de F								
T	0,2339	0,2220	0,7081	0,3444	0,1086	0,9432	0,0185	0,4920
TP	0,8648	0,8888	0,2943	0,9247	0,1414	0,2134	0,0217	0,7216
T x TP	0,0582	0,0701	0,9802	0,8811	0,1366	0,6687	0,1237	0,7390
CV (%)	5,33	14,83	53,22	52,52	61,77	60,51	59,33	99,31
Valor de P para o teste de F								
Contraste Quadrático para os níveis	-	-	-	-	-	-	0,0008	-

CTLeu: contagem total de leucócitos. A-B: médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente ($P \leq 0,05$). ¹ comparação a partir de dados transformados por log (entre parênteses). CV: coeficiente de variação.

Houve efeito quadrático significativo ($P=0,0008$) dos níveis de AA sobre a porcentagem de linfócitos (Tab. 6, Fig. 3), de acordo com a qual a porcentagem de linfócitos cresceu com o aumento de AA injetado.

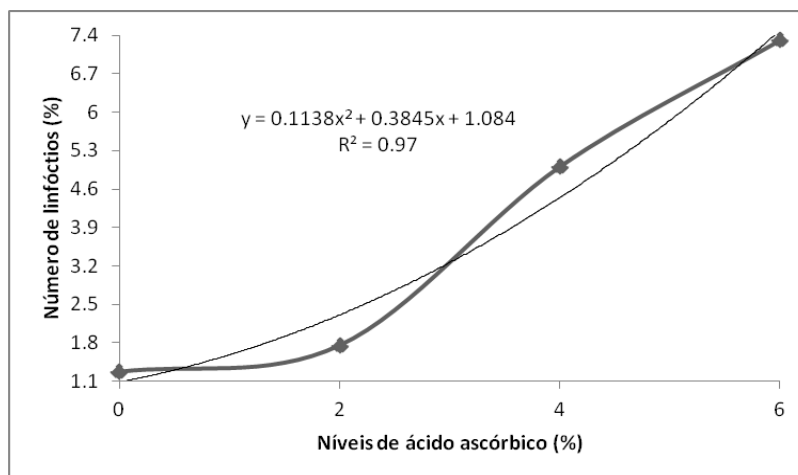


Figura 03. Linfócitos em função das porcentagens de ácido ascórbico injetados intra ovo antes da incubação.

4. Discussão

Os efeitos de agentes estressores ou moduladores sobre os órgãos linfóides das aves podem ser avaliados pelo peso e índice peso do órgão/peso corporal (WYATT et al., 1986; ROSALES et al., 1989; REVIDATTI et al., 2002), pela morfometria epitelial, da parede e dos folículos linfóides da bursa (CHEVILLE et al., 1978; DONKER & BEUVING, 1989), proliferação celular (MOTOYAMA et al., 1995; VASCONCELOS et al., 1996.) e contagem de linfócitos (THAXTON et al., 1968; GROSS & SIEGEL, 1983; COMPTON et al., 1990; ALTAN et al., 2000). O peso de órgãos linfóides reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante uma resposta imune (RIBEIRO et al., 2008) e, associado com o peso relativo da bursa permite avaliar o potencial de defesa da ave.

O estresse por calor na incubação e a injeção de AA intra ovo não influenciaram significativamente o peso e o índice bursal. Este resultado, ou seja, a ausência de efeito do estresse por calor também foi observado por Torres (2006). Alloui et al. (2005) classificaram o índice bursal (x) de frangos de corte como excelente (se $x > 0,20\%$), bom ($0,18\% < x \leq 0,20\%$), médio (se $0,15\% < x \leq 0,18\%$) e ruim (se $x \leq 0,15\%$). O índice bursal na eclosão, obtido no presente estudo, não

atingiu 0,15%, o que, segundo a classificação de Alloui et al. (2005), pode ser considerado um índice ruim para frango de corte. Esse baixo índice bursal mostra que, independentemente da temperatura de incubação e da injeção de AA, os pintos recém-eclodidos possuem baixa habilidade de proteção decorrente de imunidade adquirida, o que pode estar relacionado com o fato do desenvolvimento desse órgão linfóide ocorrer após a eclosão (PARAMITHIOTIS & RATCLIFFE, 1994; GLICK, 2000). Embora o peso e o índice bursal indiquem ausência de efeito imunossupressor ou imunostimulador da temperatura de incubação e do AA sobre a resposta imune bursal, a área dos folículos e a espessura do epitélio interno e da parede da bursa mostraram alterações na bursa, decorrentes da ação de ambos. Isto fortalece os índices morfométricos bursais como bons indicadores da ação de estressores, como mencionado por Donker & Beuving (1989), ou imunomoduladores. A incubação contínua de ovos não injetados sob temperatura quente reduziu, em relação à incubação sob temperatura termoneutra, o desenvolvimento da bursa, diminuindo o tamanho dos folículos linfóides, da espessura do epitélio interno e da parede do órgão.

Segundo Paramithiotis & Ratcliffe (1994), o menor desenvolvimento da bursa na eclosão, causado pelo estresse, pode interferir no início da migração dos linfócitos B da bursa aos órgãos linfóides periféricos, processo que em condições normais começa ao redor da eclosão e continua na vida pós-natal.

Esses dados morfométricos (área do folículo da bursa, espessura do epitélio internos e da parede da bursa), considerando a relação existente entre morfologia e função, indicam efeito imunossupressor do estresse por calor sobre a resposta imune adquirida bursal, o que deve ter causado a diminuição da porcentagem de leucócitos no sangue dos pintos, registrado no leucograma. Redução no tamanho dos folículos bursais também foi registrado sob estresse por calor no nascedouro por Torres (2006). Isso indica que a redução no tamanho dos folículos é um efeito do estresse por calor na incubação ou no nascedouro.

A injeção de AA intra ovo antes da incubação sob temperatura termoneutra ou quente exerceu efeitos dose-dependentes algumas vezes distintos e contrários sobre as variáveis morfométricas analisadas na bursa. A área dos folículos foi influenciada pela injeção de 4% e 6% de AA, e aumentou sob incubação à

temperatura termoneutra e diminuiu sob incubação à temperatura quente, o que resultou em menor área folicular sob essa temperatura. Esse resultado é muito interessante, pois sugere que o AA exerceu efeitos contrários sobre a resposta imune adquirida, ou seja, imunoestimulador sob incubação à temperatura termoneutra e imunossupressor sob incubação em condições de estresse por calor.

Outro indicador do efeito estimulador da injeção de AA intra ovo sobre a resposta imune inata dos pintos foi a linfocitose, resultante da injeção de porcentagens crescentes de AA. Os efeitos da injeção de 4% e 6% de AA intra ovo sobre os folículos foram acompanhados de diminuição na espessura da parede externa e alteração na espessura do epitélio interno da bursa, sob incubação a temperatura quente. O epitélio da bursa realiza atividade pinocítica a partir de 19 ou 20 dias de incubação (DIETERLEN-LIÈVRE, 1994; GLICK, 1995), cuja intensidade pode acentuar a espessura epitelial. O efeito da injeção de AA sobre a espessura do epitélio da bursa pode ser um indicativo de estimulação da atividade pinocítica do epitélio.

A bursa é colonizada por células progenitoras linfocitárias durante a segunda semana de vida embrionária, as quais são induzidas a proliferar e formar os folículos (PARAMITHIOTIS & RATCLIFFE, 1994). Deste modo, os efeitos imunoestimuladores ou imunossupressores sobre a resposta imune adquirida também podem ser exercidos via taxa de proliferação celular. Nossos dados mostram efeito significativo dose-específica do AA sobre a proliferação celular nos folículos da bursa. Injeção de 2% de AA intra ovo aumentou a proliferação celular nos folículos bursais, reduzindo, no entanto, com a injeção de porcentagens maiores.

O sistema de defesa celular das aves é constituído de monócitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, trombócitos e linfócitos (MORGULIS, 2002), sendo que os cinco primeiros agem na defesa imune inata e o último na defesa imune adquirida. Estresse pode deprimir ou estimular o sistema de defesa imune, alterando quantitativamente a presença das células no sangue (BORGES et al., 2003), o que torna granulócitos e heterófilos e a relação H/L indicadores usuais da resposta de aves ao estresse (GROSS & SIEGEL, 1983; MACARI & LUQUETTI, 2002; LAGANÁ & RIBEIRO, 2007). A resposta imune da ave também pode ser modulada por agentes vitamínicos, como vitamina C, a qual pode melhorar a resposta ao estresse

por calor (PARDUE & THAXTON, 1984; PARDUE et al., 1985; CAMPO & DÁVILA, 2002; FURLAN & MACARI, 2002).

No presente estudo, os dados de leucograma foram utilizados para determinar se injeção de ácido ascórbico (AA) intra ovo antes da incubação à temperatura termoneutra e quente alteraria o potencial de resposta imune inata dos pintos. De acordo com nossos dados, não ocorreram alterações na contagem total de leucócitos e nem nas quantidades dos tipos celulares do sistema de defesa imune - basófilos, eosinófilos, heterofilos, trombócitos e monócitos - e na relação H/L, relacionadas à temperatura quente de incubação, sugerindo que o sistema de defesa imune inata pode estar adaptado às trocas na temperatura ambiente durante o desenvolvimento intra ovo, que permanecem dentro do limite de tolerância térmica.

5. Conclusões

O presente estudo mostra ação imunomoduladora dose e temperatura-dependentes do ácido ascórbico sobre o desenvolvimento da bursa de Fabrício durante a incubação e que a injeção de 4% e 6% de AA induz linfocitose.

6. Referências bibliográficas

- ALLOUI, M.N., S. SELLAOUI1 AND S. DJAABA, 2005. Morphometrical and anatomo-pathological survey of the bursa of fabricius in broiler chickens. ISAH, 2:52-55.
- ALTAN, O.; ALTAN, A.; ÇABUC, M.; BAYRAKTAR, H. Effects of heat stress on some blood parameters in broilers. Turk J. Vet. Anim. Sci., Tubitak, v.24, n.2, p.145–148, 2000.
- BORGES, S.A.; MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F. Fisiologia do estresse por calor e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. Ciênc. Rural, Santa Maria, v.33, n.5, p.975-981, 2003.
- BRAKE, J. T. Zootech. Int. January 1989:37–40.
- BRIGGS, G.M.; LUCKEY, T.D. ELVENJEM, C.A.; HART, E.B. Effect of ascorbic acid on chickes growth, when added to purified rations. Pro. Soc. Exp. Boil. Med., v. 55, p. 111-115, 1994.

- CAMPO, J.L.; DÁVILA, S.G. Changes in heterophils to lymphocyte ratios of heat-stressed chickens in response to dietary supplementation of several related stress agents. *Europ. Poult. Sci.*, Stuttgart, v.66, n.2, p.80-84, 2002.
- CHEVILLE, N.F. Environmental factors affecting the immune response of birds. (A Review). *Avian Dis.*, v.23, p.308-314, 1978.
- COELHO, M.B.; McNAUGHTON, J.L. Effect of composite vitamin supplementation on broilers *J. Appl. Poult. Res.*, Athens, v.4, n.2, p.219–229. 1995.
- COLES, E.H. *Veterinary Clinical Patology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. 486p.
- COMPTON, M.M.; GIBBS, P.S.; JOHNSON, L.R. Glicocorticoid-mediated activation of DNA degradation in avian lymphocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.80, p.68-79, 1990.
- CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro:Guanabara, 1999. 454p.
- DIETERLEN-LIÈVRE, F. Hemopoiesis during avian ontogeny. *Poultry Science Review*, v.5, p.273-305, 1994.
- EL-BOUSHY, A.R. Vitamin E affects viability, immune response of poultry. *Feedstuffs*, v.60, n.4, p.20-26, 1988.
- FURLAN, R.L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN R.L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 2ed. Jaboticabal: Funesp, 2002. p.209-230.
- GHONIM A. I. A., AWAD A. L., FATTOUH, M. H. A., EL-SHHAT, A. M. 2009. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. *Egypt Poult. Sci.* 29: 1085-1099.
- GLICK B. Immunophysiology. em: *Sturkie's Avian Physiology*, 5 ed. San Diego, USA, 2000, 685 p.
- GLICK, B. Embryogenesis of the bursa of fabricius: stem cell, microenvironment, and receptor-paracrine pathways. *Poultry Science*, v. 74, p. 419-426, 1995.
- GROSS, W.B.; SIEGEL, H.S. Evaluation of the heterophil/ lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.*, Athens, v.27, n.4, p.972-979, 1983.
- KIDD M.T. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science*, v.83, p.650- 657, 2004.

- LAGANÁ, C.; RIBEIRO, A.M.L. A influência da temperatura na alimentação de frangos de corte. *Boletim da Indústria Animal*, v.64, n.1, p.79-89, 2007.
- MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.) *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 2.ed. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2002. p.17-36.
- MAHMOUD KZ, EDENS FW, EISEN EJ, HAVENSTEIN GB. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol*, v.137, p.35-42, 2004.
- MILLER, L.; QURESHI, M.A. Introduction of heat shock proteins and phagocytic function of chicken macrophage following in vitro heat exposure. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Nouzilly, v.37, n.1, p. 34-42, 1991.
- MILTENBURG, G. *Avicultura. Avic. Profes.*, Bogotá, v.17, n.9, p.33-35, 1999.
- MORGULIS, M. S. *Imunologia aplicada*. In: MACARI, M., FURLAN, R. L., GONZALES E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 231-245, 2002.
- MOTOYAMA, N.; WANG, F.; ROTH, K.A. et al. Massive cell death of immature hematopoietic cell and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, v.267, p.1506-1509, 1995.
- NATT, M.P; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult Sci*, 31 (1952), pp. 735-738.
- PARAMITHIOTIS, E.; RATCLIFFE, M.J.H.; Survivors of bursal B cell production and emigration. *Poultry Science*, v. 73, n. 7, p. 991-997, 1994.
- PARDUE, S.L.; THAXTON, J.P. Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. *Poult. Sci.*, Champaign, v.63, n.8, p.1262-1268, 1984.
- PARDUE, S.L.; THAXTON, J.P.; BRAKE, J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J. Appl. Physiol.*, Bethesda, v.58, n.9, p.1511-1516, 1985.
- PUVADOLPIROD, S.; THAXTON, J.P. Model of Physiological Stress in Chickens 1. Response Parameters. *Poult. Sci.*, Champaign, v.79, n.4, p.363-369, 2000.

- REVIDATTI, F.A.; FERNANDEZ, R.J.; TERRAES, J.C.; SANDOVAL, G.L.; LUCHI, P.E. Modificaciones del peso corporal y indicadores de estrés em pollos parrilleros sometidos a inmovilización y volteo. *Rev. Vet. Arg., Corrientes*, v.12, n.1, 2002.
- RIBEIRO, Andréa Machado Leal et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. *R. Bras. Zootec.* [online]. 2008, vol.37, n.4, pp. 636-644. ISSN 1806-9290.
- ROSALES, A.G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P.D.; MOHAMED, A.M.; BROWN, J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal Virus. *Avian Dis., Athens*, v.33, n.1, p.35-41, 1989.
- RUCKEBUSH, L.P.; PHANEUF, L.P.; DUNLOP, R. F. *Fisiologia de pequenas y grandes espécies*, México: Manual Moderno, 1994. 862p.
- RUTZ, F. Absorção de vitaminas. In: MACARI, M., FURLAN, R. L., GONZALES, E. *Fisiologia aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2000. p. 149-165.
- SAS Institute. 2002. SAS Proprietary Software Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- SELIM, S.A.; GAAFAR, K.M.; EL-BALLAL, S.S. Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. *Emir. J. Food Agric.* 2012. 24 (3): 264-271.
- SZEMBER, M.; CIOSEK, D.; PIETRZYK, J., 1976: Serological identification of *Escherichia coli* strains isolated from monkeys affected with colibacillosis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 20(3/4): 61-64..
- THAXTON, J. P., e H. S. SIEGEL *Poultry Sci.* 49:202–205. (1970).
- THAXTON, P.; SADLER, C.R.; GLICK, B. Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poult. Sci.*, v.47, p.264-266, 1968.
- THORNTON, P.A. Increased environmental temperature influences on ascorbic acid activity in the domestic fowl. *Federation Proceedings*, v.20, p.210 (Abstract), 1961.
- TORRES, K.A.A. Influência do estresse térmico no nascedouro sobre a imunidade humoral e as características zootécnicas de frangos de corte. 34 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – 2006.

VASCONCELOS, A.C.; MORO, L.; DA SILVA, P.M. Apoptose ou morte celular programada e sua importância em patologia veterinária. Rev. Port. Cienc. Vet., p.182-193, 1996.

WYATT, C.L.; WEAVER, W.D.; BEANE, W.L.; DENBOW, D.M. Influence of hatcher holding times on several physiological parameters associated with the immune system of chickens. Poultry Science, v. 65, p. 2156-2164, 1986.

YAHAV, S.; RATH, R.S.; SHINDER, D. The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. Journal of Thermal Biology, v. 29, p. 245-250, 2004.

YALCIN, S., N. BAGDATLIOGLU, V. BRUGGEMAN, E. BABACANOGLU, I. UYSAL, J. BUYSE, E. DECUYPERE, AND P. B. SIEGEL. 2008. Acclimation to heat during incubation. 2. Embryo composition and residual egg yolk sac fatty acid profiles in chicks. Poult. Sci. 87:1229–1236.

YALCIN, S., S. OZKAN, M. CABUK, J. BUYSE, E. DECUYPERE, AND P. B. SIEGEL. 2005. Pre- and post-natal conditioning induced thermotolerance on body weight, physiological responses, and relative asymmetry of broilers originating from young and old breeder flocks. Poult. Sci. 84:967–976.

FASE DE CRIAÇÃO

CAPÍTULO 5 – EFEITO DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DA ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

RESUMO - Ao ácido ascórbico (AA) têm sido atribuídos efeitos positivos sobre a redução das consequências do estresse por calor durante a criação de frangos de corte. No presente estudo foi analisado se injeção pré-incubação de AA em ovos incubados sob alta temperatura de incubação influenciava o desempenho e o rendimento de carcaça e partes de frangos de corte criados sobre estresse térmico. Ovos férteis de matrizes (Cobb®) foram usados em três tratamentos durante a incubação (sem injeção e incubados a 37,5°C; sem injeção e incubados a 39°C; com injeção de 6% de AA pré-incubação e incubados a 39°C), e três temperaturas de criação (fria, termoneutra e quente). Incubação a 39°C com ou sem injeção de ácido ascórbico não influenciou o desempenho de frangos criados sob temperatura fria, termoneutra ou quente. Frangos criados sob temperatura quente consumiram menos ração e ganharam menos peso, mas não sofreram alteração no rendimento de carcaça e corte.

Palavras-chave: consumo de ração, rendimento de carcaça, vitamina C.

1. Introdução

A alta sensibilidade ao calor responde pela alta taxa de mortalidade das linhagens comerciais de frango de corte com rápido e maior crescimento, quando essas aves são submetidas à elevação da temperatura ambiente que sai do limite de sua tolerância térmica. A elevada temperatura ambiente provoca diminuição no consumo de ração, ganho de peso e piora na conversão (TEETER et al., 1984); e, em caso extremo e/ou contínuo, leva os frangos ao óbito por deficiência na perda de calor gerado por sua alta taxa metabólica (MACARI et al., 1994). Diante disso, tem sido dada grande atenção ao desenvolvimento de novos métodos de manejo que possam evitar ou minimizar os efeitos do estresse térmico na criação.

Dentre as várias práticas atualmente estudadas para amenizar os efeitos do estresse por calor nas aves, está a manipulação nutricional dos ovos e a manipulação de sua temperatura de incubação visando desenvolver nos embriões e/ou fetos o potencial de responder epigeneticamente à elevação da temperatura ambiente na criação, possibilitando as aves menor sensibilidade ou maior resistência ao calor (TZSCHENTKE & PLAGEMANN, 2006; TZSCHENTKE, 2007).

É conhecido que a concentração plasmática de ácido ascórbico diminuiu e a de corticosterona aumenta no 15^o dia de incubação (WILSON & JAWORSKI, 1992), associado com o estresse do embrião devido ao aumento da sua temperatura corporal e dificuldade em perder calor, o que indica que o ácido ascórbico poderia ter uma ação anti-estresse (PARDUE & THAXTON, 1986), uma vez que pode levar à redução de corticosterona (SATTERLEE et al., 1994), principalmente em embriões incubados em altas temperaturas. O ácido ascórbico também tem se mostrado efetivo em diminuir os efeitos do estresse por calor sobre frangos no período de criação (MAHMOUD et al., 2004). Temperaturas elevadas impedem a absorção de vitamina C, reduzindo seus níveis no sangue e aumentando sua exigência (THORNTON, 1961; BRIGGS et al., 1994), sugerindo efeito benéfico dessa vitamina associado a um desequilíbrio entre demanda e disponibilidade dessa vitamina pela ave, sob condições de estresse por calor, o qual seria minimizado com a suplementação do ácido ascórbico (PARDUE & THAXTON, 1986).

Embora exista dados na literatura sobre os efeitos de altas temperaturas de incubação (LEKRISOMPONG et al., 2007; LOURENS et al., 2007; WINELAND et al., 2000; MOLENAAR et al., 2011) e da injeção de ácido ascórbico in ovo (ZAKARIA &

AL-ANEZI, 1996; GHONIM et al., 2009; PIRES et al., 2011; MOHAMMED et al., 2011; NOWACZEWSKI et al., 2012) sobre o desenvolvimento *in ovo*, pouco se conhecesse sobre o potencial uso de aditivos nutricionais anti-estressores *in ovo*, p. ex. o ácido ascórbico, como facilitadores ou desencadeadores de adaptação epigenética à elevação da temperatura ambiente na criação. Assim, o presente estudo analisou os efeitos da injeção de ácido ascórbico *in ovo* associada à manipulação da temperatura de incubação sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos de corte criados sob condições de estresse térmico.

2. Material e métodos

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (protocolo nº 7377/10), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Três mil ovos férteis de frango de corte (Cobb®) (Globoaves, Itirapina, SP), provenientes de matrizes com 47 semanas de idade, foram pesados e utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com 3 tratamentos durante a incubação (sem injeção e incubados a 37,5°C; sem injeção e incubados a 39°C; com injeção de 6% de ácido ascórbico (AA) pré-incubação e incubados a 39°C), e 3 temperaturas de criação (fria, termoneutra e quente).

Foram utilizadas cinco incubadoras/tratamento, cada uma com 200 ovos, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de 67±2g. As incubadoras (Premium Ecológica, IP200), com controle automático de temperatura, umidade e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas à 60% de umidade relativa até a transferência (18 dia de incubação) e com 70% nos dois últimos dias de incubação.

A injeção da solução de ácido ascórbico foi realizada antes do início da incubação. Após a limpeza do local com etanol 100%, a casca dos ovos foi perfurada, com uma agulha estéril [Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2")]. A solução com AA (Synth, 99% de pureza) foi injetada no albúmen a, aproximadamente, 6 mm abaixo da casca. Os ovos foram posicionados de modo horizontal, e a solução foi aplicada no polo mais findo do ovo (contrário à câmara de ar). Após a injeção, o orifício foi

fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. A solução de AA foi preparada com água Mili-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido sua foto sensibilidade. Após eclosão, 540 pintos com um dia de idade (Cobb®), machos e fêmeas, foram distribuídos em três câmaras climáticas, com 15 parcelas/câmara, 12 aves por parcela, resultando em 5 repetições por tratamento. Os pintos foram criados do 1º ao 42º dia de idade. As temperaturas de criação foram mantidas por meio de manejo de campânulas, monoblocos e exaustores, e apresentaram os valores contidos na Tabela 1. Os pintos foram vacinados contra doença de Marek e Bouda Aviária, e durante a criação contra Gumboro e Newcastle, de acordo com o programa de vacinação da linhagem. Durante todo o período experimental, as aves receberam água e ração à vontade. As rações foram à base de milho e farelo de soja (Tabela 2), reajustadas para as fases de criação (inicial: 1 a 21 dias; crescimento: 22 a 42 dias de idade), seguindo as exigências nutricionais estabelecidas por Rostagno et al. (2011).

Tabela 01 – Temperatura ambiente durante todo o período de criação.

Semanas	Temperatura ambiente (°C)		
	Fria	Termoneutra	Quente
1º	32±4	32±5	32±5
2º	30±4	31±5	32±7
3º	26±4	29±4	32±7
4º	22±5	27±3	32±5
5º	18±2	25±2	32±7
6º	14±4	23±2	32±7

Tabela 02 – Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento
Milho	60,83	63,74
Farelo de soja 45%	35,15	29,79
Óleo soja	-	3,12
Fosfato bicálcico	1,63	1,16
Calcário	0,84	0,76
Sal	0,42	0,44
L-Lisina HCL (78%)	0,25	0,21
DL-Metionina (99%)	0,29	0,23
L-Treonina	0,08	0,04
BHT	0,01	0,01
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50	0,50
TOTAL	100,00	100,00
	Composição nutricional calculada	
Proteína bruta (%)	21,27	18,86
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.883	3.121
Ca (%)	0,85	0,69
Na (%)	0,19	0,20
Fósforo disponível (%)	0,42	0,32
Metionina + cistina dig. (%)	0,88	0,77
Metionina dig. (%)	0,56	0,49
Lisina dig. (%)	1,22	1,05
Treonina dig. (%)	0,79	0,68
Triptofano dig. (%)	0,24	0,21
Arginina dig. (%)	1,32	1,16

* Nutrientes por quilograma de ração: fase de 1 a 21 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,4 g, Promotor de crescimento (bacitracina de zinco) 30 mg, (narsina+nicarbazina) 0,1g, Metionina 1,68g; Fase de 21 a 42 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,6 g, Promotor de crescimento (avilamicina) 7,5 mg, (monensina sódica) 0,1g, Metionina 1,4g.

Desempenho

Foram analisados o peso médio, o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar nas fases inicial (1-21 dias de idade) e final (21-42 dias de idade) e no total do período de criação (1-42 dias de idade), bem como a viabilidade criatória ao final da criação.

Rendimento de carcaça e partes

Aos 42 dias de idade, duas aves por box foram retiradas ao acaso, sendo 10 aves por tratamento, totalizando 90 aves, utilizando-se como critério de escolha, as aves que apresentaram o peso corporal próximo ao peso médio da respectiva parcela. Elas foram identificadas individualmente por anilhas e após um período de oito horas de jejum, foram sacrificadas por deslocamento cervical, seguido de sangria da jugular. Depois de depenadas e evisceradas, foi realizada a pesagem das carcaças, as quais foram submetidas a cortes para avaliação do rendimento de carcaça (desconsiderando cabeça e pés) e rendimento de partes (peito, coxa + sobrecoxa, asa + sobreasa e dorso). Para o cálculo de rendimento de carcaça e partes tomou-se como base o peso individual de cada ave, o qual foi obtido imediatamente antes do abate.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS® (SAS Institute, 2002). Em caso de efeito significativo (probabilidade de 5%), a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey.

3. Resultados

Desempenho

Não ocorreu efeito significativo dos tratamentos da incubação sobre o peso médio das aves, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Todavia, houve efeito significativo ($P < 0,05$) das temperaturas de criação para tais variáveis de desempenho nas três fases analisadas - de 1 a 21, de 21 a 42 e de 1 a 42 dias de idade (Tabelas 4, 5 e 6) - exceto para a conversão alimentar de 1 a 42 dias de idade. Como mostrado na Tabela 4, de 1 a 21 dias de idade, os maiores valores para os parâmetros de desempenho foram observados nas aves criadas em temperatura fria e termoneutra ($P < 0,05$). Com relação à fase de 21 a 42 dias de idade (Tab. 5), maior peso médio e consumo de ração foram observados em aves criadas em temperatura fria e termoneutra. Adicionalmente, para temperatura fria, houve maior consumo de ração e melhor conversão alimentar ($P < 0,05$). A Tabela 6 mostra que o peso médio foi maior e a conversão alimentar melhor para os frangos criados em temperatura fria e termoneutra ($P < 0,05$), além disto, para a temperatura fria houve um maior consumo de ração das aves ($P < 0,05$) de 1 a 42 dias de idade. Não houve efeito significativo ($P \geq 0,05$) dos tratamentos sobre as variáveis de desempenho analisadas, para ambas as fases de criação.

Tabela 03 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 1 a 21 dias de idade de frangos de corte.

	1-21 dias de idade			
	Peso médio (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar (g/g)
Tratamentos (TI)				
37,5°C	795,49±26,0	794,93±26,0	1093,47±69,5	1,37±0,08
39°C	795,49±26,7	794,55±26,9	1104,24±97,5	1,39±0,10
39°C+AA	795,83±25,1	795,28±25,0	1116,67±50,7	1,41±0,06
Temperaturas (TC)				
Fria	802,08±18,7a	801,53±18,7a	1155,21±42,0a	1,44a ±0,04
Termoneutra	804,51±28,8a	803,57±29,0a	1133,06±48,0a	1,41a ±0,06
Quente	780,21±21,3b	779,66±21,3b	1026,11±52,2b	1,32b ±0,07
Probabilidades				
TI	0,9992	0,9974	0,4767	0,4243
TC	0,0471	0,0417	<0,0001	<0,0001
TI x TC	0,8127	0,8345	0,1832	0,3711
CV (%)	3,15	3,17	4,17	4,20

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ±desvio padrão.

Tabela 04 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 21 a 42 dias de idade de frangos de corte.

	21-42 dias de idade			
	Peso médio (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar (g/g)
Tratamentos (T)				
37,5°C	2266,91±190	1471,42±179	2685,21±207	1,84±0,11
39°C	2252,11±236	1456,62±221	2707,65±271	1,88±0,13
Ácido Ascórbico-39°C	2260,83±150	1465,00±138	2685,67±180	1,84±0,08
Temperaturas (TP)				
Fria	2411,81±113a	1609,74±110a	2900,07±109a	1,81±0,08b
Termoneutra	2329,99±110a	1525,47±99a	2735,26±95b	1,80±0,10b
Quente	2038,06±72b	1257,85±67b	2443,19±108c	1,95±0,07a
Probabilidades				
T	0,9405	0,9329	0,8417	0,4892
TP	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003
T x TP	0,5083	0,5211	0,4213	0,7567
CV (%)	4,60	6,66	3,96	4,64

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ±desvio padrão.

Tabela 05 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 1 a 42 dias de idade de frangos de corte.

	1-42 dias de idade			
	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar (g/g)	Viabilidade criatória (%)
Tratamentos (T)				
37,5°C	2266,35±190	3778,68±271	1,67±0,05	97,22±5,43a
39°C	2251,17±235	3811,89±349	1,70±0,05	94,44±7,40b
Ácido Ascórbico-39°C	2260,28±150	3802,34±222	1,68±0,05	94,17±6,86b
Temperaturas (TP)				
Fria	2411,25±122a	4055,28±130a	1,68±0,04	99,31±2,40a
Termoneutra	2329,05±110a	3868,32±133b	1,66±0,06	97,32±3,77a
Quente	2037,51±72b	3469,31±121c	1,70±0,03	87,50±5,90b
Probabilidades				
T	0,9372	0,8025	0,4108	0,0249
TP	<0,0001	<0,0001	0,1406	<0,0001
T x TP	0,5106	0,1746	0,9882	0,4994
CV (%)	4,59	3,31	2,95	4,00

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ±desvio padrão.

Rendimento de carcaça e partes

De acordo com análise estatística dos dados (Tab. 7), não houve efeito significativo ($P \geq 0,05$) dos tratamentos na incubação e das temperaturas de criação sobre o rendimento de carcaça e partes.

Tabela 06 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o rendimento de carcaça e partes de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Carcaça	Coxa+sobrecoxa	Peito (%)	Dorso	Asa
Tratamentos (T)					
37,5°C	72,65±1,97	20,77±1,06	29,69±2,23	14,29±0,74	7,51±0,37
39°C	72,56±2,54	20,61±1,03	29,92±1,69	14,26±0,95	7,62±0,35
Ácido Ascórbico-39°C	72,74±3,39	20,60±1,14	29,58±1,62	14,64±1,02	7,43±0,37
Temperaturas (TP)					
Fria	72,02±2,50	20,53±1,12	29,84±1,49	14,20±0,87	7,42±0,39
Termoneutra	73,09±1,95	20,74±0,88	30,04±1,78	14,46±0,84	7,58±0,33
Quente	72,91±3,44	20,75±1,24	29,19±2,27	14,62±1,00	7,52±0,38
Probabilidades					
T	0,8923	0,7450	0,872	0,3103	0,2645
TP	0,3840	0,7880	0,4600	0,4125	0,3860
T x TP	0,0605	0,0619	0,9179	0,1620	0,6360
CV (%)	3,54	4,90	6,53	6,12	4,89

CV: coeficiente de variação. ±desvio padrão.

4. Discussão

As condições climáticas de regiões tropicais (alta temperatura e umidade) têm interferido negativamente na produtividade e na qualidade da criação de frangos de corte devido, principalmente, ao aumento da mortalidade, diminuição da ingestão de água e de alimento e, conseqüentemente, piora na conversão alimentar (SILVA & SILVA, 1998). Considerando que o ácido ascórbico melhora a resposta imunológica e a resistência a doenças em aves (PARDUE et al., 1985; RUND, 1989), e que a manipulação térmica durante a incubação pode favorecer uma adaptação epigenética durante a criação (TZSCHENTKE & PLAGEMANN, 2006; TZSCHENTKE, 2007) o presente estudo analisou se injeção de ácido ascórbico em ovos, associada com alta temperatura de incubação, influenciava o desempenho, rendimento de carcaça e partes de frangos de corte submetidos ao estresse por calor.

Os dados obtidos mostram que os tratamentos utilizados na incubação dos ovos (incubação contínua à 39°C com e sem injeção de ácido ascórbico) não influenciaram as variáveis de desempenho analisadas. Tais dados, se analisados juntamente com o fato de pintos de ovos injetados 6% de ácido ascórbico apresentarem maior porcentagem de leucócitos (Capítulo 4), indicam a possibilidade do uso de ácido ascórbico in ovo como forma de manejo da qualidade imunológica dos pintos na eclosão. Ausência de efeito da temperatura de incubação sobre o desempenho das aves, também foi observado por Joseph et al. (2006). Contudo, diferentemente do registrado no presente estudo, dados de literatura têm mostrado alterações no ganho de peso de frangos de ovos incubados em 38,9-39,7 °C, em comparação com incubação a 37,5-37,8 °C (LOURENS et al., 2005;. JOSEPH et al., 2006;. LEKSRISOMPONG et al., 2009; MOLENAAR et al., 2011). As diferenças entre os dados desses autores e os do presente estudo podem estar relacionadas com diferenças nas condições de incubação, como giro dos ovos, ventilação, bem como com relação ao peso dos ovos.

Ainda de acordo com os resultados do presente trabalho, temperatura fria de criação não alterou as variáveis de desempenho dos frangos, comparado à temperatura termoneutra, exceto o consumo de ração, que foi maior no período de crescimento (21-42 dias), respondendo pelo aumento no consumo total de ração na

criação (1-42 dias). Aumento no consumo de ração sob criação à temperatura fria também foi observado por Oliveira et al. (2006) e parece estar relacionado com manutenção da temperatura corporal. Ainda de acordo com os dados, temperatura quente de criação reduziu o desempenho das aves, as quais consumiram menos ração e tiveram pior conversão alimentar, causando menor ganho de peso e peso corporal. Efeitos similares do calor na criação sobre o desempenho dos frangos de corte também foram observado na literatura (AIN BAZIZ et al., 1996; GERAERT et al., 1996; YALÇIN et al., 1997).

Os tratamentos na incubação, todavia, não minimizaram nem evitaram os efeitos causados pelo estresse por calor na criação, indicando que incubação dos ovos à 39°C com ou sem injeção de ácido ascórbico não foram efetivos em proporcionar adaptação epigenética ao calor nos frangos de corte durante a criação.

Incubação dos ovos à alta temperatura com ou sem injeção de ácido ascórbico não influenciou o rendimento de carcaça e partes, o mesmo ocorrendo com a temperatura fria e quente de criação. Tais dados indicam que frangos criados sob temperatura quente apresentaram menor consumo de ração e que, apesar da redução no ganho de peso e peso corporal, não apresentaram alteração no rendimento das aves, o que pode ser interessante para a cadeia de processamento, pois apesar destas aves terem consumido menor quantidade de ração, não tiveram o rendimento de carcaça e partes comprometido. Molenaar et al., (2011) trabalhando com 37,8°C e 38,9°C durante a incubação, observaram que o rendimento de peito foi 1,0% maior para frangos de ovos incubados a 38,9°C, podendo estar relacionada com um aumento da proliferação das células musculares e da diferenciação celular para as aves incubadas em altas temperaturas (PIESTUN et al., 2009b).

5. Conclusões

Incubação a 39°C com ou sem injeção de ácido ascórbico não influenciaram o desempenho de frangos criados sob temperatura fria, termoneutra ou quente. Frangos criados sob temperatura quente consumiram menos ração e ganharam menos peso, mas não sofreram alteração no rendimento de carcaça e corte.

6. Referências bibliográficas

- AIN BAZIZ, H.; GE´RAERT, P. A.; PADILHA, J. C.; GUILLAUMIN, S. Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 75, p. 505–513, 1996.
- BRIGGS, G. M.; LUCKEY, T. D.; ELVENJEM, C. A.; HART, E. B. Effect of ascorbic acid on chick growth, when added to purified rations. **Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 55, p. 111-115, 1994.
- GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C. F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 195-204, 1996.
- GHONIM, A. I. A.; AWAD, A. L.; FATTOUH, M. H. A.; EL-SHHAT, A. M. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. **Egypt Poultry Science**, v. 29, p. 1085-1099, 2009.
- OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, R. F. M.; DONZELE, J. L.; CECON, P. R.; VAZ, R. G. M. V.; ORLANDO, U. A. D. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho e as características de carcaça de frangos de corte dos 22 aos 42 dias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p.1398-1405. 2006
- JOSEPH, N. S., LOURENS, A., MORAN JR., E. T. The effects of suboptimal eggshell temperature during incubation on broiler chick quality, live performance, and further processing yield. **Poultry Science**, v. 85, p. 932–938, 2006.
- LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler Incubation. 1. Effect of Elevated Temperature During Late Incubation on Body Weight and Organs of Chick. **Poultry Science**, v. 86, p. 685–2691, 2007.
- LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler incubation. 2. Interaction of incubation and brooding temperatures on broiler feed consumption and growth. **Poultry Science**, v. 88, p. 1321–1329, 2009.
- LOURENS, A.; BRAND VAN DEN, H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo

- growth and metabolism during incubation. **Poultry Science**, v. 86, p. 2194–2199, 2007.
- LOURENS, A.; BRAND VAN DEN, H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability and post-hatch development. **Poultry Science**, v. 84, p. 914–920, 2005.
- MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 1.ed, Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994. 296 p.
- MAHMOUD, K. Z.; EDENS, F. W.; EISEN, E. J. et al. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 35–42, 2004.
- MOHAMMED, K. A.; EL-BOGHDADY, A.; SOLIMAN, M. A. H.; ABD AL-GALIL, M. A.; ABD AL-ALEEM, N. M. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. **Egypt Poultry Science**, v. 31, n. 2, p. 379-392, 2011.
- MOLENAAR, R.; ANKER VAN DEN, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; BRAND VAN DEN, H. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration during incubation on the developmental and physiological status of broiler hatchlings in the perinatal period. **Poultry Science**, v. 90, p. 1257–1266, 2011.
- NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSZTIANIAK, S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. **Folia Biologica**, v. 60, p. 93-97, 2012.
- PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P. Ascorbic Acid in Poultry: A Review. **World's Poultry Science Journal**, v. 42, p. 107–123, 1986.
- PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P.; BRAKE, J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. **Journal Applied of Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1511-1516, 1985.
- PIESTUN, Y.; HALEVY, O.; YAHAV, S. Thermal manipulations of broiler embryos – the effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Science**, v. 88, p. 2677–2688, 2009b.

- PIRES, D. L.; SGAVIOLI, S.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. C. Acido ascórbico *in ovo* sobre a eclodibilidade de ovos. **In:** 21º Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal – ALPA; 2011; Montevideo, Uruguai.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.
- RUND, B. Vitamin C plays a role in immunity. **Poultry Digest**, v. 48, p. 44–55, 1989.
- SAS Institute. **SAS Proprietary Software Release 9.2**. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2002.
- SATTERLEE, D. G.; JONES, R. B.; RYDER, H. Effects of Ascorbyl-2-Polyphosphate on Adrenocortical Activation and Fear-Related Behavior in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 73, p. 194–201, 1994.
- SILVA, I. J. O.; SILVA, M. A. N. Dicas de sucesso: fique por dentro de algumas medidas simples, voltadas à climatização da produção de frangos, que podem garantir o sucesso da criação neste verão. **Avicultura Industrial**, v. 88, p. 46-47, 1998.
- TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; MURRAY, E. Force feeding methodology and equipment for poultry. **Poultry Science**, v. 63, n. 4, p.573-575, 1984.
- THORNTON, P. A. Increased environmental temperature influences on ascorbic acid activity in the domestic fowl. **Federation Proceedings**, v. 20, p. 210, 1961.
- TZSCHENTKE, B. Attainment of thermoregulation and its influence by environmental factors. **Poultry Science**, v. 86, p.1025-1036, 2007.
- TZSCHENTKE, B.; PLAGEMANN, A.; Imprinting and critical periods in early development. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 626-637, 2006.
- WILSON, J. X.; JAWORSKI, E. M. Effect of Oxygen on Ascorbic Acid Uptake and Concentration in Embryonic Chick Brain. **Neurochemical Research**, v. 17, p. 571–576, 1992.
- WINELAND, M. J.; MANN, K. M.; FAIRCHILD, B. D.; CHRISTENSEN, V. L. Effect of different setter and hatcher temperatures upon the broiler embryo. **Poultry Science**, v. 79, p. 123 (Abstr.), 2000.

YALÇIN, S.; SETTAR, P.; OZKAN, S.; CAHANER, A. Comparative evaluation of three commercial broiler stocks in hot versus temperate climates. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 921-929, 1997.

ZAKARIA, A. H.; AL-ANEZI, M. A. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality and the body weights of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 75, p. 1204–1209, 1996.

CAPÍTULO 6 – EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E ZOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB CALOR

RESUMO – O crescimento pós-eclosão das linhagens de frango com alta taxa de crescimento pode ser influenciado por estresse por calor, devido à sua alta produção de calor metabólico e dificuldade para manter sua normotermia sob altas temperaturas. Manipulação da temperatura de incubação e aplicação de ácido ascórbico sobre o ovo e sua ingestão têm sido analisadas quanto à seus efeitos como indutor de adaptação epigenética e como antiestressor, respectivamente, em frangos submetidos às condições de estresse por calor ambiental. Contudo, os efeitos da associação entre alta temperatura de incubação e injeção de ácido ascórbico *in ovo* sobre a resposta do frango ao estresse por calor durante seu crescimento pós-eclosão ainda não foram analisados. No presente estudo, ovos férteis de matrizes de frango de corte (Cobb®) foram submetidos a três tratamentos durante a incubação (ovos incubados à 37,5°C sem injeção de AA; ovos incubados à 39°C sem injeção AA; ovos incubados à 39°C e injetados com 6 µg de AA/100 µL de água). Após eclosão, os pintos dos três tratamentos de incubação foram criados sob temperatura fria, termoneutra e quente. Foram analisados a temperatura corporal superficial e a retal, os parâmetros hematológicos, bioquímicos e leucocitários, e os parâmetros zotécnicos (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade criatória) dos frangos aos 42 dias de idade. Aves criadas em temperatura quente tiveram menor ganho de peso, consumo de ração e viabilidade criatória, quando comparadas com as criadas em temperaturas fria e termoneutra. Os valores de $pVCO_2$ foram maiores nas aves criadas sob temperatura quente do que fria e os valores de pVO_2 aumentaram com o aumento da temperatura de criação. Frangos de ovos incubados à 39°C e injetados com AA não apresentaram alteração no valor de H/L, no entanto, apresentaram linfocitose, leucocitose, heterofilia e monocitopenia. Em conclusão, ácido ascórbico e hipertermia apresentaram efeito estimulador sobre o sistema imune celular na incubação e na criação, respectivamente. Alta temperatura de incubação, associada ou não à injeção de ácido ascórbico pré-

incubação, induziu adaptações no balanço eletrolítico das aves, não favorecendo a ocorrência da alcalose respiratória em frangos criados sob temperatura quente; todavia, não impediram a queda no desempenho dessas aves.

Palavras-chave: calor, eritrograma, estresse, frangos, leucograma, vitamina C,

1. Introdução

As linhagens atuais de frangos de corte para alta taxa de crescimento em menor período de tempo são altamente sensíveis ao calor, o que pode acarretar alta ou total mortalidade dessas aves em curto período de aquecimento da temperatura do ambiente de criação. Para tentar restabelecer a normotermia, os frangos utilizam respostas fisiológicas que lhes possibilitam aumentar a perda de calor e reduzir a produção de calor metabólico, como, por exemplo, aumento da circulação periférica de sangue e eriçamento das penas para aumentar da dissipação de calor pela pele, aumento do consumo hídrico, redução de atividade e consumo de ração (SCHMID, 1998). Simultaneamente, as aves apresentam aumento na taxa respiratória, o que pode resultar em perdas significativas de CO_2 fazendo com que a pressão parcial de CO_2 (pVCO_2) diminua, levando à queda na concentração de ácido carbônico (H_2CO_3) e hidrogênio (H^+) e elevação do pH sanguíneo. Em resposta à tais alterações, os rins aumentam a excreção de bicarbonato (HCO_3^-) e reduzem a excreção de H^+ na tentativa de manter o equilíbrio ácido-base da ave (RONDÓN et al., 2000; BORGES, et al., 2003; MUSHTAQ et al., 2005) e restabelecer as condições de homeostase. Sob períodos longos de condições inadequadas de temperatura, entretanto, as aves não conseguem restabelecer e manter seu equilíbrio homeostático, o que acarreta alcalose respiratória, afetando seu crescimento e sobrevivência. Estresse por calor na criação pode deprimir o sistema imune dos frangos (ROSALES et al., 1989; PUVADOLPIROD & THAXTON, 2000), alterando seu potencial de resposta imunológica. A ação do estresse sobre a imunidade, todavia, varia com a intensidade e duração do estímulo estressor e entre linhagens e indivíduos (MORGULIS, 2002), podendo causar imunossupressão (THAXTON & SIEGEL, 1970; BRAKE, 1989; MILLER & QURESHI, 1991) ou imunoestimulação (COLES, 1986; RUCKEBUSH et al., 1994; CUNNINGHAM, 1999).

Manipulação térmica na incubação tem sido analisada quanto ao desenvolvimento de adaptações epigenéticas, que propiciem às aves apresentarem termotolerância no período de criação. Piestun et al. (2009) e Yalçin et al. (2008) mostraram que temperaturas acima da preconizada durante a incubação pode melhorar a termotolerância em frangos de corte. Quando as aves foram incubadas em altas temperaturas e passaram por estresse térmico durante a criação, elas

foram capazes de manter o crescimento, em comparação com as aves que foram incubadas sob temperatura controle (YALÇIN et al., 2008). O ácido ascórbico (AA), por sua vez, tem se mostrado efetivo em diminuir os efeitos do estresse térmico durante a criação (MAHMOUD et al., 2004), uma vez que temperaturas elevadas impedem a absorção de vitamina C, reduzindo seus níveis no sangue e aumentando sua exigência (THORTON, 1961; BRIGGS et al., 1994). Características de desempenho e função imune de aves que sofreram estresse por calor são significativamente melhoradas com o aumento nos níveis de vitamina C (PARDUE & THAXTON, 1984; PARDUE et al., 1985; CAMPO & DÁVILA, 2002; FURLAN & MACARI, 2002).

Embora estudos prévios tenham analisado o efeito da alteração intermitente da temperatura de incubação durante a fase fetal sobre a resistência imunológica e as características hematológicas dos frangos criados sob temperatura quente (KIDD, 2004; YAHAV et al., 2004; YAÇIN et al., 2005; YAÇIN et al., 2008; GHONIM et al., 2009; SELIM et al., 2012), faltam informações na literatura sobre a associação entre continuamente alta temperatura de incubação associada à injeção de ácido ascórbico in ovo antes da incubação sobre respostas fisiológicas dos frangos ao calor. Assim, pode ser especulado que alta temperatura de incubação associada com injeção de AA in ovo pode alterar os efeitos do estresse por calor sobre o desempenho dos frangos, minimizando-os ou evitando-os.

No presente estudo, foi analisado o efeito de continuamente alta temperatura de incubação (39°C) associada ou não à injeção de ácido ascórbico (6µg/100µL água) antes da incubação sobre a temperatura corporal, os parâmetros zootécnicos e os parâmetros eritrocitários, leucocitários, gases e bioquímicos do sangue de frangos de corte criados sob temperatura fria, quente e termoneutra preconizada para a linhagem.

2. Material e métodos

O presente estudo foi realizado seguindo protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo n° 7377/10) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Delineamento experimental, incubação e manejo

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com 3 tratamentos durante a incubação (ovos incubados à 37,5°C; ovos incubados à 39°C; ovos incubados à 39°C e injetados com 6 µg de ácido ascórbico/100 µL de água antes da incubação) e 3 temperaturas de criação (fria, termoneutra e quente). Para isso, ovos férteis de frango de corte (Cobb®) (Globoaves, Itirapina, SP), provenientes de matrizes com 47 semanas de idade, foram distribuídos homoganeamente pelo peso em cinco incubadoras/tratamento, cada uma com 200 ovos, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de 67±2g. As incubadoras (Premium Ecológica, IP200), com controle automático de temperatura, umidade e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas a 60% de umidade relativa até a transferência e com 70% nos dois últimos dias de incubação. Para injeção de ácido ascórbico, os ovos foram colocados em posição horizontal e, após limpeza local com etanol 100%, sua casca foi perfurada próximo à sua extremidade mais fina (extremidade contrária à câmara de ar) com uma agulha estéril [Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2)]. Em seguida, foi realizada injeção de 100µL de solução aquosa de AA (6 µg) (Synth, 99% de pureza) no albúmen à, aproximadamente, 6 mm abaixo da casca. Após a injeção, o orifício foi fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. A solução de AA foi preparada com água Mili-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido sua foto sensibilidade. Após eclosão, 540 pintos com um dia de idade (Cobb®), machos e fêmeas, foram distribuídos em três câmaras climáticas, com 15 parcelas/câmara, 12 aves por parcela, resultando em 5 repetições por tratamento. Os pintos foram criados do 1º ao 42º dia de idade. As temperaturas de criação foram mantidas por meio de manejo de campânulas, monoblocos e exaustores, e apresentaram os valores contidos na Tabela 1. Os pintos foram vacinados contra doença de Marek e Bouda Aviária, e durante a criação contra Gumboro e Newcastle, de acordo com o programa de vacinação da linhagem. Durante todo o período experimental, as aves receberam água e ração à vontade. As rações foram à base de milho e farelo de soja (Tabela 2), reajustadas para as fases de criação (inicial: 1 a 21 dias; crescimento: 22 a 42 dias de idade), seguindo as exigências nutricionais estabelecidas por Rostagno et al. (2011).

Tabela 01 – Temperatura ambiente durante todo o período de criação.

Semanas	Temperatura ambiente (°C)		
	Fria	Termoneutra	Quente
1 ^o	32±4	32±5	32±5
2 ^o	30±4	31±5	32±7
3 ^o	26±4	29±4	32±7
4 ^o	22±5	27±3	32±5
5 ^o	18±2	25±2	32±7
6 ^o	14±4	23±2	32±7

Tabela 02 – Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento
Milho	60,83	63,74
Farelo de soja 45%	35,15	29,79
Óleo soja	-	3,12
Fosfato bicálcico	1,63	1,16
Calcário	0,84	0,76
Sal	0,42	0,44
L-Lisina HCL (78%)	0,25	0,21
DL-Metionina (99%)	0,29	0,23
L-Treonina	0,08	0,04
BHT	0,01	0,01
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50	0,50
TOTAL	100,00	100,00
	Composição nutricional calculada	
Proteína bruta (%)	21,27	18,86
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.883	3.121
Ca (%)	0,85	0,69
Na (%)	0,19	0,20
Fósforo disponível (%)	0,42	0,32
Metionina + cistina dig. (%)	0,88	0,77
Metionina dig. (%)	0,56	0,49
Lisina dig. (%)	1,22	1,05
Treonina dig. (%)	0,79	0,68
Triptofano dig. (%)	0,24	0,21
Arginina dig. (%)	1,32	1,16

* Nutrientes por quilograma de ração: fase de 1 a 21 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,4 g, Promotor de crescimento (bacitracina de zinco) 30 mg, (narsina+nicarbazina) 0,1g, Metionina 1,68g; Fase de 21 a 42 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,6 g, Promotor de crescimento (avilamicina) 7,5 mg, (monensina sódica) 0,1g, Metionina 1,4g.

Temperatura da superfície corporal e retal

Aos 41 dias de idade, as temperaturas da asa, cabeça, canela e dorso de cinco aves por tratamento foram obtidas com termômetro infravermelho (Instrutemp, ITTI 550, com escala de -32°C a 530°C e precisão de $\pm 2^\circ\text{C}$). A temperatura (T) superficial corporal média foi calculada pela fórmula: temperatura superficial média = $(0,12 \times T_{\text{asa}}) + (0,03 \times T_{\text{cabeça}}) + (0,15 \times T_{\text{canela}}) + (0,70 \times T_{\text{dorso}}$), descrita por Richard (1971). A temperatura retal das aves também foi mensurada, utilizando-se sensor de teletermômetro (Max-Min Thermo Hygro).

Desempenho

O ganho de peso (g), o consumo de ração (g), a conversão alimentar (g/g) e a viabilidade criatória (%) foram determinados para o período total de criação (de 1 a 42 dias de idade).

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Aos 41 dias de idade, 10 aves/tratamento (2 aves/repetição) foram utilizadas na análise das variáveis sanguíneas: contagem de células vermelhas (RBC, nº células/mm³ 10^{-6}), hematócrito (HCT, % PCV), hemoglobina (HGB, g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, %), pH, pressão venosa parcial de dióxido de carbono (pvCO₂, mmHg), pressão venosa parcial de oxigênio (pvO₂, mmHg), excesso de base (BE_{ecf}, mmol/l), dióxido de carbono total (TCO₂, mmol/l), saturação de oxigênio (sO₂, %), concentração de sódio (Na⁺, mmol/l), concentração de potássio (K⁺, mmol/l), concentração de cálcio ionizado (Cai, mmol/l), bicarbonato (HCO₃⁻, mmol/l) e glicose (mg/dL). Os dados de RBC foram obtidos a partir de contagens realizadas em câmara de Neubauer, utilizando amostras de sangue diluídas (1:300) com solução de azul de toluidina 0,01%. Para isso, foi utilizado sangue coletado da veia jugular e mantido em tubo plástico tipo “ependorf” contendo 15µl de heparina/1 ml de sangue (Glistab, cat. 29, Labtest Diagnóstica) em gelo. Os dados das demais variáveis sanguíneas foram obtidos em analisador clínico portátil (i-STAT[®]Co. – Abbott Laboratories – EUA, cartucho Cg8+[®]), imediatamente após coleta, utilizando-se sangue retirado da veia jugular

com seringa contendo heparina sódica. Os valores de pH, $p\text{vCO}_2$, $p\text{vO}_2$ foram corrigidos pela temperatura corporal superficial média (TSM). Os valores de VCM, HCM e CHCM foram calculados pelas fórmulas $\text{VCM}=\text{HCT}/\text{RBC}\times 10$; $\text{HCM}=\text{HGB}/\text{RBC}\times 10$ e $\text{CHCM}=\text{HGB}\times\text{HCT}\times 100$.

Contagem total e diferencial de leucócitos e relação heterófilo/linfócito

Aos 41 dias de idade, dez frangos por tratamento (2 aves/repetição) foram utilizados para as análises leucocitárias. As amostras de sangue foram coletadas a partir da jugular e mantidas em tubos de plástico com 15 μl de heparina/1 ml de sangue (Glistab, cat. 29, Labtest Diagnóstica) em gelo. Para as contagens diferenciais dos leucócitos, um esfregaço sanguíneo por ave foi realizado imediatamente após a coleta. Após secagem, os esfregaços foram corados com kit Panótico, rapidamente desidratados em série de concentração crescente de etanol e diafanizados em xilol, e montados com entelan. As porcentagens dos diferentes tipos de leucócitos (linfócitos, monócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e trombócitos) foram calculadas a partir da análise de 100 leucócitos por ave. As contagens diferenciais de leucócitos também foram expressas em mm^3 . A relação heterófilo/linfócito (H/L) também foi calculada para cada ave. As contagens totais de leucócitos (número de leucócitos/ mm^3) foram realizadas em câmara de Neubauer, logo após a coleta de amostras de sangue, utilizando amostras de sangue diluídas (1:300) com azul de toluidina 0,01%.

Análise Estatística

Os dados de todas as variáveis foram verificados quanto à presença de *outliers* e atendimento às pressuposições de normalidade dos erros estudentizados (teste de Cramer-von-Misses) e de homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Depois de constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS ® (SAS Institute, 2002). Em caso de efeito significativo (5%), a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey.

3. Resultados

Temperatura da superfície corporal e retal

Os resultados (Tab. 4) mostram que a temperatura média da superfície corporal e retal dos frangos de corte, aos 41 dias de idade, não foram influenciadas pelas temperaturas de incubação e injeção de AA, mas foram afetadas significativamente pelas temperaturas ($P < 0,05$) de criação. Os valores de ambas aumentaram com o aumento da temperatura de criação.

Tabela 03 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a temperatura da superfície corporal (TSC) e retal (TR) de frangos de corte aos 41 dias de idade.

	TSC	TR
	°C	
Tratamentos Incubação (TI)		
37,5°C	34,48	39,36
39°C	35,19	39,04
39°C+AA	35,30	39,27
Temperaturas Criação (TC)		
Fria	31,75c	38,37c
Termoneutra	35,17b	39,24b
Quente	38,06a	39,90a
Probabilidades		
TI	0,5606	0,2590
TC	<0,0001	<0,0001
TI x TC	0,7185	0,9512
CV (%)	6,38	0,99

39°C+AA: incubação à 39°C de ovos injetados com ácido ascórbico. CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Desempenho

Como mostrado na Tabela 5, houve influência significativa ($P < 0,05$) dos tratamentos na incubação apenas sobre a viabilidade criatória e das temperaturas de criação sobre o ganho de peso, consumo de ração e viabilidade criatória. A conversão alimentar não foi significativamente pelos tratamentos de incubação e temperaturas de criação. O ganho de peso das aves criadas sob temperatura fria e termoneutra foi similar, e maior do que o das aves criadas sob temperatura quente. O consumo de ração diminuiu com o aumento da temperatura de criação. A viabilidade criatória foi menor para as aves de ovos incubados à temperatura quente com ou sem injeção de AA, do que as aves de ovos incubados à 37,5°C. Ocorreu menor viabilidade criatória também, para as aves criadas em temperatura quente.

Tabela 04 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o desempenho de 1 a 42 dias de idade de frangos de corte.

	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar (g/g)	Viabilidade criatória (%)
Tratamentos Incubação (TI)				
37,5°C	2266,35	3778,68	1,67	97,22a
39°C	2251,17	3811,89	1,70	94,44b
39°C+AA	2260,28	3802,34	1,68	94,17b
Temperaturas Criação (TC)				
Fria	2411,25a	4055,28a	1,68	99,31a
Termoneutra	2329,05a	3868,32b	1,66	97,32a
Quente	2037,51b	3469,31c	1,70	87,50b
Probabilidades				
TI	0,9372	0,8025	0,4108	0,0249
TC	<0,0001	<0,0001	0,1406	<0,0001
TI x TC	0,5106	0,1746	0,9882	0,4994
CV (%)	4,59	3,31	2,95	4,00

39°C+AA: incubação à 39°C de ovos injetados com ácido ascórbico. CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Parâmetros hematológicos respiratórios

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) dos tratamentos da incubação e das temperaturas de criação sobre o RBC, VCM e CHCM. Os valores de HCT e o HGB foram influenciados significativamente ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,06$) pelos tratamentos utilizados durante a incubação, e foram maiores em frangos incubados à 39°C do que à 37,5°C, não ocorrendo diferença entre os valores obtidos para esses frangos e os obtidos para os frangos ovos incubados à 37,5°C.

Tabela 05 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre os parâmetros sanguíneos de frangos de corte aos 41 dias de idade.

	HCT (%PCV)	HGB (g/dL)	RBC (células/mm ³ x10 ⁻⁶)	HCM (pg)	VCM (fL)	CHCM (%)
Tratamentos Incubação (TI)						
37,5°C	19,87b	6,76b	4,46	17,76	52,23	34,03
39°C	21,86a	7,42a	5,99	15,21	44,78	33,95
39°C+AA	20,20ab	6,87ab	4,56	21,13	62,11	34,02
Temperaturas Criação (TP)						
Fria	21,43	7,29	6,14	13,38	39,31	34,04
Termoneutra	19,87	6,75	4,26	20,37	59,88	34,00
Quente	20,60	7,00	4,61	20,25	59,66	33,95
Probabilidades						
TI	0,0445 *	0,0518**	0,2842	0,3891	0,3894	0,4602
TC	0,1568	0,1518	0,1915	0,2213	0,2174	0,4559
TI x TC	0,1394	0,1319	0,4225	0,6059	0,5965	0,5444
CV (%)	11,10	11,12	45,64	55,24	55,08	0,46

39°C+AA: incubação à 39°C de ovos injetados com ácido ascórbico. VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. CV: coeficiente de variação. HCM: hemoglobina corpuscular média. HCT: valores de hematócrito. HGB: teores de hemoglobina. RBC: número total de hemácias. . a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey . *: P<0,05. P<0,06.

Parâmetros bioquímicos do sangue

Os valores registrados para pH, $p\text{vCO}_2$, $p\text{vO}_2$, BEecf, TCO_2 , sO_2 , HCO_3^- são mostrados na Tabela 07. Houve efeito significativo ($P < 0,05$) das temperaturas de criação sobre a $p\text{vCO}_2$ e $p\text{vO}_2$ sanguíneo de frangos, os valores de $p\text{vCO}_2$ foram maiores nas aves criadas sob temperatura quente do que fria e os valores de $p\text{vO}_2$ aumentaram com o aumento da temperatura de criação. Efeito significativo ($P < 0,05$) dos tratamentos de incubação ocorreram sobre os valores de BEecf e HCO_3^- , os quais foram maiores nos frangos incubados à 39°C do que à 37,5 °C, não havendo diferença significativa entre os valores registrados para os frangos de ovos incubados à 37,5 °C e 39°C e os de ovos injetados com AA e incubados à 39 °C. Os tratamentos na incubação e as temperaturas de criação não afetaram os valores de sO_2 e TCO_2 . Houve interação significativa ($P < 0,10$) entre os tratamentos da incubação e as temperaturas de criação para o pH sanguíneo das aves. De acordo com a interação (Tab. 08), pH sanguíneo dos frangos de ovos injetados com ácido ascórbico e incubados à 39°C foi maior sob criação à temperatura quente do que à temperatura fria, mas não houve diferença entre os valores de pH registrados para estas aves e as criadas sob temperatura termoneutra.

Tabela 06. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre sangue venoso de frangos de corte aos 41 dias de idade.

	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	Beecf (mmol/l)	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	sO ₂ (%)	TCO ₂ (mmol/l)	pH
Tratamentos Incubação (TI)							
37,5°C	33,44	32,71	-5,67b	20,12	70,47	21,33	7,38
39°C	35,15	33,64	-3,80a	21,64	69,60	22,87	7,39
39°C+AA	34,84	35,67	-4,53ab	20,93	72,13	22,13	7,38
Temperaturas Criação (TC)							
Fria	31,81b	27,43c	-4,60	21,26	73,13	22,60	7,41
Termoneutra	35,15ab	33,00b	-4,67	21,05	69,07	22,33	7,38
Quente	36,47a	41,20a	-4,73	20,39	71,00	21,40	7,36
Probabilidade							
TI	0,5805	0,2536	0,0484	0,0861	0,6510	0,1113	0,7663
TC	0,0309	<0,0001	0,9836	0,3996	0,5383	0,2206	0,0307
TI x TC	0,4985	0,0615	0,1832	0,5102	0,1386	0,6732	0,0367
CV (%)	13,75	16,07	-42,98	8,70	10,70	8,79	0,61

BEecf: excesso de base no fluido extra-celular. CV: coeficiente de variação. HCO₃⁻: bicarbonato. pCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono. pO₂: pressão parcial de oxigênio. sO₂: saturação de oxigênio. TCO₂: dióxido de carbono total. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 07- Desdobramento das interações entre os tratamentos na incubação e as temperaturas na criação para o pH sanguíneo de frangos de corte com 41 dias de idade.

Tratamentos Incubação	Temperaturas Criação (°C)			P
	Fria	Termoneutra	Quente	
37,5°C	7,36	7,39	7,38	0,4927
39°C	7,42	7,38	7,36	0,1012
39°C+AA	7,44 A	7,36 AB	7,35 B	0,0041
P	0,1167	0,4342	0,5740	

39°C+AA: incubação à 39°C de ovos injetados com ácido ascórbico. a-b: médias seguidas por letras distintas na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela 9 contém os dados de Na⁺, K⁺, Cai e glicose no sangue. Os valores de Na⁺ e K⁺ não foram influenciados pelos tratamentos na incubação e nem pelas temperaturas de criação. Os valores de Cai e glicose foram influenciados significativamente (P<0,05) apenas pelos tratamentos de incubação. Frangos de ovos incubados à 39°C injetados ou não com ácido ascórbico não diferiram entre si na concentração de Cai, mas tiveram valores maiores do que os frangos de ovos incubados à 37,5°C. A concentração de glicose foi maior nos frangos de ovos à 39°C, injetados ou não com ácido ascórbico, do que do que nos incubados à 37,5°C.

Tabela 08. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre íons Na^+ e K^+ , Cai e glicose no sangue de frangos de corte com 41 dias de idade.

Tratamentos (T)	Na^+	K^+	Cai	Glicose
	(mmol/l)			(mg/dL)
37,5°C	148,07	4,84	0,73b	211,00b
39°C	149,53	5,01	0,86a	228,93a
39°C+AA	147,67	5,15	0,86a	228,43a
Temperaturas (TP)				
Fria	149,13	4,79	0,81	225,69
Termoneutra	147,73	5,12	0,80	223,73
Quente	148,40	5,08	0,83	221,08
Probabilidade				
T	0,1136	0,0708	0,0265	0,0373
TP	0,3208	0,0604	0,8548	0,8631
T x TP	0,1620	0,1893	0,2853	0,3939
CV (%)	1,69	7,61	17,69	8,32

39°C+AA: incubação à 39°C de ovos injetados com ácido ascórbico. Cai: concentração de cálcio ionizado. CV: coeficiente de variação. K^+ : concentração de potássio. Na^+ : concentração de sódio. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Contagem total e específica de leucócitos e relação heterófilo/linfócito (H/L)

Os dados do leucograma são apresentados nas Tabelas 10 e 11. As contagens totais de leucócitos (CTLeu) e as contagens de linfócitos, dadas em nº de células/ mm^3 , foram maiores nos frangos de ovos incubados à 39°C injetados com AA e nos frangos criados à temperatura quente do que nos frangos dos outros tratamentos de incubação e criação, respectivamente, que não diferiram entre si. As contagens de basófilos (nº cel/ mm^3) foram influenciadas apenas pelos tratamentos de incubação e foram maiores nos frangos de ovos incubados à 39°C do que de ovos incubados à 39°C e injetados com AA, e ambos não diferiram ($P>0,05$) dos valores registrados para os frangos de ovos incubados à 37,5 °C. As contagens de

eosinófilos foram influenciadas ($P \leq 0,05$) apenas pela temperatura de criação e foi maior ($P \leq 0,05$) nos frangos criados à temperatura quente do à temperatura fria e termoneutra, entre os quais não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

Na Tabela 11 são mostrados os dados das contagens de heterófilos, monócitos, trombócitos e H/L. As porcentagens de heterófilos foram influenciadas significativamente ($P \leq 0,05$) pelos tratamentos na incubação e pelas temperaturas de criação. Dadas em %, as porcentagens de heterofilos foram similares sob incubação à 39°C e à $39^{\circ}\text{C}+\text{AA}$, porém maiores do que à $37,5^{\circ}\text{C}$, e maiores sob criação à temperatura quente do que sob temperatura fria e termoneutra, sob as quais contagens similares de heterofilos foram registradas. Dadas em n° células/ mm^3 , as contagens de heterofilos foram maiores em frangos de ovos incubados $39^{\circ}\text{C}+\text{AA}$ e nos frangos criados à temperatura quente. Houve efeito significativo ($P \leq 0,05$) apenas da temperatura de incubação sobre as contagens de monócitos, as quais, quando expressas em %, foram menores em frangos de ovos incubados à $39^{\circ}\text{C}+\text{AA}$ do que à $37,5^{\circ}\text{C}$. As contagens de trombócitos e a relação H/L não foram influenciadas significativamente ($P \leq 0,05$) apenas pela temperatura de criação.

Tabela 09 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre as contagens totais de leucócitos (CTLeu), e contagens de linfócitos, basófilos e eosinófilos de frangos de corte com 41 dias de idade.

	CTLeu (células/mm ³)	Linfócitos (%)(mm ³)	Basófilos (%)(mm ³)	Eosinófilos (%)(mm ³)
Tratamentos Incubação (TI)				
37,5°C	454.000b	57,56 (262.680b)	3,33 (13.823ab)	2,33 (10.167)
39°C	391.667b	54,44 (212.543b)	2,56 (9.030b)	2,22 (8.970)
39°C+AA	702.000a	56,14 (388.827a)	3,00 (20.363a)	1,75 (11.936)
Temperaturas Criação (TC)				
Fria	447.750b	56,44 (257.108b)	3,89a (16.453)	2,00 (8.543b)
Termoneutra	415.875b	55,25 (242.980b)	3,00ab (14.183)	2,00 (8.520b)
Quente	614.250a	56,37 (344.390a)	1,88b (11.606)	2,38 (14.268a)
Probabilidade				
TI	0,0003	0,3863 (0,0002)	0,2731 (0,0238)	0,4990(0,2964)
TC	0,0110	0,8327 (0,0126)	0,0034 (0,5413)	0,5996 (0,0232)
TI x TC	0,3352	0,6146 (0,2514)	0,2016 (0,9145)	0,4072 (0,5640)
CV (%)	22,74	8,29 (23,86)	33,27 (52,26)	41,60 (45,12)

39°C+AA: incubação à 39°C de ovos injetados com ácido ascórbico. CV: coeficiente de variação. CTLeu: contagem total de leucócitos. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10 – Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre as contagens de heterófilos, monócitos, trombócitos e a relação H/L de frangos de corte com 41 dias de idade.

	Heterófilos (%)(mm ³)	Monócitos (%)(mm ³)	Trombócitos (%)(mm ³)	H/L (%)(mm ³)
Tratamentos Incubação (TI)				
37,5°C	25,50b (120.540b)	6,78a (30.570)	3,89 (16.913)	0,46 (0,46)
39°C	31,67a (126.847b)	6,33ab (24.093)	2,89 (10.660)	0,59 (0,59)
39°C+AA	30,25a (186.862a)	4,43b (36.545)	3,25 (22.872)	0,54 (0,62)
Temperaturas Criação (TC)				
Fria	28,33b (1116.873b)	5,56 (21.970)	4,44 (15.221)	0,51 (0,51)
Termoneutra	28,12b (117.034b)	6,62 (33.987)	3,56 (18.640)	0,51 (0,59)
Quente	31,38a (193.298a)	5,75 (35.090)	1,88 (14.842)	0,58 (0,57)
Probabilidade				
TI	0,0011 (0,0157)	0,0347 (0,2305)	0,5820 (0,3046)	0,0648 (0,1512)
TC	0,0540 (0,0052)	0,6023 (0,1199)	0,0716 (0,5841)	0,4334 (0,5865)
TI x TC	0,1319 (0,4918)	0,2051 (0,4126)	0,6864 (0,5447)	0,8744 (0,5153)
CV (%)	10,53 (32,52)	28,40 (45,15)	61,72 (70,27)	21,21 (30,09)

CV: coeficiente de variação. CTLeu: contagem total de leucócitos. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. Discussão

No presente estudo, efeitos isolados da temperatura de incubação associada ou não à injeção de ácido ascórbico (37,5°C, 39°C, 39°C+AA) e da temperatura de criação (fria, quente e termoneutra) foram observados sobre algumas das variáveis analisadas, exceção feita ao pH do sangue, sobre o qual houve interação entre esses dois fatores.

A ocorrência e a intensidade do estresse calórico podem ser avaliadas pelo valor da temperatura retal, por essa atingir o equilíbrio mais lentamente do que muitos outros pontos internos do organismo da ave (MAY et al., 1987). Para restabelecer a normotermia, aves respondem ao estresse por calor, entre outras coisas, aumentando a perda de dissipação de calor pela pele e reduzindo a ingestão de energia e a produção de calor metabólico (MACARI et al., 2002). Incubação dos ovos à 39°C e à 39°C+AA não alterou a temperatura da superfície corporal e a retal dos frangos aos 41 dias de idade (presente estudo), mas aumentou as temperaturas retal e da superfície corporal dos pintos na eclosão (SGAVIOLI et al., 2013; Cap. 02), sugerindo que o aumento da temperatura corporal é um efeito temporário, possivelmente relacionado com o fato dos pintos precisarem ganhar calor do ambiente no período inicial pós-eclosão, ou que as aves estão conseguindo manter a normotermia. Adicionalmente, incubação à 39°C, associado ou não à AA, também não alterou o consumo de ração, e a conversão alimentar e, por consequência, o ganho de peso dos frangos. Isso demonstra que os frangos não reduziram a ingestão de energia e a produção de calor metabólico, reforçando o ponto de vista que os frangos estavam mantendo sua normotermia, sem reduzir ingestão de energia. Apesar disso, 39°C e 39°C+AA diminuíram a viabilidade criatória dos frangos aproximadamente de 97 para 94%, o que correspondeu à redução de 3%. Esse aumento na taxa de mortalidade dos frangos, contudo, pode ter sido acarretado por alterações de parâmetros sanguíneos apresentados pelos frangos. Incubação à 39°C aumentou os valores de HCT, HGB, BEecf, iCa e glicose no sangue. Aumento de HCT pode estar relacionado com aumento nos valores de RBC, MCV e/ou CTLeu (CAMPBELL, 1995), ou com redução no volume plasmático desidratação devido à diminuição de ingestão de água ou aumento na perda de líquido (MACARI et al., 2002). Como incubação à 39°C não alterou os valores de

RBC, MCV e CTLeu, o aumento de HCT parece ter sido resultante de aumento na perda de água, uma vez que, segundo Macari et al. (2002), aumento na excreção renal de água também é uma resposta fisiológica compensatória das aves ao calor. Aves estressadas pelo calor tentam restabelecer sua temperatura corporal interna aumentando, entre outras coisas, sua frequência respiratória (LINSLEY & BURGER, 1964; SALVADOR et al., 1999), o que resulta em redução da $p\text{vCO}_2$ e em aumento de pH. Para tentar regularizar o pH, as aves respondem à essa alcalose respiratória com queda na concentração de HCO_3^- aumentando a excreção renal de HCO_3^- e reduzindo a excreção de H^+ na tentativa de restabelecer seu equilíbrio ácido-base (MACARI et al., 2002; BORGES et al., 2003). É conhecido que valores negativos e menores que 3mEq/L para BEecf indicam perdas de bases devido a um distúrbio metabólico primário (acidose metabólica) ou a uma resposta compensatória com excreção renal de HCO_3^- para compensar a diminuição da $p\text{vCO}_2$ de uma alcalose respiratória e restabelecer o pH (MACARI et al., 2002). Assim, o aumento no valor de BEecf, mas ainda negativo, observado no presente estudo, indica que os frangos de ovos incubados à 39°C estavam perdendo menos base que os frangos de ovos incubados à 37,5°C. Como mostrado pelos dados, essa menor perda de bases envolveu aumento nos valores sanguíneos de HGB e aumento marginal de HCO_3^- se consideramos $p < 0,09$, os quais funcionam como bases, contribuindo para o sistema tampão. Embora o aumento de HGB represente à priori aumento no potencial de trocas gasosas, o aumento de HCT pode ter acarretado aumento de viscosidade sanguínea e, conseqüentemente, sobrecarga do sistema cardiorespiratório já precário para sustentar o rápido crescimento dos frangos, gerando uma maior demanda energética que resultou no aumento da concentração de glicose no sangue das aves viventes e, possivelmente, a morte de alguns frangos. Aves submetidas à estresse por calor entram em alcalose respiratória e, em seguida, em acidose metabólica como resposta compensatória à queda na $p\text{CO}_2$ (BORGES et al., 2003), o que gera uma reabsorção mineral óssea e excreção do cálcio pelos rins (BUSHINSKY, 1994). Dessa forma, o aumento de iCa no sangue provocado pela incubação dos ovos à 39°C pode ter sido resultante de reabsorção óssea ou menor mineralização óssea. Associação de AA à alta temperatura de incubação (39°C+AA) manteve os valores de HCT, HGB e BEecf em patamares intermediários entre os

registrados para frangos de ovos incubados à 37,5°C e 39°C. Contudo, uma vez que os valores de BEecf continuaram negativos, a associação de AA com alta temperatura de incubação diminuiu menos a perda de bases. Por outro lado, a associação dos dois fatores não evitou o aumento nas concentrações de iCa e glicose no sangue causado pela alta temperatura de incubação.

No que se refere às temperaturas de criação, o presente estudo registrou aumento de 1,53°C na temperatura retal e de 6,3°C na temperatura da superfície corporal com o aumento da temperatura de criação, bem como redução no consumo de ração e, conseqüentemente, no ganho de peso. A manutenção da temperatura corporal das aves sob situação de calor envolve mecanismos de aumento de perda de calor e redução da produção metabólica de calor (FURLAN & MACARI, 2002), entre eles, a elevação da temperatura da superfície corporal resultante do aumento do fluxo sanguíneo para a superfície da ave para facilitar a dissipação de calor (YAHAV et al., 1997). Assim, nossos dados indicam aumento do grau de estresse com o aumento na temperatura de criação (fria, termoneutra e quente) e que os frangos estavam tentando restabelecer a normotermia aumentando a perda de calor por condução através da pele e reduzindo a ingestão de energia e a produção de calor metabólico. Incremento maior na temperatura da superfície corporal (6°C) do que na temperatura retal (3°C) com o aumento da temperatura ambiente também foi verificado por Zhou & Yamamoto (1997) em frangos submetidos ao estresse calórico (36°C/3horas). Nossos dados, juntamente com os dados desses autores, indicam que dissipação de calor através da pele envolve elevação de 2°C na temperatura da superfície corporal à cada 1°C de elevação na temperatura retal.

Neste trabalho, o aumento da temperatura de criação não alterou os valores eritrocitários e as concentrações de Na⁺, K⁺ e iCa no sangue, mas acarretou alterações em sua gasometria. A pvCO₂ e a pvO₂ tornaram se maiores com o aumento da temperatura. Os valores de BEecf, embora similares, mantiveram-se negativos. O pH diminuiu com o aumento da temperatura de criação, mas apenas nos frangos de ovos incubados à 39°C e injetados com AA. O aumento da pvO₂ com o aumento da temperatura de criação deve ser resultante do aumento da taxa respiratória, haja vista que, como já mencionado, está é uma das respostas fisiológicas elicitadas pelas aves estressadas pelo calor para restabelecer sua

temperatura corporal interna (LINSLEY & BURGER, 1964; SALVADOR et al., 1999). Simultaneamente ao aumento da $p\text{vO}_2$, todavia, era esperado que também ocorresse redução na $p\text{vCO}_2$, em decorrência da hiperventilação pulmonar, mas isso não foi observado em nossos dados; e, em vez disso, houve aumento simultâneo de $p\text{vO}_2$ e $p\text{vCO}_2$ no sangue. Aumento na $p\text{vCO}_2$ gera queda de pH, mas isso só foi registrado para aves de ovos incubados à 39°C e injetados com AA. Contrariamente ao esperado fisiologicamente, não foram observados aumento de HCO_3^- e redução na perda de bases em resposta ao aumento de $p\text{vCO}_2$ causado pelo aumento da temperatura de criação, e os frangos continuassem a apresentar perda de bases (BEecf negativo). Dessa forma, esses dados indicam ocorrência de alcalose metabólica compensada nas aves de ovos incubados à 37,5°C e à 39°C e de acidose respiratória crônica nas aves de ovos incubados à 39°C +AA com o aumento da temperatura de criação, as quais devem ter sido a causa do aumento de 13% na mortalidade das aves criadas sob estresse por calor.

Estresse pode deprimir ou estimular o sistema de defesa imune, alterando quantitativamente a presença das células no sangue (BORGES et al., 2003). O sistema de defesa celular das aves é constituído de monócitos, heterofilos, basófilos, eosinófilos, trombócitos e linfócitos (MORGULIS, 2002), sendo que os cinco primeiros agem na defesa imune inata (primeira linha de defesa das aves contra muitos patógenos e importante no controle de infecções comuns) e o último na defesa imune adquirida. Para frangos de corte, a heterofilia tem sido considerada resposta ao estresse por calor (MAXWELL et al., 1992), e a relação H/L um índice indicativo do nível de estresse das aves (GROSS & SIEGEL, 1983). No presente trabalho, frangos de ovos incubados à 39°C, independentemente de terem sido injetados ou não com AA, apresentaram heterofilia, indicando efeito estressor da alta temperatura de incubação ainda aos 41 dias de vida. Tais aves, todavia, não apresentaram alteração no valor de H/L, o que pode ter sido resultante da ocorrência simultânea de linfocitose, pelo menos para os pintos de ovos injetados com AA. Vitamina C tem sido associada à ação imunoestimuladora (TEIXEIRA, 2010), o que foi observado nos pintos de ovos injetados com AA, que apresentaram leucocitose (equivalente a aumento de 50% em relação à 37,5°C) resultante de linfocitose e heterofilia (48% e 55% em relação à 37,5°C, respectivamente). Adicionalmente,

injeção de AA *in ovo* também acarretou monocitopenia. Tais dados mostram efeito estimulador e modulador do AA injetado sobre o sistema imune celular dos frangos, o que é um dado importante e ao mesmo tempo instigante, uma vez que indica a possibilidade do uso clínico do AA com imunoprevenção. No que se refere aos efeitos da temperatura de criação, o presente estudo mostra que o sistema imune celular das aves é especialmente sensível ao calor. Frangos criados sob temperatura quente apresentaram linfocitose (aumento de 44%), resultante de linfocitose, eosinofilia e heterofilia (equivalentes a aumento de 42%, 67% e 65%, respectivamente), enquanto que os frangos criados sob temperatura fria não tiveram alteração no número de linfócitos. Como já mencionado anteriormente, heterofilia e basofilia têm sido considerados indicadores de estresse (MAXWELL et al., 1992). Embora basofilia tenha sido detectado como resposta ao estresse causado pelo frio e calor intensos (MAXWELL et al., 1992; MITCHELL et al., 1996), neste estudo ela ocorreu apenas em frangos criados sob temperatura fria. Nossos dados mostram heterofilia nos frangos de todos os tratamentos que envolveram exposição ao calor (na incubação e na criação), o que reforça ser a contagem de heterofilos como bom indicador de estresse por calor em frangos.

5. Conclusões

Os resultados deste estudo mostram efeito estimulador do ácido ascórbico e da hipertermia sobre o sistema imunológico celular dos frangos, na incubação e na criação, respectivamente. A temperatura alta de incubação associada ou não ao AA não evitou a queda no desempenho das aves criadas sob alta temperatura.

6. Referências bibliográficas

- Borges, S. A., A. V. Fischer da Silva, J. Ariki, D. M. Hooge, and K. R. Cummings. 2003. Dietary electrolyte balance for broiler chickens exposed to thermoneutral or heat-stress environments. *Poult. Sci.* 82:428–435.
- Brake, J. T. 1989. *Zootech. Int.* January 37–40.

- Briggs, G. M., T. D. Luckey, C. A. Elvenjem, and E. B. Hart. 1994. Effect of ascorbic acid on chick growth, when added to purified rations. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 55:111-115.
- Bushinsky, D. A. 1994. Acidosis and bone. *Miner. Electrolyte Metabolism.* 20:40-52.
- Campbell, T. W. 1994. Hematology. Pages 177-198 in *Avian Medicine: Principles and Application.* Ritchie, B. W., G. J. Harrison, and L. R. Harrison. ed. Fort Worth-FL: Wingers Publishing.
- Campo, J. L., and S. G. Dávila. 2002. Changes in heterophils to lymphocyte ratios of heat-stressed chickens in response to dietary supplementation of several related stress agents. *Europ. Poult. Sci.* 66:80-84.
- Coles, E. H. 1986. *Veterinary Clinical Pathology.* 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Cunningham, J. G. 1999. *Tratado de fisiologia veterinária.* ed. Guanabara.
- Furlan, R. L., and Macari, M. 2002. Termorregulação. Pages 209-230 in *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.* Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzales. 2th rev. ed. Jaboticabal: Funep.
- Ghonim, A. I. A., A. L. Awad, M. H. A. Fattouh, and A. M. El-Shhat. 2009. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. *Egypt Poult. Sci.* 29:1085-1099.
- Gross, W. B., and H. S. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophil/ lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis. Athens.* 27:972-979.
- Joseph, N. S., A. Lourens, and E. T. Moran Jr. 2006. The effects of suboptimal eggshell temperature during incubation on broiler chick quality, live performance, and further processing yield. *Poult. Sci.* 85:932-938.
- Kidd, M. T. 2004. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poult. Sci.* 83:650- 657.
- Linsley, J. G., and R. E. Burger. 1964. Respiratory and cardiovascular response in the hyperthermic domestic cock. *Poult. Sci.* 43:291-305.
- Macari, M., R. L. Furlan, and E. Gonzalez. 2002. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte.* ed. Funesp/Unesp.
- Mahmoud, K. Z, F. W. Edens, E. J. Eisen, and G. B. Havenstein. 2004. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers

- (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 137:35–42.
- Maxwell, M. H., G. W. Robertson, S. Spence, and C. C. McCorquodale. 1990. Comparison of hematological values in restricted and ad libitum-fed domestic fowls: white thrombocytes. *Braz. J. Poult. Sci.* 31:399-405.
- Miller, L., and M. A. Qureshi. 1991. Introduction of heat shock proteins and phagocytic function of chicken macrophage following in vitro heat exposure. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:34-42.
- Mitchell, M. A., and A. J. Carlisle. 1992. The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiol.* 101:137–142.
- Morgulis, M. S. *Imunologia aplicada*. 2002. Pages 231-245 in *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Macari, M., R. L. Furlan, and E; Gonzales. Ed. Jaboticabal:Funep/Unesp.
- Mushtaq, T., M. Sarwar, H. Nawaz, M. A. Mirza, and T. Ahmad. 2005. Effect and interactions of dietary sodium and chloride on broiler starter performance (hatching to twenty-eight days of age) under subtropical summer conditions. *Poult. Sci.* 84:1716-1722.
- Pardue, S. L., and J. P. Thaxton. 1984. Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. *Poult. Sci.* 63:1262-1268.
- Pardue, S. L., J. P. Thaxton, J. P., and J. Brake. 1985. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *J. Appl. Physiol.* 58:1511-1516.
- Piestun, Y., O. Halevy, and S. Yahav. 2009. Thermal manipulations of broiler embryos – the effect on thermoregulation and development during embryogenesis. *Poult. Sci.* 88:2677–2688.
- Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000. Model of Physiological Stress in Chickens 1. Response Parameters. *Poult. Sci.* 79:363-369.
- Richards, S. A. 1971. The significance of changes in the temperature of the skin and body core of the chicken in the regulation of heat loss. *J. Physiol.* 216:1-10.
- Rondón, E. O. O., A. E. Murakami, A. C. Furlan, J. Garcia. 2000. Exigências nutricionais de sódio e cloro e estimativa do melhor balanço eletrolítico da ração

- para frangos de corte na fase pré-inicial (1-7 dias de idade). R. Bras. Zootec. 29:1162-1166.
- Rosales, A. G., P. Villegas, P. D. Lukert, O. J. Fletcher, M. A. Mohamed, and J. Brown. 1989. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal Virus. Avian Dis. 33:35-41.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG:Universidade Federal de Viçosa.
- Ruckebush, L. P., L. P. Phaneuf, R. F. Dunlop. 1994. Fisiologia de pequenas y grandes espécies, México: Manual Moderno.
- Salvador, D. J. Ariki, S. A. Borges, A. A. Pedroso, V. M. Barbosa Moraes. 1999. Suplementação de bicarbonato de sódio na ração e na água de bebida de frangos de corte submetidos ao estresse calórico. Ars Vet. 15:144–148.
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schmid, A. L. 1998. Refletindo sobre o calor. Avic. Ind. 88:18-23.
- Selim, S. A., K. M. Gaafar, and S. S. El-ballal. 2012. Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. Emir. J. Food Agric. 24: 264-271.
- Teixeira, V. H. 2010. Vitamina C e constipações: uma controvérsia em idade de reforma. Ver. M Ed. D esp. informa. 1:8.
- Thaxton, J. P., and H. S. Siegel. 1970. Immunodepression in young chickens by high environmental temperature. Poult. Sci. 49:202–205.
- Yahav, S., R. R. Sasson, and D. Shinder. 2004. The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. J. Therm. Biol. 29:245–250.
- Yahav, S., A. Straschnow, I. Plavnik, S. Hurwitz. 1997. Blood system response of chickens to changes in environmental temperature. Poult. Sci. 76:627-633.
- Yalçın, S., N. Bagdatlioglu, V. Bruggeman, E. Babacanoglu, I. Uysal, J. Buyse, E. Decuypere, and P. B. Siegel. 2008. Acclimation to heat during incubation. 2. Embryo composition and residual egg yolk sac fatty acid profiles in chicks. Poult. Sci. 87:1229–1236.

- Yalçin, S., S. Ozkan, M. Cabuk, J. Buyse, E. Decuypere, and P. B. Siegel. 2005. Pre- and post-natal conditioning induced thermotolerance on body weight, physiological responses, and relative asymmetry of broilers originating from young and old breeder flocks. *Poult. Sci.* 84:967–976.
- Zhou, W. T., S. Yamamoto. 1997. Effects of environmental temperature and heat production due to food intake on abdominal temperature, shank skin temperature and respiration rate of broilers. *Br. Poult. Sci.* 38:107-114.

CAPÍTULO 7 – INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E ALTA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGOS DE CORTE CRIADOS SOB ESTRESSE TÉRMICO

RESUMO – Estresse térmico na criação prejudica o crescimento e a mineralização óssea dos frangos, gerando problemas de perna, que acentuam os efeitos do calor sobre seu bem-estar e desempenho, e sua qualidade de carcaça. Estresse térmico na incubação tem sido avaliado como pré-determinante de adaptação da ave ao calor pós-eclosão. Devido a seu efeito como co-fator na formação e manutenção dos tecidos cartilaginoso, conjuntivo e ósseo, ácido ascórbico adicionado à dieta tem sido avaliado quanto a seu efeito anti-estressor. O presente estudo avaliou se alta temperatura de incubação, associada ou não à injeção de ácido ascórbico in ovo, interage com temperatura de criação para influenciar as características ósseas de frangos de corte. Aos 42 dias de idade, foram avaliados: peso, área, comprimento, largura, conteúdo mineral, densidade e resistência femoral e tibial, e o peso corporal das aves e consumo total de ração. Ovos férteis de matrizes de frango de corte (Cobb®) foram utilizados em delineamento inteiramente casualizado 3x3 (três tratamentos durante a incubação: incubados à 37,5°C; incubados à 39°C, injetados pré-incubação com 6% de AA/100µl de água e incubados à 39°C; três temperaturas de criação: fria, termoneutra e quente). O peso corporal e o consumo e ração não foram influenciados pelos tratamentos na incubação e foram menores sob criação à temperatura quente. Comparado à temperatura termoneutra, temperatura fria de criação não alterou nenhuma das variáveis ósseas analisadas, enquanto que temperatura quente de criação reduziu a largura, a área, o peso, o conteúdo e a densidade mineral, e a força máxima femoral e o comprimento, área, peso, conteúdo mineral e de cálcio e densidade da diáfise e força máxima tibiotarsal. Houve interação entre tratamentos na incubação e na criação, segundo a qual alta temperatura de incubação aumentou a densidade mineral da diáfise femoral de frangos criados sob termoneutralidade e, quando associada à injeção de ácido ascórbico in ovo, aumentou a densidade mineral da diáfise femoral e da epífise

proximal dos tibiotarsos dos frangos criados sob temperatura termoneutra, bem como a densidade da epífise distal dos frangos criados sob temperatura fria. Em conclusão, alta temperatura de incubação associada ou não ao ácido ascórbico melhorou a densidade mineral dos fêmures e das tíbias dos frangos criados sob temperatura termoneutra e fria, respectivamente, mas não evitou a redução no crescimento, mineralização e resistência desses ossos da perna causada pela temperatura quente de criação, a qual deve ter sido resultante do menor consumo de ração.

Palavras-chave: densidade mineral, minerais, resistência óssea, vitamina C

1. Introdução

As linhagens atuais de frangos de corte apresentam alto ganho de massa corporal em menor período de tempo pós-eclosão, sobrecarregando, contudo, o sistema locomotor, o qual ainda apresenta características ósseas de um frango jovem. Isso aumentou a incidência de anormalidades ósseas nos frangos, principalmente nos ossos da perna (MURAKAMI et al., 2000), afetando o bem-estar, o desempenho e a qualidade de suas carcaças, causando perdas em abatedouros e, conseqüentemente, prejuízos zootécnicos (SULLIVAN, 1994; TAKITA, 1998; KESTIN et al., 1999). Problemas locomotores se tornam mais frequentes ou mais intensos quando associados à criação dos frangos sob condições de temperatura não termoneutra. Trabalhos têm mostrado que o rápido crescimento foi acompanhado pelo aumento de anomalias no tecido esquelético das aves, principalmente em ossos longos (LEACH & LILBURN, 1993; SULLIVAN, 1994). Alta temperatura de criação reduz o comprimento, a largura e o peso dos ossos dos frangos (YALÇIN et al., 1996; BRUNO et al., 2000; PELICANO et al., 2005), bem como a mineralização do tibiotarso de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) (SAHIN et al., 2006).

Tais alterações nas características ósseas, contudo, parecem estar relacionadas com redução no crescimento ósseo resultante da diminuição no consumo de ração e piora na conversão alimentar (TEETER et al., 1984; GERAERT et al., 1996 a; FARIA FILHO, 2006; ABU-DIEYEH, 2006).

É conhecido que ácido ascórbico participa como co-fator em processos biológicos relacionados com formação e crescimento ósseo, como formação e manutenção de colágeno, de tecido conjuntivo e ósseo (LESSON & SUMMERS, 2001; SPINOSA et al., 2002), e que sua concentração no sangue aves é reduzida sob estresse por calor (THORTON, 1961). Isso tem levado vários pesquisadores a analisarem se adição de ácido ascórbico na dieta poderia ser utilizada como manejo para reduzir ou evitar efeitos do estresse por calor durante a criação de frangos. Frangos de corte suplementados com vitamina C, principalmente quando criados em estresse por calor, apresentaram melhora no desempenho (ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração) e no desenvolvimento ósseo, redução das concentrações de corticosteróides, benefício sobre a função imune das aves, além

de redução do efeito decorrente de altas temperaturas sobre os tecidos viscerais (PARDUE & THAXTON, 1984; PARDUE et al., 1985; LESSON & SUMMERS, 2001; VATHANA et al., 2002; SAHIN et al., 2003; MAHMOUD et al., 2004; LOHAKARE et al., 2005; VAZ, 2006).

Manipulação nutricional dos ovos e manipulação da temperatura de incubação vêm sendo analisados quanto a pré-determinarem melhorias morfofuncionais e adaptações epigenéticas, que resultem em maior sobrevivência e desempenho pós-eclosão dos frangos. Estudos prévios tem analisado os efeitos de altas temperaturas de incubação (LEKRISOMPONG et al., 2007; LOURENS et al., 2007; WINELAND et al., 2000; MOLENAAR et al., 2011) e da injeção de ácido ascórbico in ovo (ZAKARIA & AL-ANEZI, 1996; GHONIM et al., 2009; PIRES et al., 2011; MOHAMMED et al., 2012; NOWACZEWSKI et al., 2012; SGAVIOLI et al., 2013a, b) sobre o sucesso da incubação e/ou qualidade e desempenho dos pintos, com sucesso para a adaptação epigenética de frangos de ovos incubados em temperatura quente. Faltam dados na literatura dos efeitos do estresse térmico na incubação associado ao uso de aditivos nutricionais anti-estressores intra ovo, como o ácido ascórbico, sobre o desempenho e desenvolvimento ósseo de frangos de corte criados sob condições de temperatura não termoneutra.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar se alta temperatura de incubação associada ou não com injeção de ácido ascórbico in ovo interage com temperatura de criação (fria, normal e quente) para influenciar as características ósseas da perna de frangos criados. Para isso, pintos de ovos incubados à alta temperatura de incubação (39°C), injetados ou não com ácido ascórbico, foram criados sob temperatura abaixo (frio), acima (calor) da temperatura padrão da linhagem (controle) até 42 dias de idade, idade na qual, o peso corporal e o consumo total de ração dos frangos, e o tamanho, densidade e resistência de seus fêmures e tíbias foram analisados.

2. Material e métodos

O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo nº 7377/10), da Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com 3 tratamentos durante a incubação (ovos incubados à 37,5°C; ovos incubados à 39°C; e ovos incubados à 39°C e injetados com 6% de ácido ascórbico em 100µl de água antes da incubação) e 3 temperaturas de criação (fria, termoneutra e quente).

Para isso, três mil ovos férteis de frango de corte (Cobb®) (Globoaves, Itirapina, SP), provenientes de matrizes com 47 semanas de idade, foram pesados e distribuídos em cinco incubadoras/tratamento, cada uma com 200 ovos, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de 67±2g. As incubadoras (Premium Ecológica, IP200), com controle automático de temperatura, umidade e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas com 60% de umidade relativa até a transferência e com 70% nos dois últimos dias de incubação. A injeção da solução de ácido ascórbico (AA) nos ovos foi realizada antes do início da incubação. Os ovos foram posicionados de modo horizontal e, após a limpeza do local com etanol 100%, a casca dos ovos foi perfurada com agulha estéril [Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2”)] e solução de AA (Synth, 99% de pureza) injetada no albúmen a, aproximadamente, 6 mm abaixo da casca, próximo à extremidade mais fina do ovo (contrário à câmara de ar). Após a injeção, o orifício foi fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. A solução de AA foi preparada pouco antes da injeção, usando água Mili-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido sua foto sensibilidade e mantido em frasco escuro durante utilização.

Para a fase de criação, após a eclosão, 540 pintos de um dia de idade (Cobb®), machos e fêmeas, foram distribuídos em três câmaras climáticas, com 15 parcelas/câmara, 12 aves por parcela, resultando em 5 repetições por tratamento. Os pintos foram criados do 1º ao 42º dia de idade. As temperaturas de criação foram mantidas por meio de manejo de campânulas, monoblocos e exaustores, e apresentaram os valores contidos na Tabela 1. Os pintos foram vacinados contra doença de Marek e Bouda Aviária, e durante a criação contra Gumboro e Newcastle, de acordo, com o programa de vacinação do Laboratório de Ciências Avícolas. Durante todo o período experimental, as aves receberam água e ração à vontade.

As rações foram à base de milho e farelo de soja (Tabela 2), reajustadas para as fases de criação (1 a 21 dias), e final (22 a 42 dias de idade) atendendo as recomendações de Rostagno et al. (2011).

Tabela 01 – Temperatura ambiente preconizada durante todo o período de criação.

Semanas	Temperatura ambiente (°C)		
	Fria	Termoneutra	Quente
1 ^o	32±4	32±5	32±5
2 ^o	30±4	31±5	32±7
3 ^o	26±4	29±4	32±7
4 ^o	22±5	27±3	32±5
5 ^o	18±2	25±2	32±7
6 ^o	14±4	23±2	32±7

Tabela 02 – Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento
Milho	60,83	63,74
Farelo de soja 45%	35,15	29,79
Óleo soja	-	3,12
Fosfato bicálcico	1,63	1,16
Calcário	0,84	0,76
Sal	0,42	0,44
L-Lisina HCL (78%)	0,25	0,21
DL-Metionina (99%)	0,29	0,23
L-Treonina	0,08	0,04
BHT	0,01	0,01
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50	0,50
TOTAL	100,00	100,00
	Composição nutricional calculada	
Proteína bruta (%)	21,27	18,86
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.883	3.121
Ca (%)	0,85	0,69
Na (%)	0,19	0,20
Fósforo disponível (%)	0,42	0,32
Metionina + cistina dig. (%)	0,88	0,77
Metionina dig. (%)	0,56	0,49
Lisina dig. (%)	1,22	1,05
Treonina dig. (%)	0,79	0,68
Triptofano dig. (%)	0,24	0,21
Arginina dig. (%)	1,32	1,16

* Nutrientes por quilograma de ração: fase de 1 a 21 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,4 g, Promotor de crescimento (bacitracina de zinco) 30 mg, (narsina+nicarbazina) 0,1g, Metionina 1,68g; Fase de 21 a 42 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,6 g, Promotor de crescimento (avilamicina) 7,5 mg, (monensina sódica) 0,1g, Metionina 1,4g.

Ganho de peso e consumo de ração

Foram analisados o ganho de peso e o consumo de ração para o período total de criação (1-42 dias de idade).

Comprimento, largura e peso dos ossos

Aos 42 dias de idade, 5 aves/tratamento foram insensibilizadas com CO₂ e abatidas por sangria mediante corte da veia jugular, para coleta dos fêmures e tíbiotarsos. Após retirada dos tecidos aderidos, os fêmures e os tíbiotarsos

esquerdos foram pesados em balança digital (precisão 0,001) e seus comprimentos e diâmetro da porção média da diáfise avaliados com o auxílio de um paquímetro digital. A massa dos ossos foi expressa em g e os comprimentos e larguras em mm.

Composição, área e densidade mineral óssea

Os fêmures e os tibiotarsos esquerdos, desprovidos de tecidos aderidos, foram analisados quanto à área total (cm²), conteúdo mineral ósseo total (CMOt, g) e densidade mineral óssea total (DMOt, g/cm²), DMO nas regiões proximal, distal e diáfise. As análises foram realizadas por densitometria, utilizando-se densitômetro de emissão dupla de raios-X (DXA) acoplado á computador, previamente calibrado conforme fabricante (modelo DPX-Alpha, Lunar[®]), com software especial para pequenos animais (pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FOA/UNESP). Durante o procedimento, os ossos foram mantidos no interior de um recipiente de acrílico contendo água deionizada.

Resistência óssea

Após as análises densitométricas, fêmures e os tibiotarsos esquerdos foram utilizados para a realização das análises de resistência óssea, por ensaios mecânicos (flexão em três pontos e compressão axial) em máquina universal EMIC[®], modelo DL 3000 (pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da FOA/UNESP-Araçatuba). Os ossos foram apoiados em dois suportes (dois pontos), sendo a distância de vão de apoio ajustada conforme o tamanho do menor osso. A força foi aplicada no osso em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (terço médio do osso). O ensaio foi destrutivo e registrou a força máxima admitida. A carga de 2000N foi aplicada à velocidade de 5mm/min para determinação da força máxima admitida (Fmax) pelo osso, deformação na Fmax e rigidez óssea. Estas variáveis expressam a resistência óssea na cabeça do osso e no terço médio. Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento, que fornece os valores de Força x Deformação. Para o cálculo da rigidez determinou-se a parte da curva de Força Máxima (N) x Deformação (mm) relativa à fase elástica do corpo (parte reta da curva). Estes dados foram levados à planilha Excel, e, determinada a equação linear (1° grau, $y = a.x+b$)

que melhor ajustava aos pontos. Nesta equação, a inclinação da curva foi dada pela constante a , que multiplicando a variável x expressa a rigidez do osso (inclinação da curva na fase elástica).

Conteúdo Mineral

Os fêmures e os tibiotarsos direitos foram utilizados nas análises de cálcio, fósforo, e cinzas. As análises dos minerais das amostras dos diferentes tratamentos foram realizadas no laboratório de Nutrição Animal, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal/SP, de acordo com as metodologias descritas por Silva & Queiroz (2002), sendo expressos em % em relação à matéria seca desengordurada.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS® (SAS Institute, 2002). Em caso de efeito significativo ($p \leq 0,05$), a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey.

3. Resultados

Ganho de peso e consumo de ração

O ganho de peso das aves aos 42 dias de idade não foi influenciado ($p > 0,05$) pelos tratamentos na incubação e atingiu média de 2.259g. Todavia, houve efeito ($p \leq 0,05$) das temperaturas de criação (Fig. 1A), sendo o ganho de peso menor nas aves criadas sob temperatura quente do que sob temperatura termoneutra ou fria, sob as quais não ocorreu diferença no peso das aves. O consumo de ração não foi influenciado pelos tratamentos na incubação e atingiu cerca de 3.798g; porém, ocorreu efeito da temperatura de criação, mostrando sua diminuição com o aumento da temperatura de criação (Fig. 1B).

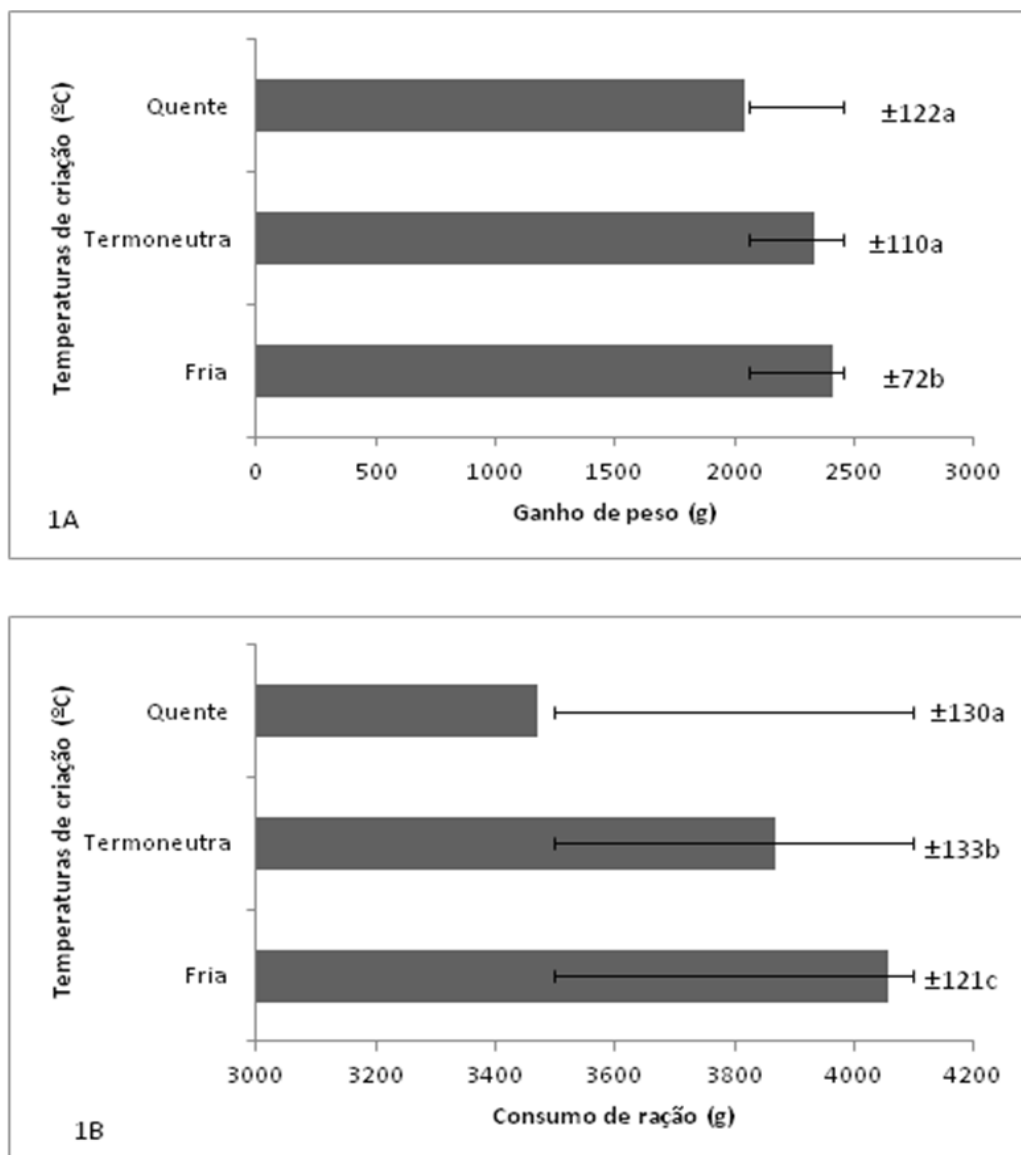


Figura 1 – Ganho de peso dos frangos aos 42 dias de idade (A) e consumo de ração de 1-42 dias de idade (B), de acordo com a temperatura de criação. a-c: médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Composição, área e densidade mineral óssea

De acordo com a Tabela 3, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) dos tratamentos na incubação e na criação e nem interação entre esses fatores sobre o comprimento dos fêmures, mas ocorreu efeito significativo da temperatura de criação ($P \leq 0,05$) sobre a largura e o peso desses ossos, os quais foram menores nos frangos criados sob temperatura quente do que nos frangos criados sob temperatura

termoneutra. Para os tibiotarsos, não houve efeito principal e nem interação significativa entre os tratamentos da incubação e na criação ($P>0,05$) sobre a largura desses ossos. Seus comprimentos e pesos, todavia, foram influenciados pela temperatura de criação, e foram menores nos frangos criados sob temperatura quente do que sob temperatura fria.

Composição, área e densidade mineral óssea

A composição mineral, a área e a densidade femoral foram afetadas significativamente ($p\leq 0,05$) apenas pela temperatura de criação (Tab. 4). A composição e a densidade mineral foram menores nos frangos criados sob temperatura quente do que nos criados sob temperatura fria. A área femoral foi menor nos frangos criados sob temperatura quente do que nos frangos criados nas outras duas temperaturas, que não diferiram nessa variável. Não ocorreu efeito significativo dos tratamentos na incubação e na criação sobre densidade mineral das epífises femorais, mas houve interação significativa ($P<0,05$) entre esses fatores para densidade mineral da diáfise. Como mostrado na Tabela 5, temperatura de criação influenciou significativamente ($p\leq 0,05$) a densidade mineral da diáfise dos frangos de ovos incubados à 39°C sem e com injeção de AA. Nos primeiros, a densidade foi menor nos frangos criados sob temperatura quente do que nos criados sob temperatura fria e termoneutra, que não diferiram nessa variável. Nos últimos, a densidade da diáfise foi similar sob criação à temperatura fria e quente, porém menor em relação à temperatura termoneutra. Apenas a densidade das diáfises femorais dos frangos criados sob temperatura termoneutra foi influenciada pela incubação dos ovos sob alta temperatura. A densidade das diáfises dos frangos de ovos incubados à 39°C sem e com AA foram similares entre si e maiores do que a dos frangos de ovos incubados sob 37,5°C.

Com relação aos tibiotarsos (Tab. 6), a composição mineral, a área e a densidade da diáfise foram influenciadas significativamente ($p\leq 0,05$) apenas pela temperatura de criação, e foram menores nos frangos criados em temperatura quente do que à temperatura termoneutra, não havendo diferença nessas variáveis entre esses frangos e os frangos criados sob temperatura fria. A densidade mineral total dos tibiotarsos não foi afetada pelos tratamentos na incubação e na criação e

nem houve interação significativa entre esses fatores para essa variável. Ocorreu interação significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos na incubação e criação para a densidade mineral de ambas as epífises. De acordo com a Tabela 8, não houve diferença na densidade da epífise proximal entre os frangos criados à temperatura fria e quente, e estes apresentaram densidade menor do que os frangos criados à temperatura termoneutra. Além disso, sob criação à temperatura termoneutra, frangos de ovos incubados à 39° e injetados com AA tiveram densidade da epífise proximal maior do que os frangos de ovos incubados à 39°C e à 37,5°C, e estes não diferiram entre si nessa variável. A densidade das epífises distais dos frangos criados sob temperatura termoneutra e quente foi similar, porém maior que nos frangos criados sob temperatura fria. Adicionalmente, a densidade da epífise distal foi maior em frangos de ovos incubados à 39°C e incubados à 39°C do que nos frangos de ovos incubados à 39°C sem injeção de AA e à 37,5°C, entre os quais não foi observada diferença nessa variável.

Tabela 03. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre o comprimento, largura e peso do fêmur e do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Fêmur			Tibiotarso		
	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Peso (g)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Peso (g)
Tratamentos (T)						
37,5°C	68,53±3,46	7,40±0,91	6,82±0,94	91,73±4,59	5,87±0,83	9,15±1,27
39°C	67,13±2,77	7,20±0,68	6,81±1,21	92,29±4,94	6,00±0,68	8,70±1,74
39°C-AA	69,47±2,42	7,80±0,68	6,90±1,03	94,14±3,61	6,14±0,86	9,62±1,61
Temperaturas (TP)						
Fria	68,67±3,15	7,60±0,83ab	7,16±0,97a	92,07±4,77ab	6,20±0,94	9,58±1,42a
Termoneutra	69,00±2,39	7,73±0,70a	7,39±0,79a	94,86±4,26a	6,14±0,66	10,02±1,11a
Quente	67,47±3,38	7,07±0,70b	5,99±0,76b	91,21±3,62b	5,64±0,63	7,81±1,21b
Probabilidade						
T	0,0915	0,0946	0,9637	0,2076	0,6456	0,2215
TP	0,3112	0,0459	0,0002	0,0424	0,1527	<0,0001
T x TP	0,2418	0,8760	0,7029	0,2218	0,9564	0,2220
CV (%)	4,16	9,98	12,96	4,42	13,50	13,17

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 04. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a composição mineral, área, densidade mineral total e da epífise proximal, diáfise e epífise distal do fêmur de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Composição mineral (g)	Área (cm ²)	Densidade mineral total	Epífise proximal**	Diáfise**	Epífise distal ^{1**}
	(g/cm ²)					
Tratamentos (T)						
37,5°C	0,121±0,11	6,17±0,62	0,019±0,02	0,044±0,03	0,007±0,01	0,005 (0,409) ±0,01
39°C	0,175±0,13	6,06±0,64	0,028±0,02	0,052±0,03	0,028±0,03	0,003 (0,408) ±0,00
39°C-AA	0,202±0,18	6,38±0,51	0,030±0,02	0,048±0,03	0,032±0,03	0,000 (0,406) ±0,00
Temperaturas (TP)						
Fria	0,164±0,11ab	6,37±0,51a	0,025±0,02ab	0,041±0,02	0,021±0,02	0,005 (0,409) ±0,01
Termoneutra	0,251±0,17a	6,48±0,55a	0,038±0,02a	0,059±0,03	0,040±0,03	0,003 (0,407) ±0,00
Quente	0,082±0,08b	5,77±0,49b	0,014±0,01b	0,043±0,03	0,006±0,01	0,002 (0,407) ±0,00
Probabilidade						
T	0,1661	0,2535	0,1581	0,7396	0,0008	0,1118
TP	0,0013	0,0015	0,0016	0,1739	<0,0001	0,3905
T x TP	0,0635	0,8386	0,0841	0,3945	0,0048	0,4214
CV (%)	69,83	8,50	65,48	59,03	73,03	1,08

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). ** considerando uma área de 0,231 cm².

Tabela 05 - Desdobramento das interações entre os tratamentos na incubação e as temperaturas na criação para a densidade mineral da diáfise (g/cm^2) do fêmur de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Tratamentos	Temperaturas de Criação ($^{\circ}\text{C}$)			P
	Fria	Termoneutra	Quente	
37,5 $^{\circ}\text{C}$	0,011 \pm 0,01	0,008 \pm 0,01b	0,002 \pm 0,01	0,7435
39 $^{\circ}\text{C}$	0,033 \pm 0,03A	0,048 \pm 0,03Aa	0,004 \pm 0,01B	0,0007
39 $^{\circ}\text{C}$ -AA	0,016 \pm 0,00B	0,065 \pm 0,02Aa	0,011 \pm 0,01B	<0,0001
P	0,1135	<0,0001	0,6856	

a-b; A-B: médias seguidas por letras distintas nas colunas e nas linhas, respectivamente, diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 06. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a composição mineral, área, densidade mineral total e da epífise proximal, diáfise e epífise distal do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Composição mineral (g)	Área (cm ²)	Densidade mineral	Epífise proximal**	Diáfise**	Epífise distal ¹ **
			(g/cm ²)			
Tratamentos (T)						
37,5°C	0,218±0,18	8,92±0,84	0,024±0,02	0,021±0,02	0,042±0,03	0,011 (0,413) ±0,01
39°C	0,243±0,13	8,89±0,86	0,027±0,01	0,019±0,02	0,042±0,03	0,004 (0,408) ±0,01
39°C-AA	0,267±0,20	9,50±1,00	0,027±0,02	0,037±0,04	0,053±0,04	0,011 (0,413) ±0,02
Temperaturas (TP)						
Fria	0,269±0,16ab	9,23±0,94ab	0,029±0,02	0,019±0,02	0,053±0,03ab	0,010 (0,412) ±0,02
Termoneutra	0,303±0,16a	9,45±0,87a	0,031±0,02	0,041±0,04	0,057±0,03a	0,003 (0,407) ±0,00
Quente	0,152±0,15b	8,58±0,77b	0,17±0,02	0,016±0,02	0,027±0,03b	0,012 (0,413) ±0,01
Probabilidade						
T	0,6232	0,0765	0,7532	0,0016	0,4754	0,5967
TP	0,0396	0,0161	0,0764	0,0001	0,0286	0,3498
T x TP	0,4736	0,5961	0,5779	0,0002	0,4629	0,0297
CV (%)	65,81	9,26	63,67	77,61	68,10	2,70

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses). ** considerando uma área de 0,231 cm².

Tabela 07 - Desdobramento das interações entre os tratamentos na incubação e as temperaturas na criação para a densidade mineral da epífise proximal e epífise distal (g/cm^2) do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Variáveis	Tratamentos	Temperaturas de Criação ($^{\circ}\text{C}$)			P
		Fria	Termoneutra	Quente	
Epífise proximal (g/cm^2)	37,5 $^{\circ}\text{C}$	0,026 \pm 0,03	0,019 \pm 0,02b	0,017 \pm 0,02	0,7668
	39 $^{\circ}\text{C}$	0,014 \pm 0,01	0,028 \pm 0,02b	0,013 \pm 0,01	0,4291
	39 $^{\circ}\text{C}$ +AA	0,018 \pm 0,02B	0,102 \pm 0,03Aa	0,017 \pm 0,02B	<0,0001
	P	0,6275	<0,0001	0,9387	
Epífise distal ¹ (g/cm^2)	37,5 $^{\circ}\text{C}$	0,000 (0,405) \pm 0,00b	0,008 (0,411) \pm 0,00	0,024 (0,421) \pm 0,02	0,0974
	39 $^{\circ}\text{C}$	0,002 (0,407) \pm 0,00b	0,000 (0,405) \pm 0,00	0,012 (0,413) \pm 0,01	0,5579
	39 $^{\circ}\text{C}$ +AA	0,028 (0,424) \pm 0,03Aa	0,001 (0,406) \pm 0,00B	0,001 (0,406) \pm 0,00B	0,0264
	P	0,0223	0,7523	0,1323	

a-b; A-B: médias seguidas por letras distintas nas colunas e nas linhas, respectivamente, diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹ comparação a partir de dados transformados por log (valores entre parênteses).

Conteúdo Mineral

No que se refere, aos conteúdos de minerais nos ossos (Tab. 8), não foram registrados efeitos significativos ($p>0,05$) dos tratamentos na incubação e na criação e interação entre eles para os minerais dos fêmures. O conteúdo de minerais dos tibiotarsos, contudo, foram influenciados significativamente pela temperatura de criação. O conteúdo de cinzas e o de cálcio foram menores nos frangos criados sob temperatura quente do que sob as outras duas temperaturas, entre as quais não ocorreu diferença significativa nessas variáveis. O conteúdo de fósforo foi menor nos frangos criados sob temperatura quente do que sob temperatura fria, e não houve diferença no valor dessa variável entre esses frangos e os criados sob temperatura termoneutra.

Resistência Óssea

Os dados da Tabela 9 mostram os dados referentes aos fêmures. A força máxima foi influenciada significativamente ($p\leq 0,05$) apenas pela temperatura de criação, a deformação na força máxima apenas ($p\leq 0,05$) pelos tratamentos na incubação e a rigidez não foi afetada pelos tratamentos na incubação e na criação. A força máxima foi menor nos frangos criados sob temperatura quente do que nos frangos criados sob temperatura termoneutra e fria, entre os quais não houve diferença nos valores dessa variável. A deformação óssea na força máxima foi menor nos frangos criados á temperatura quente do que à temperatura termoneutra, e não houve diferença nos valores dessa variável entre esses frangos e os criados sob temperatura fria.

No que se refere aos tibiotarsos (Tab. 10), não houve efeito dos tratamentos na incubação e criação sobre a deformação óssea na força máxima e a rigidez, mas ocorreu efeito significativo da temperatura de criação sobre a força máxima, e essa foi menor sob criação á temperatura quente do que à temperatura termoneutra e fria, que apresentaram valores de força máxima similares entre si.

Tabela 08. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a porcentagem de cálcio, fósforo e cinzas dos fêmur e do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Fêmur			Tibiotarso		
	Cálcio	Fósforo	Cinzas	Cálcio	Fósforo	Cinzas
	(%) com base na MS desengordurada					
Tratamentos (T)						
37,5°C	14,91±1,20	7,37±0,61	40,51±3,43	15,13±0,94	7,49±0,45	41,93±2,61
39°C	15,18±1,37	7,65±0,76	41,11±2,58	15,33±0,76	7,61±0,53	42,78±2,98
39°C-AA	15,09±1,15	7,66±0,52	41,90±3,36	14,88±0,99	7,53±0,57	42,46±3,28
Temperaturas (TP)						
Fria	15,02±1,30	7,59±0,66	41,66±3,20	15,57±0,98a	7,73±0,52a	43,53±2,72a
Termoneutra	15,42±1,08	7,72±0,53	41,96±3,75	15,28±0,73a	7,62±0,43ab	43,16±2,26a
Quente	14,73±1,25	7,37±0,69	39,94±2,67	14,45±0,58b	7,24±0,46b	40,38±2,84b
Probabilidade						
T	0,8312	0,3858	0,5040	0,1848	0,7775	0,5984
TP	0,3214	0,3205	0,1931	0,0018	0,0241	0,0073
T x TP	0,4525	0,5225	0,6141	0,6001	0,2002	0,4521
CV (%)	8,24	8,42	7,81	5,15	6,18	6,27

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 09. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a resistência do fêmur de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Fêmur		
	Força máxima (N)	Deformação na força máxima (mm)	Rigidez (Nmm)
Tratamentos (T)			
37,5°C	141,85±27,70	2,57±0,40ab	84,99±28,11
39°C	158,28±38,84	2,95±0,65a	80,50±29,14
39°C-AA	156,38±37,35	2,42±0,78b	82,14±27,80
Temperaturas (TP)			
Fria	156,97±29,56a	2,87±0,71	81,40±30,17
Termoneutra	170,33±38,13a	2,58±0,78	91,71±26,38
Quente	129,21±23,94b	2,49±0,39	74,52±25,64
Probabilidade			
T	0,2700	0,0432	0,9008
TP	0,0020	0,1842	0,2333
T x TP	0,1726	0,0652	0,1854
CV (%)	19,64	21,71	32,97

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10. Efeitos dos tratamentos na incubação e das temperaturas na criação sobre a resistência do tibiotarso de frangos de corte aos 42 dias de idade.

	Força máxima (N)	Deformação na força máxima (mm)	Rigidez (Nmm)
Tratamentos (T)			
37,5°C	198,79±59,37	2,33±0,28	113,42±55,48
39°C	177,19±47,28	2,38±0,30	104,30±31,53
39°C-AA	177,20±61,29	2,52±0,29	96,99±26,37
Temperaturas (TP)			
Fria	201,42±47,65a	2,44±0,28	119,48±39,59
Termoneutra	207,01±50,07a	2,50±0,20	109,23±45,93
Quente	144,56±50,92b	2,27±0,35	88,57±28,47
Probabilidade			
T	0,3290	0,1371	0,5473
TP	0,0011	0,0711	0,0925
T x TP	0,0546	0,7397	0,1698
CV (%)	24,81	11,68	35,52

CV: coeficiente de variação. a-b: médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. Discussão

Com relação aos efeitos dos tratamentos realizados durante a incubação, os dados do presente estudo mostram que a deformação na força máxima foi menor para frangos de ovos incubados em temperatura quente e injetados com ácido ascórbico, independente da temperatura de criação. Esse é um dado interessante, uma vez que evidencia pela primeira vez na literatura que temperatura de incubação dos ovos e injeção de ácido ascórbico pode influenciar a flexibilidade óssea frente à uma força exercida sobre a diáfise, sendo que, no presente caso, alta temperatura de incubação e injeção de ácido ascórbico aumentou sua flexibilidade. Flexibilidade óssea é dada pelos componentes orgânicos dos ossos (PAUWELS, 1980), o que sugere que temperatura de incubação pode ter alterado as percentagens de tais componentes nos ossos dos frangos. Adicionalmente, os resultados mostram que a densidade mineral da diáfise, epífise proximal e distal foram maiores para as aves de ovos injetados com ácido ascórbico e incubados em alta temperatura e criadas em temperatura termoneutra e fria. Esses dados também são importantes, pois revelam que alta temperatura de incubação associada com injeção pré-incubação de vitamina C melhora a densidade mineral dos ossos longos da perna. De acordo com os dados do Capítulo 6, frangos de ovos incubados à alta temperatura injetados ou

não com vitamina C apresentaram maior concentração de iCa no sangue, o que pode estar relacionado com a maior densidade mineral registrada para os frangos independentemente da temperatura de criação. Todavia, nenhum efeito moderador da alta temperatura de incubação associada ou não com vitamina C sobre os efeitos do estresse por calor foi observado.

A temperatura quente de criação diminuiu o peso corporal dos frangos, bem como reduziu o peso, a área e a densidade mineral do fêmur e do tibiotarso, bem como a largura e a composição mineral óssea do fêmur e o comprimento e a densidade mineral da diáfise e a porcentagem de cálcio, fósforo e cinzas do tibiotarso, o que caracteriza redução no crescimento corporal das aves e de ambos os ossos. Esse menor crescimento das aves e dos ossos longos das pernas deve ter sido resultante primariamente do menor consumo de ração; haja vista que redução no consumo de ração diminui a absorção de minerais, gerando restrição de nutrientes para a osteogênese (BUSHINKY & SESSLER, 1992). Além disso, uma das consequências mais importantes da dificuldade locomotora é a limitação de movimentação da ave que tem seu acesso à comida e água comprometido. Portanto, passa fome e sede e, conseqüentemente, não ganha peso adequadamente. Tal fato poderá intensificar e prejudicar ainda mais o desenvolvimento intestinal das aves, o que refletirá em um desempenho comprometido (ALMEIDA PAZ, 2008b)

As condições ambientais de alojamento a que as aves são submetidas podem desencadear problemas locomotores em frangos (NÄÄS, 2008), devido ao desequilíbrio eletrolítico causado pelo estresse por calor, que compromete o desenvolvimento ósseo e contribui para o aumento da incidência de problemas de pernas em frangos de corte jovens (PATIENCE, 1990). Todavia, embora as aves em acidose metabólica apresentem maior incidência de problemas de pernas que as aves em equilíbrio metabólico, o mecanismo exato da influência do equilíbrio ácido-base sobre a calcificação do osso ainda não está bem definido (SIMONS et al., 1987). A vitamina D3 age no intestino estimulando a absorção de cálcio e, no osso, aumenta o recrutamento de osteoclastos, estimula a síntese de proteínas pelos osteoblastos e participa na mineralização da matriz (FERNANDES, 2005). Durante o estado de acidose metabólica há redução na conversão da vitamina D3 para sua

forma biologicamente ativa, o 1,25-diidroxicolecalciferol, por hidroxilação, o que pode influenciar a mineralização dos ossos (SAUVER & MONGIN, 1974; Gonzales & Mendonça Jr. (2006). Em codornas japonesas (*Coturnix coturnux japonica*), estresse cíclico por calor (34°C, de 9h00m às 17h00m, do 10º ao 42º dia de idade) reduziu as concentrações de cálcio, de fósforo, de magnésio e de manganês no tibiotarso devido à maior excreção destes minerais, o que prejudicou a mineralização óssea (SAHIN et al., 2006). De acordo com os dados do capítulo 06 houve um aumento na pressão parcial de dióxido de carbono, e queda do pH sanguíneo, para as aves mantidas em temperatura quente, indicando uma possível acidose metabólica nas aves. Assim, a acidose metabólica deve ter causado queda no consumo de ração, resultando no menor desenvolvimento dos frangos criados sob estresse por calor e, conseqüentemente, de seus ossos. Isso é reforçado pelos dados de Bruno et al. (2002), segundo os quais restrição alimentar qualitativa associada a altas temperaturas reduz o crescimento de ossos longos em frangos de corte. Nossos dados concordam com obtidos por Bruno et al. (2000), que também relataram redução no comprimento e largura da tíbia e do fêmur nos frangos de corte criados sob condições de estresse de calor. Yalçın et al. (1996) também verificaram que elevada temperatura ambiente reduz o peso da tíbia e do úmero, mas não registraram diferenças no comprimento desses ossos. Redução no diâmetro e no comprimento do fêmur sob alta temperatura ambiente também foi observada por Pelicano et al. (2005).

Os parâmetros biomecânicos dos ossos também foram influenciados pela temperatura de criação. Tanto para o tibiotarso, como para o fêmur de aves submetidas ao estresse por calor houve uma diminuição na força máxima, indicando menos resistência dos ossos a impactos. Os parâmetros biomecânicos são indicativos da verdadeira qualidade óssea e são determinados pela densidade (BARREIRO et al., 2011) e força máxima na flexão (REIS et al., 2011). O osso funciona como um sistema tamponante para o controle ácido-base dos fluidos corporais. Estresse por calor induz a liberação de cátions (incluindo o cálcio) do osso para o sangue para corrigir seu pH (OLIVEIRA et al., 2010). A acidose metabólica estimula primeiro a dissolução mineral e depois a reabsorção óssea mediada por células, devido à maior excreção de cálcio pelos rins (RIOND, 2001; OLIVEIRA et

al., 2010). Essa perda de cálcio resultaria em menor mineralização óssea, podendo afetar a qualidade mecânica dos ossos no animal. Um fator importante é que a quantidade de cálcio no osso tem sido associada à fragilidade óssea. Portanto, semelhante ao que ocorreram para os parâmetros macroscópicos dos ossos, os biomecânicos foram influenciados de maneira negativa durante o estresse por calor, devido a uma provável alcalose metabólica, com queda na porcentagem de cálcio nos ossos. Thorp & Waddington (1997) observaram que ossos com valores inferiores de cálcio fraturavam mais durante o processamento. Crespo et al. (2002) também encontraram maior incidência de fraturas de fêmures em perus adultos que possuíam menores porcentagens de cálcio. As quantidades relativas e propriedades do mineral, matriz orgânica, determinam suas propriedades em termos de força mecânica. No entanto, Bruno et al. (2000) observaram que a alta temperatura de criação reduziu o crescimento dos ossos longos, mas não afetou a resistência dos ossos à ruptura.

5. Conclusões

A alta temperatura de incubação associada ou não com injeção de vitamina C pré-incubação não influenciou os efeitos da alta temperatura de criação sobre o crescimento corporal dos frangos e de seus ossos da perna; todavia, associados, aumentaram a densidade óssea independentemente da temperatura de criação.

6. Referências bibliográficas

- ABU-DIEYEH, Z. H. M.; Effect of high temperature *per ser* on growth performance of broilers. *International Journal of Poultry Science*, v. 5, n. 1, p. 19-21, 2006.
- ALMEIDA PAZ, I. C L. Problemas locomotores em frangos de corte: revisão. *BioEng, Campinas*, v. 2, n. 3, p. 263-272, 2008b.
- AMOROSO, L. Respostas densitométricas, morfofisiológicas e desempenho de frangos de corte tratados com água filtrada e não filtrada. 2009. 91f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

- BARBOSA, A. A.; MORAES, G. H. K.; TORRES, R. A.; REIS, D. T. C.; RODRIGUES, C. S.; MÜLLER, E. S. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 4, p. 772-778, 2010.
- BARREIRO, F. R.; AMARAL, L. A.; SHIMANO, A. C.; ALVA, J. C. R.; BARBOSA, J. C.; BARALDI-ARTONI, S. M. Physiologic values of broiler femurs at different growth phases using boné densitometry and bone breaking strength. *International Journal of Poultry Science*, v.10, n.7, p.530-533, 2011.
- BRUNO, L. D. G. Desenvolvimento ósseo em frangos: influência da restrição alimentar e da temperatura ambiente. 2002. 77f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2002.
- BRUNO, L. D. G.; FURLAN, R. L.; MALHEIROS, E. B.; MACARI, M. Influence of early quantitative feed restriction on long bone growth at different environmental temperatures in broilers chickens. *British Poultry Science*, v. 41, p. 389–394, 2000.
- BUSHINSKY, D. A.; SESSLER, N. E. Critical role of bicarbonate in calcium release from bone. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, v. 262, n. 3, p. 425-431, 1992.
- CRESPO, R.; STOVER, S. M.; SHIVAPRASAD, H. L.; CHIN, R. P. Microstructure and mineral content of femora in male turkeys with and without fractures. *Poultry Science*, v.81, p.1184-1190, 2002.
- DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L.; QUIROZ, M. A. Metabolic challenges and early bone development. *Poultry Science*, v. 16, n. 1, p. 126–137, 2007.
- FARIA FILHO, D. E.; CAMPOS, D. M. B.; TORRES, K. A. A.; VIEIRA, B.S.; ROSA, P.S.; VAZ, A. M.; MACARI, M.; FURLAN, R.L. Protein levels for eatexposed broilers: performance, nutrients digestibility, and energy and protein metabolism. *International Journal of Poultry Science*, v. 6, n. 3, p. 187-194, 2007.
- FERNANDES, I. C. Fisiologia e Patogênese Óssea. 2005. Disponível em:<http://www.hurnp.uel.br/farmacologia/materias/gregghi03.htm>. Acesso em: 01 dez. 2012.

- GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C. F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: grow performance, body composition and energy retention. *British Journal of Nutrition*, v. 75, n. 2, p. 195–204, 1996a.
- GHONIM, A. I. A.; AWAD, A. L.; FATTOUH, M. H. A.; EL-SHHAT, A. M. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. *Egypt Poultry Science*, v. 29, p. 1085-1099, 2009.
- GONZALES, E.; MENDOÇA JR., C. X. Problemas locomotores em frangos de corte. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 79-94, 2006. Santa Catarina. Anais... 2006.
- KESTIN, S. C.; SU, G.; SORENSEN, P. Different commercial broiler crosses have different susceptibilities to leg weakness. *Poultry Science*, v.78, p.1085-1090, 1999.
- LEACH, R. M.; LILBURN, M. S. Current knowledge on the etiology of tibial dyschondroplasy in the avian species. *Poultry Science*, v. 4, p. 57-65, 1993.
- LEESON, S.; SUMMERS, J. D. *Scott's nutrition of the chicken*. 4.ed. Guelph: University Books, 591p., 2001.
- LEKSRISOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P. W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poultry Science*, v. 86, p. 2685–2691, 2007.
- LOHAKARE, J. D.; RYU, M. H.; HAHN, T. W.; LEE, J. K.; CHAE, B. J. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 14, p. 10–19, 2005.
- LOURENS, A.; BRAND, VAN DEN H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. *Poultry Science*, v. 86, p. 2194–2199, 2007.
- MAHMOUD, K. Z.; EDENS, F. W.; EISEN, E. J.; HAVENSTEIN, G. B. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 137, p. 35–42, 2004.

- MOHAMMED, K. A.; EL-BOGHDADY, A.; SOLIMAN, M. A. H.; ABD AL-GALIL, M. A.; ABD AL-ALEEM, N. M. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. *Egypt Poultry Science*, v. 31, n. 2, p. 379-392, 2011.
- MOLENAAR, R.; ANKER VAN DEN, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; BRAND VAN DEN, H. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration during incubation on the developmental and physiological status of broiler hatchlings in the perinatal period. *Poultry Science*, v. 90, p. 1257–1266, 2011.
- MURAKAMI, A. E. Balanço eletrolítico da dieta e sua influência sobre o desenvolvimento dos ossos de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. Anais...Campinas, 2000. p. 33-61.
- NÄÄS, I. A. Deficiências locomotoras em frangos de corte e bem-estar animal. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, suplemento técnico, n. 2, 2008.
- NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSTIANIAK, S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia Biologica (Krakow)*, v. 60, p. 93-97, 2012.
- OLIVEIRA, M. C.; ARANTES, U. M.; STRINGHINI, J. H. Efeito do balanço eletrolítico da ração sobre parâmetros ósseos e da cama de frango. *Revista Biotemas*, v. 23, n. 1, p. 203-209, 2010.
- PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P. Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. *Poultry Science*, v. 63, p. 1262-1268, 1984.
- PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P.; BRAKE, J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. *Journal Applied Physiology*, v. 58, p. 1511-1516, 1985.
- PATIENCE, J. F. A review of the role of acid-base balance in amino acid nutrition. *Journal of Animal Sciences*, v. 68, p. 398-408, 1990.
- PELICANO, E. R. L.; BERNAL, R. L.; FURLAN, R. L.; MALHEIROS, E. B.; MACARI, M. Efeito da temperatura ambiente e da restrição alimentar proteica ou energética sobre o ganho de peso e o crescimento ósseo de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 3, 353-360, 2005
- PIRES, D. L.; SGAVIOLI, SARAH.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. C. Acido ascórbico *in ovo* sobre a eclodibilidade de ovos. In: 21º REUNIÓN DE LA

- ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL – ALPA, 2011, Montevideo, Uruguai. Anais... Montevideo, Uruguai, 2011.
- REIS, D. T. C.; TORRES, R. A.; BARBOSA, A. A.; RODRIGUES, C. S.; MORAES, G. H. K. Efeito de linhagem e sexo nas características geométricas e biomecânicas de tibias de frangos de corte. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 33, n. 1, p. 101-108, 2011.
- RIOND, J. L. Animal nutrition and acid-base balance. *European Journal of Nutrition*. v. 40, p. 245-254, 2001.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.
- SAHIN, K.; ONDERCI, M.; SAHIN, N.; BALCI, T. A.; GURSU, M. F.; JUTURU, V.; KUCUK, O. Dietary arginine silicate inositol complex improves bone mineralization in quail. *Poultry Science*, v. 85, n. 3, p. 486–492, 2006.
- SAHIN, K.; SAHIN, N.; KÜÇÜK, O. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites, and antioxidant status of broiler chickens reared at a high environmental temperature (32°C). *Nutrition Research*, v. 23, p. 225-238, 2003.
- SAS Institute. SAS Proprietary Software Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2002.
- SGAVIOLI S.; BORGES L. L.; ALMEIDA, DE V. R.; THIMOTHEO, M.; OLIVEIRA, DE J. A.; BOLELI, I. C. Egg Injection of Ascorbic Acid Stimulates Leucocytosis and Cell Proliferation in the Bursa of Fabricius *International Journal of Poultry Science*, v. 12, 2013b.
- SGAVIOLI, S.; ALMEIDA DE V. R.; PRAES, M. F. F. M.; VICENTINI, T. I.; MATOS JÚNIOR, J. B.; MORITA, V. DE S.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. C. Effects of Intra-Egg Injection of Vitamin C on the Eggshell Mineral Absorption, Embryo Mortality and Hematological Variables in Chicks at Hot Incubation Temperature. *International Journal of Poultry Science*, v. 12, 2013a.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos*. 3th rev. ed. Viçosa:UFV. 2002.

- SIMONS, P. C. M.; HULAN, H. W.; TEUNIS, G. P. Effect of dietary cation-anion balance on acid-base status and incidence of tibial discondroplasia of broiler chickens. *Nutrition Reports International*, v. 35, n. 3, p. 591-600, 1987.
- SKINNER, J. T.; BEASLEY, J. N.; WALDROUP, P. W. Effects of dietary amino acids levels on bone development in broiler chickens. *Poultry Science*, v. 70, p. 941-946, 1991.
- SULLIVAN, T. W. Skeletal problems in poultry: estimated annual cost and descriptions. *Poultry Science*, v. 73, p. 941-946, 1994.
- TAKITA, T. S. Efeito do genótipo, do ambiente e da interação genótipo x ambiente na incidência de discondroplasia tibial em frangos de corte machos. Botucatu: UNESP, 1998, 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências de Botucatu/Universidade Estadual Paulista, 1998.
- TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; MURRAY, E. Force feeding methodology and equipment for poultry. *Poultry Science*, v. 63, n. 4, p.573-575, 1984.
- THORNTON, P. A. Increased environmental temperature influences on ascorbic acid activity in the domestic fowl. *Federation Proceedings*. v. 20, p. 210, 1961.
- THORP, B. H.; WADDINGTON, D. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day- old broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, v. 62, n. 1, p. 67-73, 1997.
- VARGAS, J. R.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; CARVALHO, D. C. O.; CUPERTINO, E. S.; TOLEDO, R. S.; PINTO, R. Níveis nutricionais de cálcio e de fósforo disponível para aves de reposição leves e semipesadas de 13 a 20 semanas de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1263-1273, 2004.
- VATHANA, S.; KANG, K.; LOAN, C. P.; Effect of vitamin C supplementation on performance of broiler chickens in Cambodia. In: CONFERENCE ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH FOR DEVELOPMENT, 2002, Witzenhausen. Proceedings... Witzenhausen, 2002. p.72-78.
- VAZ, R. G. M. V. Nutrientes funcionais em rações de frangos de corte mantidos em ambiente de alta temperatura. 2006. 48f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

- WAKKEL, K.; HOF, R. P.; ZANDSTRA, G.; DUCRO, B. J. Diphasic allometric growth of some skeletal bones and the digestive tract in white leghorn pullets consuming ad libitum and restricted diets. *Poultry Science*, v. 77, p. 826-833, 1998.
- WINELAND, M. J.; MANN, K. M.; FAIRCHILD, B. D.; CHRISTENSEN, V. L. Effect of different setter and hatcher temperatures upon the broiler embryo. *Poultry Science*, v. 79, p. 123 (Abstr.), 2000.
- YALÇIN, S.; OZKAN, S.; SETTAR, P.; TOLON, B. Influence of ambient temperature and genotype on bone parameters and incidence of leg disorders of male and female broilers. In: *WORLD'S POULTRY CONGRESS*, 1996, New Delhi, India. Proceedings... New Delhi, India, 1996. v. II, p.577-80.
- ZAKARIA, A. H.; AL-ANEZI, M. A. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality and the body weights of broiler chickens. *Poultry Science*, v. 75, p. 1204–1209, 1996.

CAPÍTULO 8 – EFEITOS DA INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO IN OVO E DO ESTRESSE POR CALOR NA INCUBAÇÃO E NA CRIAÇÃO SOBRE O COMPORTAMENTO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – Os frangos respondem ao estresse por calor com mudanças comportamentais utilizadas para tentar manter a normotermia. À manipulação térmica intermitente durante a incubação têm-se atribuído a indução de adaptação epigenética das aves ao estresse por calor na criação. Ácido ascórbico (AA) tem sido analisada quanto a exercer função esti-estressora sobre aves criadas sob condições de calor. O presente estudo analisou os efeitos do estresse contínuo por calor na incubação, com e sem injeção de AA intra ovo, sobre o comportamento de frangos criados sob condições diferentes de temperatura. Ovos férteis de matrizes de frangos de corte (Cobb®), foram utilizados em três tratamentos durante a incubação [sem injeção de AA e incubados à 37,5°C; sem injeção de AA e incubados à 39°C e com injeção in ovo de AA pré-incubação (6µg/100µl de água) e incubados à 39°C], e três temperaturas de criação (fria, termoneutra e quente). Aves foram filmadas com 7, 14 e 35 dias por uma hora, nos períodos da manhã e tarde, utilizando-se câmeras de vídeo, cujas imagens foram gravadas a cada um minuto. Posteriormente, as imagens foram analisadas quanto à frequência dos comportamentos à cada 1 minuto. Os frangos criados sob temperaturas fria e quente de criação apresentaram comportamentos característicos de estresse por frio e calor, indicando que alta temperatura de incubação associada ou não com AA não foram efetivos em diminuir ou evitar os efeitos do estresse térmico na criação.

Palavras-chave: bem estar, estresse térmico, manipulação térmica, vitamina C.

1. Introdução

Ao longo dos anos, a avicultura brasileira vem ocupando posição de destaque no mercado agropecuário, com aumento da exportação e do consumo interno, em paralelo a um vertiginoso aumento da tecnologia empregada no País, possibilitando melhor qualidade do produto final (BESSEI, 2006). A seleção genética para maior e mais rápido crescimento muscular foi um dos fatores que possibilitou o crescimento da avicultura. No entanto, alta taxa de crescimento gera alta produção de calor, cuja dissipação deve ocorrer para manutenção da normotermia. Nesse contexto, ambiente quente de criação se tornou fator limitante para o crescimento e sobrevivência dos frangos. Para tentar manter a temperatura corporal, quando expostos a calor, os frangos elicitam, entre outras coisas, uma série de comportamentos que reduzem a produção e aumentam a perda de calor. Os frangos reduzem consumo de ração e a atividade, aumentam a ingestão de água, eriçam as penas, esticam as asas, aumentam o fluxo sanguíneo periférico (MACARI et al., 2002). Adicionalmente, os frangos ofegam, mas isso leva à redução de CO_2 sanguíneo, gerando um estado de acidose respiratória (MACARI et al., 2010) ao que a ave responde com aumento de HCO_3^- , na tentativa de restabelecer o equilíbrio de pH sanguíneo. Se não restabelecido, pode causar respiração fraca e irregular, câimbras musculares e convulsões e levar o animal á óbito.

Dentre as várias práticas atualmente estudadas para amenizar os efeitos do estresse por calor nas aves, está o uso de aditivos nutricionais, como o AA, e a manipulação da temperatura de incubação dos ovos visando desenvolver nos embriões e/ou fetos o potencial de responder epigeneticamente à elevação da temperatura ambiente na criação, possibilitando as aves menor sensibilidade ou maior resistência ao calor (TZSCHENTKE & PLAGEMANN, 2006; TZSCHENTKE, 2007). Pesquisas têm demonstrado que aves estressadas necessitam de maior aporte de vitaminas e minerais (EL-BOUSHY, 1988; COELHO & MCNAUGHTON, 1995; MILTENBURG, 1999). O ácido ascórbico (AA) tem se mostrado efetivo em diminuir os efeitos do estresse térmico (MAHMOUD et al., 2004), uma vez que temperaturas elevadas impedem a absorção de vitamina C, reduzindo seus níveis no sangue e aumentando sua exigência (THORNTON, 1961; BRIGGS et al., 1994). Estudos prévios têm analisado os efeitos da manipulação térmica durante a incubação sobre a resistência imunológica dos pintos (KIDD, 2004;

YAHAV et al., 2004; YAÇIN et al., 2005; YAÇIN et al., 2008; GHONIM et al., 2009; SELIM et al., 2012), ou com a injeção de AA in ovo (ZAKARIA & AL-ANEZI, 1996; GHONIM et al., 2009; MOHAMMED et al., 2011; NOWACZEWSKI et al., 2012). Todavia, faltam informações na literatura sobre o efeito da manipulação térmica da incubação associada ou não com ácido ascórbico (AA) sobre o comportamento das aves durante a criação. O presente estudo verificou se a manipulação térmica durante a incubação, em conjunto com a injeção de AA antes da incubação, causariam uma adaptação epigenética em frangos de corte submetidos a estresse térmico durante a criação. Para isso, foi analisado o comportamento de frangos de ovos incubados à 37,5°C, 39°C e 39°C+AA criados sob temperatura fria, termoneutra e quente.

2. Material e métodos

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (protocolo n° 7377/10), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Três mil ovos férteis de frango de corte (Cobb®) (Globoaves, Itirapina, SP), provenientes de matrizes com 47 semanas de idade, foram pesados e utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com 3 tratamentos durante a incubação (sem injeção e incubados à 37,5°C; sem injeção e incubados à 39°C e com injeção in ovo de 6% de ácido ascórbico (AA) pré-incubação, em 100µl de água e incubados à 39°C), e 3 temperaturas de criação (fria, termoneutra e quente).

Foram utilizadas cinco incubadoras/tratamento, cada uma com 200 ovos, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de 67±2g. As incubadoras (Premium Ecológica, IP200), com controle automático de temperatura, umidade e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas com 60% de umidade relativa até a transferência e com 70% nos dois últimos dias de incubação.

A injeção da solução foi realizada antes do início da incubação. Após a limpeza do local com etanol 100%, a casca dos ovos foi perfurada, com uma agulha estéril (Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2")). A solução com AA (Synth, 99% de pureza) foi

injetada no albúmen a, aproximadamente, 6 mm abaixo da casca. Os ovos foram posicionados de modo horizontal, e a solução foi aplicada no polo mais findo do ovo (contrário à câmara de ar). Após a injeção, o orifício foi fechado com uma etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. O AA foi diluído em água Mili-Q, autoclavada, em ambiente escuro devido sua foto sensibilidade.

Para a fase de criação utilizaram-se 540 pintos de um dia de idade (Cobb®), machos e fêmeas, em três câmaras climáticas, com 15 parcelas/câmara, 12 aves por parcela, resultando em 5 repetições por tratamento. Os pintos da linhagem Cobb foram criados do 1º ao 42º dia de idade. Os pintos foram vacinados contra doença de Marek e Bouda Aviária, e durante a criação contra Gumboro e Newcastle, de acordo, com o programa de vacinação do Laboratório de Ciências Avícolas. Durante todo o período experimental, as aves receberam água e ração à vontade. As rações foram à base de milho e farelo de soja (Tabela 1), reajustadas para as fases de criação (1 a 21 dias), e final (22 a 42 dias de idade) atendendo as recomendações de Rostagno et al. (2011). A densidade utilizada foram 5 aves/m².

Tabela 01 – Composição percentual e nutricional calculada das rações, segundo as fases de inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento
Milho	60,83	63,74
Farelo de soja 45%	35,15	29,79
Óleo soja	-	3,12
Fosfato bicálcico	1,63	1,16
Calcário	0,84	0,76
Sal	0,42	0,44
L-Lisina HCL (78%)	0,25	0,21
DL-Metionina (99%)	0,29	0,23
L-Treonina	0,08	0,04
BHT	0,01	0,01
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50	0,50
TOTAL	100,00	100,00
	Composição nutricional calculada	
Proteína bruta (%)	21,27	18,86
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.883	3.121
Ca (%)	0,85	0,69
Na (%)	0,19	0,20
Fósforo disponível (%)	0,42	0,32
Metionina + cistina dig. (%)	0,88	0,77
Metionina dig. (%)	0,56	0,49
Lisina dig. (%)	1,22	1,05
Treonina dig. (%)	0,79	0,68
Triptofano dig. (%)	0,24	0,21
Arginina dig. (%)	1,32	1,16

* Nutrientes por quilograma de ração: fase de 1 a 21 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,4 g, Promotor de crescimento (bacitracina de zinco) 30 mg, (narsina+nicarbazina) 0,1g, Metionina 1,68g; Fase de 21 a 42 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 1,78 mg, Vit. B2 9,6 mg, Vit. B6 3,5 mg, Vit. B12 10 µg, Ácido Fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, Niacina 34,5 mg, Pantotenato de Cálcio 9,8 mg, Cobre 0,12 g, Cobalto 0,02 mg, Iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, Zinco 0,09 mg, Zinco Orgânico 6,75 mg, Selênio 0,27 mg, Colina 0,6 g, Promotor de crescimento (avilamicina) 7,5 mg, (monensina sódica) 0,1g, Metionina 1,4g.

As variáveis analisadas foram as frequências de diferentes comportamentos elicitados pelos frangos de corte durante as filmagens. Os diferentes tipos de comportamentos foram agrupados em sete categorias conforme proposto por PICOLI (2004): comportamento ingestivo (comendo e bebendo, CING), sendo dividido em comportamento de ingestão de água (CIAGU) e comportamento de ingestão de ração (CIRAÇ), comportamento de repouso (sentado, deitado, parado: CREP), comportamento exploratório (andando e ciscando: CEXP), comportamento de conforto (esticando membros, batendo asas, banho de poeira e limpando penas: CCON), comportamento agressivo (interações agonísticas e bicando penas: CAGR), comportamento de dissipação de calor (CDC), caracterizado pelo comportamento de abrir as asas, rente ao solo e/ou esticar a pena rente ao solo, como formas de troca de calor por condução e de aquecimento (CAQ), caracterizado pelo agrupamento das aves.

Para a avaliação do comportamento animal foram filmados 4 repetições por tratamento. As observações ocorreram, durante três dias (7, 14 e 35 dias de idade), nos seguintes horários: 8h às 9h (período da manhã), e 17h às 18h (período da tarde). Em cada horário foram realizados 60 registros de comportamento, espaçados a cada 1 minuto. Isso totaliza 120 registros em cada parcela por dia de observação. As imagens foram registradas por câmeras de vídeo instaladas no teto da câmara climática que, por sua vez, eram ligadas a um microcomputador equipado com placa de captura de imagens. As imagens, gravadas a cada um minuto, de acordo com Alves (2012) foram analisadas quanto à frequência dos comportamentos descritos anteriormente.

Análise Estatística

Para as variáveis: comportamento ingestivo (comendo e bebendo, CING), comportamento ingestivo de água (bebendo, CIAGU), comportamento ingestivo de ração (comendo, CIRAÇ), comportamento de repouso (sentado, deitado, parado: CREP), comportamento exploratório (andando e ciscando: CEXP), comportamento de conforto (esticando membros, batendo asas, banho de poeira e limpando penas: CCON), os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS® (SAS Institute, 2002), segundo um

delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo (“Split Plot in Time”), sendo considerados como tratamentos principais os tratamentos na incubação e as temperaturas de incubação e como secundário as datas de observação e os períodos. Em caso de efeito significativo, a uma probabilidade de 5%, as análises dos dados foram realizadas aplicando-se o teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Para as demais variáveis: comportamento agressivo (interações agonísticas e bicando penas: CAGR), comportamento de dissipação de calor (CDC) e de aquecimento (CAQ), realizou-se uma análise descritiva dos resultados.

3. Resultados

Nenhum dos comportamentos analisados (CING, CIAGU, CIRAÇ, CREP, CEXP, CCON) tiveram suas frequências influenciadas significativamente ($p > 0,05$) pelos tratamentos de incubação, as quais foram de 21,39; 10,84; 10,55; 66,02; 9,30; 2,70; 0,05; 0,40 e 0,14 %, respectivamente.

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) da idade e dos períodos de avaliação para o comportamento ingestivo (CING) (Tabela 2), cuja frequência diminuiu com a idade (Figura 1). E foi maior pela manhã do que à tarde (Figura 2).

Analisadas, separadamente, a frequência dos comportamentos de ingestão de água (CIAGU) e ração (CIRAÇ), verifica-se que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre temperatura de criação e idade e entre Idade e período de avaliação para CIAGU (Tabela 2). Como mostrado na Figura 3, ocorreu diminuição na frequência do CIAGU com a idade apenas nos frangos criados sob temperatura fria. Apenas aos 35 dias de idade, houve diferença na frequência desse comportamento entre as aves criadas sob as diferentes temperaturas, sendo que as aves criadas sob temperatura quente CIAGU com maior frequência do que as criadas sob temperatura termoneutra. A Figura 4 mostra que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na frequência do CIAGU das aves no período da tarde entre as idades, mas que a frequência do CIAGU pela manhã foi maior aos 7 dias de idade do que aos 14 e 35 dias. A frequência do CIRAÇ foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pela interação entre temperatura de criação e período de avaliação e entre idade e período de avaliação (Tabela 2). Não houve diferença na frequência do CIRAÇ à

tarde entre os frangos criados nas diferentes temperaturas de criação, mas a frequência do CIRAÇ no período da manhã foi menor sob temperatura quente de criação do que sob temperatura fria e termoneutra, sob as quais a frequência do CIRAÇ não diferiu (Tabela 5). A frequência do CIRAÇ no período da tarde não foi alterada pela idade, porém sua frequência à tarde diminuiu com o aumento da idade (Tabela 8).

A frequência do comportamento de repouso foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelo período de avaliação e pela interação entre as idades e as temperaturas de criação (Tabela 2). O comportamento de repouso foi mais frequente à tarde do que pela manhã (Figura 7). Além disso (Figura 8), nas aves criadas sob temperatura fria, o comportamento de repouso foi elicitado com maior frequência aos 35 do que aos 7 e 14 dias de idade, entre as quais as frequência desse comportamento foram similares. Aves criadas sob temperatura termoneutra e as criadas sob temperatura quente aumentaram a frequência do comportamento de repouso de 7 para 14 dias e mantiveram a frequência do mesmo de 14 para 35 dias de idade.

Com relação ao comportamento exploratório (Tabela 2), houve interação significativa ($P < 0,05$) entre temperaturas de criação e idades, temperaturas de criação e períodos analisados, e idade e período de avaliação. De acordo com a Figura 9, aves criadas sob temperatura fria mantiveram a frequência do comportamento exploratório até os 14 dias de idade, mas a diminuíram aos 35 dias. Aves criadas sob temperatura termoneutra diminuíram a frequência de comportamento exploratório de 7 para 14 dias de idade, e mantiveram a frequência de 14 para 35 dias. Aves criadas sob temperatura quente, por sua vez, diminuíram a frequência de comportamento exploratório com o aumento da idade. A Figura 9 também mostra que ocorreu diferença na frequência do comportamento exploratório entre as aves criadas sob diferentes temperaturas de criação aos 7 e 14 dias de idade. Aos 7 dias, o comportamento exploratório foi realizado com maior frequência pelas aves criadas sob temperatura quente do que fria. Aos 14 dias, aves criadas sob temperatura fria apresentaram com maior frequência esse comportamento do que as aves criadas sob temperatura termoneutra. De acordo com os dados da Tabela 10, aves criadas sob temperatura fria e quente apresentaram o

comportamento exploratório com maior frequência pela manhã do que à tarde, enquanto que as aves criadas sob temperatura termoneutra apresentaram com mesma frequência esse comportamento pela manhã e à tarde. Além disso, pela manhã, aves criadas sob temperatura fria e quente apresentam com mesma frequência o comportamento exploratório, mas com frequência maior do que as aves criadas sob temperatura termoneutra. A frequência com que as aves elicitam o comportamento exploratório à tarde não foi alterado pela temperatura de criação. Na Tabela 11 é possível verificar que, em todas as idades, o comportamento exploratório é realizado com maior frequência pela manhã do que à tarde, bem como que a frequência do comportamento exploratório pela manhã diminuiu com o aumento da idade e que à tarde ele foi menor nas aves com 35 dias de idade.

Para o comportamento de conforto (Tabela 2), houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas de criação e os períodos de avaliação e entre as idades e períodos de avaliação. A Figura 12 mostra que o comportamento de conforto foram elicitados pelas aves criadas sob temperatura fria e termoneutra com igual frequência pela manhã e tarde, mas que as aves criadas sob temperatura quente elicitaram esse comportamento com mais frequência pela manhã. Adicionalmente, a frequência do comportamento de conforto foi influenciada pelas temperaturas de criação apenas pela manhã. Aves criadas sob temperatura termoneutra e quente não diferiram na frequência com que elicitaram esse comportamento pela manhã, mas o fizeram com maior frequência do que as aves criadas na temperatura fria. Como mostrado na Figura 13, apenas aos 14 dias de idade ocorreu diferença na frequência do comportamento de conforto entre os períodos de avaliação, que foi maior à tarde do que pela manhã. No período da manhã, mas não no período da tarde, ocorreu diferença na frequência desse comportamento entre as idades. As aves aumentaram a frequência do comportamento de conforto de 7 para 14 dias e mantiveram sua frequência até os 35 dias.

Tabela 02 – Efeitos dos tratamentos na incubação (TI), das temperaturas na criação (TC), da idade (ID) e dos períodos de avaliação (PA), sobre o comportamento de frangos de corte.

	CING	CIAGU	CIRAÇ	CREP	CEXP	CCON
TI	0,5984	0,7778	0,6848	0,7856	0,7548	0,5982
TC	0,9579	0,0095	0,2556	0,6453	0,0310*	0,4445
ID	0,0002*	0,0026	<0,0001	<0,0001*	<0,0001*	0,0363*
PA	0,0005*	<0,0001	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0667
TI x TC	0,3217	0,6464	0,2038	0,7493	0,1569	0,9043
TI x ID	0,5742	0,6252	0,1425	0,5796	0,7847	0,5453
TI x PA	0,5231	0,4672	0,3242	0,7407	0,8687	0,0516
TC x ID	0,2951	0,0013*	0,0515	0,0045*	<0,0001*	0,9313
TC x PA	0,4247	0,7562	0,0321	0,7450	0,0125*	<0,0001*
ID x PA	0,1779	<0,0001*	<0,0001*	0,1150	<0,0001*	<0,0001*
CV (%)	25,03	32,34	22,71	10,33	38,34	52,22

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CING: comportamento ingestivo; CIAGUA: comportamento ingestivo de água; CIRAÇ: comportamento ingestivo de ração, CREP: comportamento de repouso; CEXP: comportamento exploratório e CCON: comportamento de conforto.

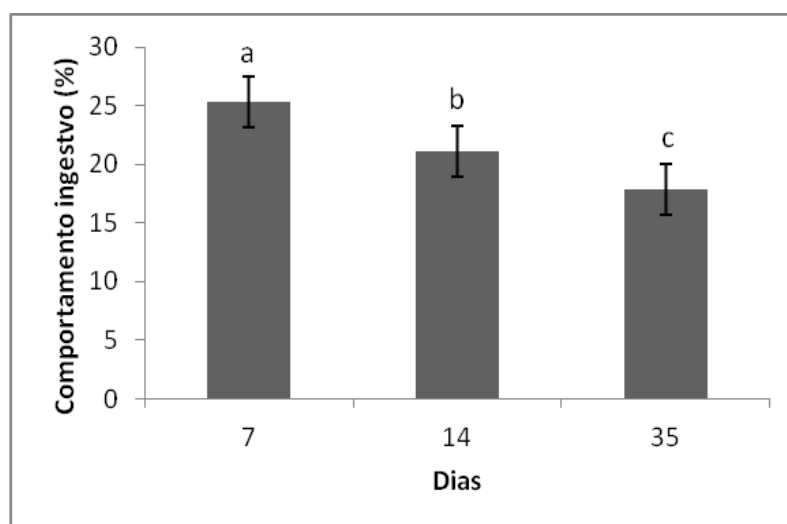


Figura 01. Comportamento ingestivo (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade. a-c: médias com letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$).

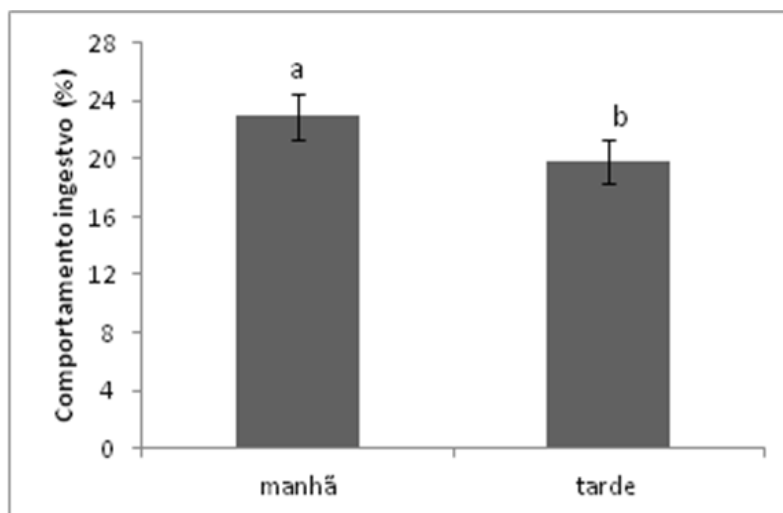


Figura 02. Comportamento ingestivo (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde. a-b: médias com letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$).

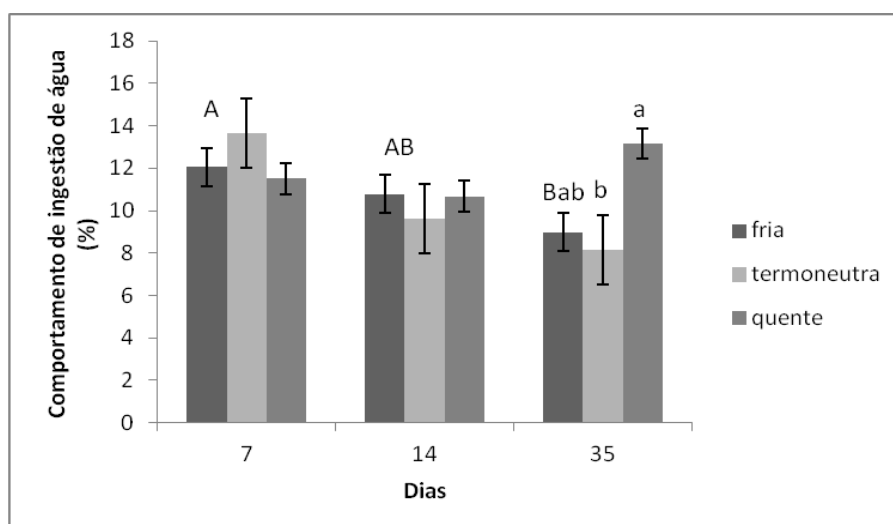


Figura 03. Comportamento ingestivo de água (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os dias respectivamente ($P < 0,05$).

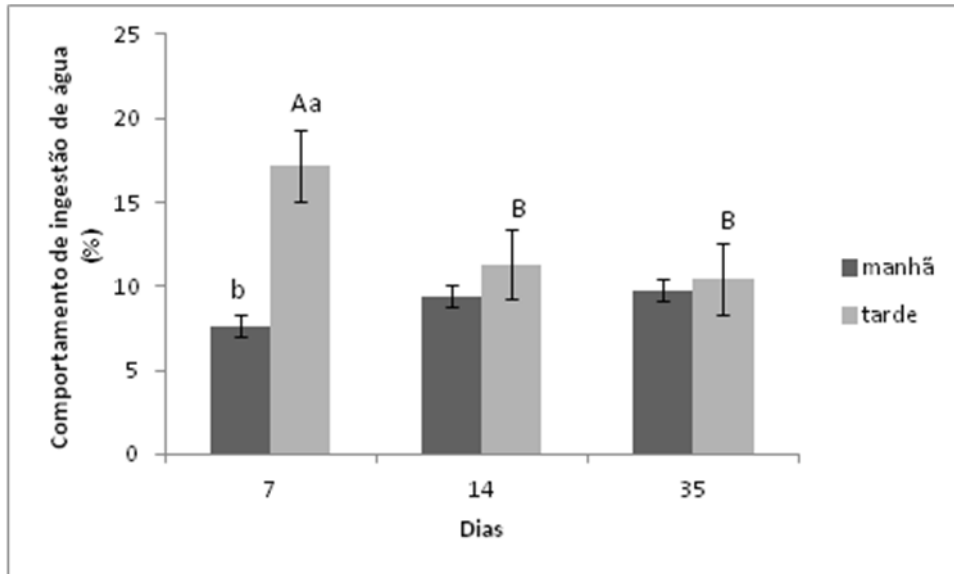


Figura 04. Comportamento ingestivo de água (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

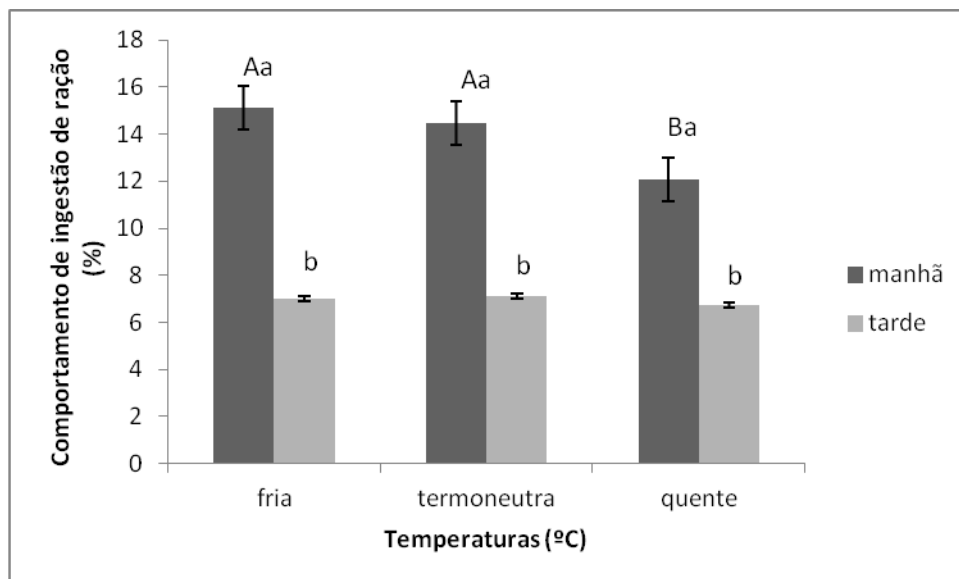


Figura 05. Comportamento ingestivo de ração (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

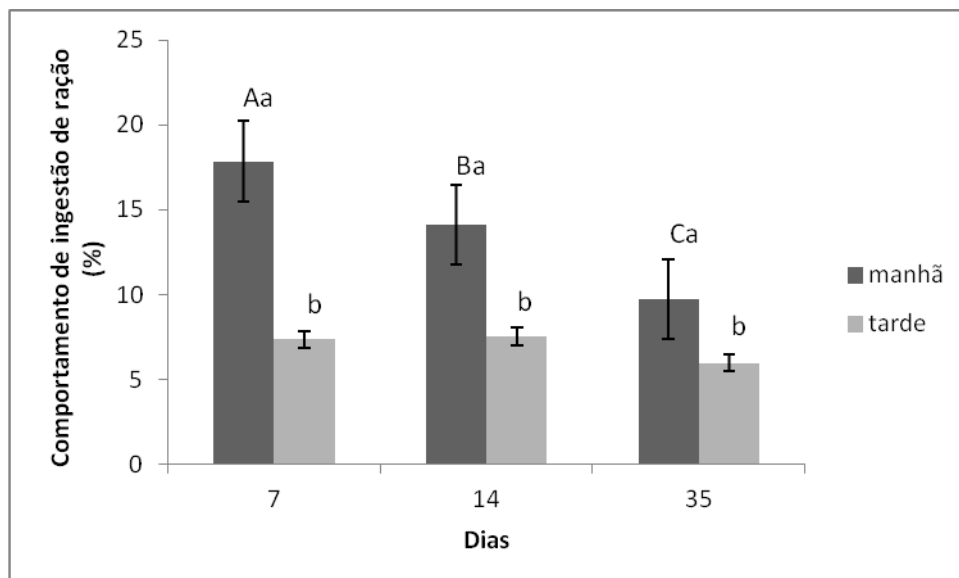


Figura 06. Comportamento ingestivo de ração (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

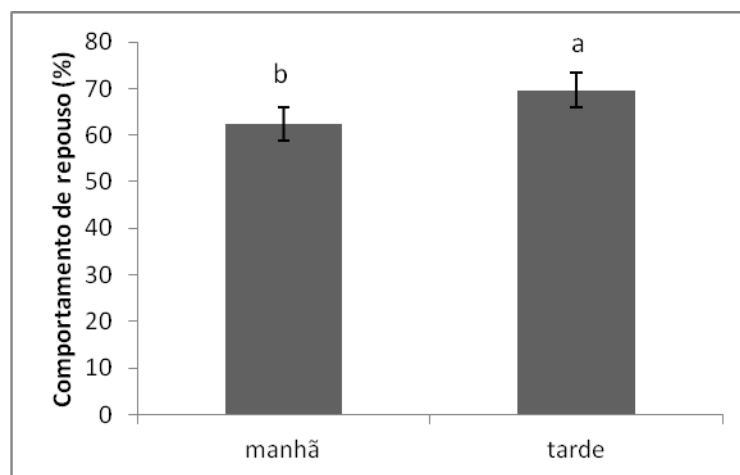


Figura 07. Comportamento de repouso (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde. a-b: médias com letras distintas diferem significativamente ($P < 0,05$).

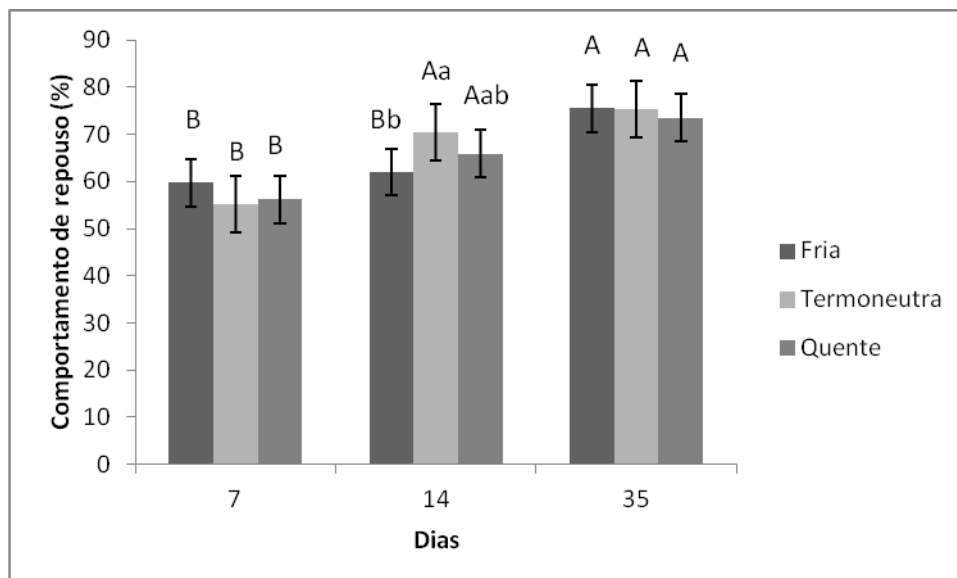


Figura 08. Comportamento de repouso (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os dias respectivamente ($P < 0,05$).

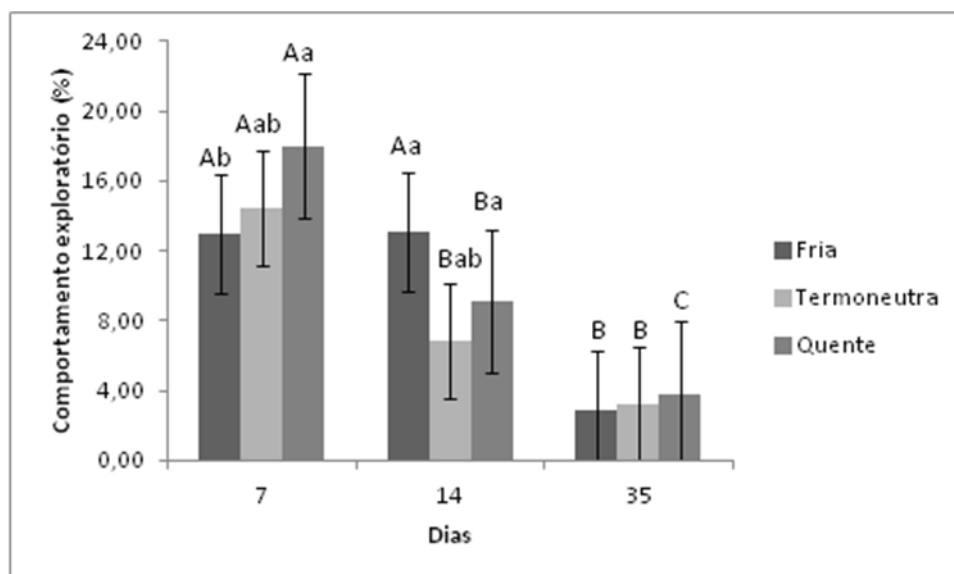


Figura 09. Comportamento exploratório de frangos de corte (%) com 7, 14 e 35 dias de idade, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os dias respectivamente ($P < 0,05$).

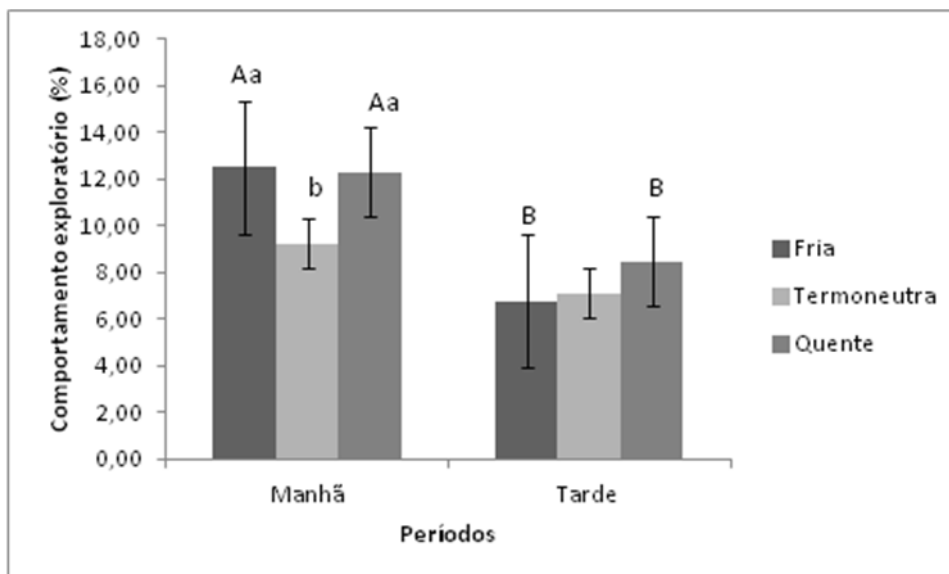


Figura 10. Comportamento exploratório (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

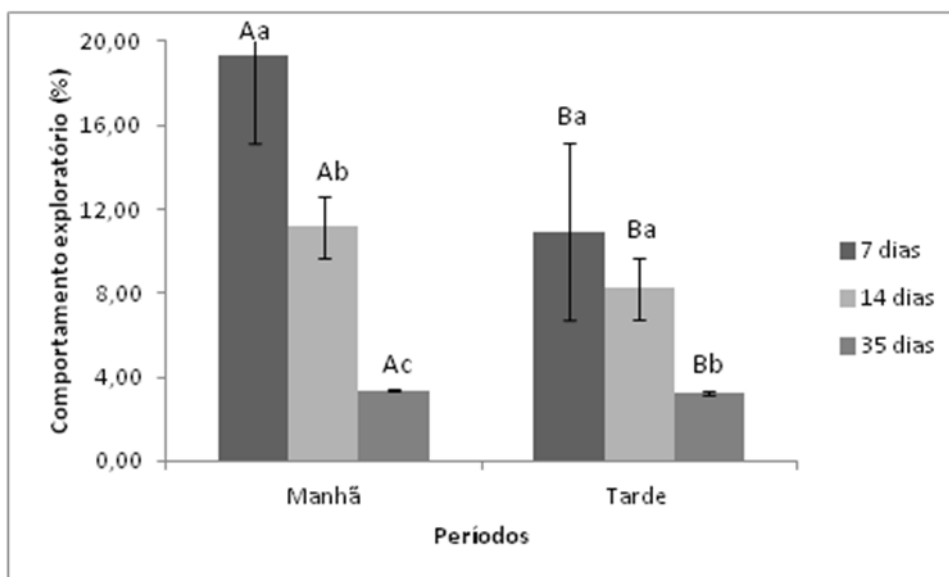


Figura 11. Comportamento exploratório (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

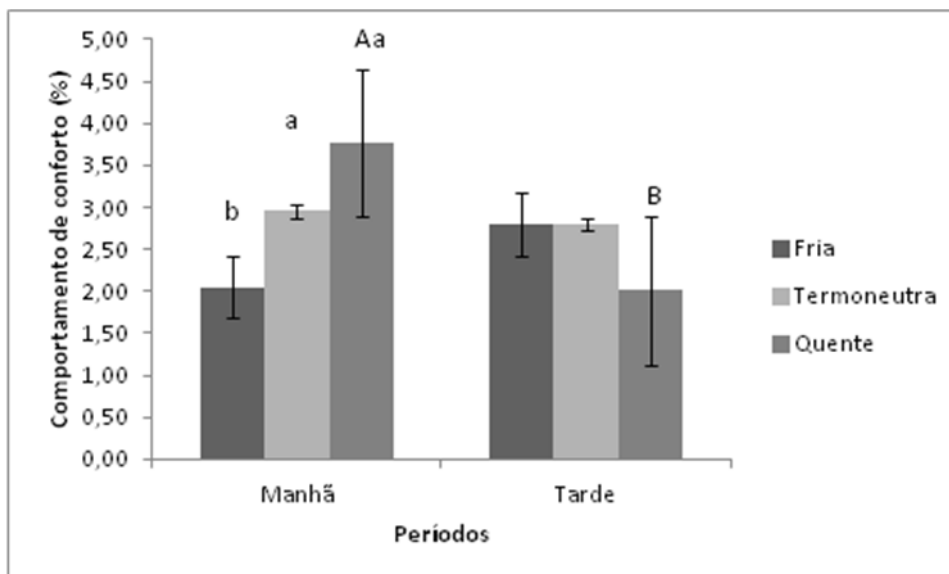


Figura 12. Comportamento de conforto (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde, nas diferentes temperaturas de criação. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre as temperaturas de criação e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

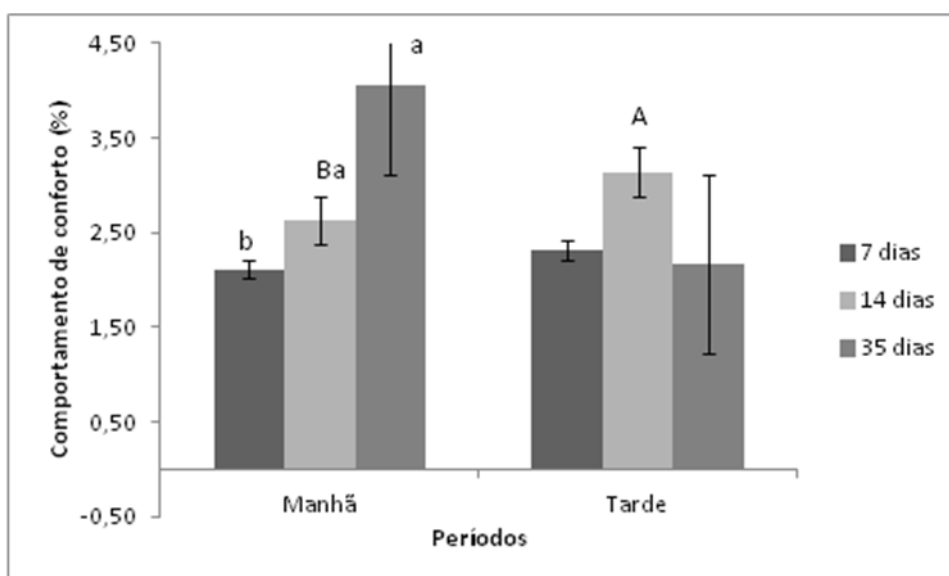


Figura 13. Comportamento de conforto (%) de frangos de corte nos períodos da manhã e da tarde com 7, 14 e 35 dias de idade. A-B; a-b: médias com letras distintas maiúsculas e minúsculas diferem significativamente entre os dias e os períodos respectivamente ($P < 0,05$).

De uma maneira geral, as aves não expressaram o comportamento de agressividade. Com relação ao comportamento de dissipação de calor e de

aquecimento (Figura 14), eles foram expressos com maior frequência aos 35 e 7 dias de idade, respectivamente

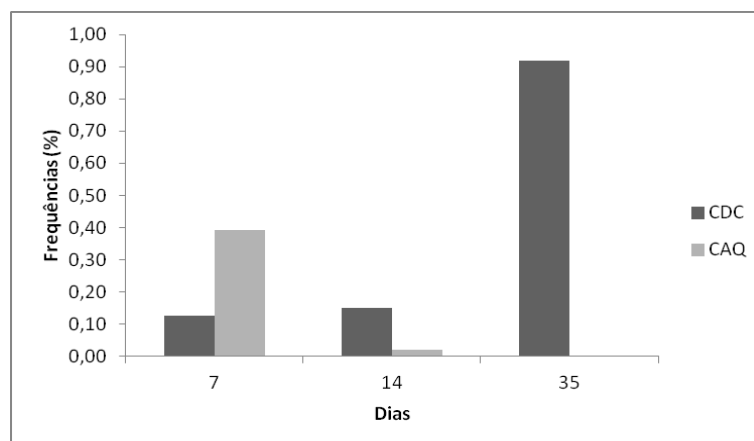


Figura 14. Comportamento de dissipação de calor (CDC) e de aquecimento (CAQ) (%) de frangos de corte com 7, 14 e 35 dias de idade.

4. Discussão

Temperaturas que se afastam do conforto térmico desencadeiam nas aves respostas fisiológicas que as auxiliam no restabelecimento da normotermia e dos processos fisiológicos. Tais respostas envolvem, entre outras coisas, alterações comportamentais que possibilitam diminuir a produção e aumentar a perda de calor em ambiente quente ou aumentar a produção e diminuir a perda de calor sob ambiente frio. Sob condições de calor, os frangos diminuem consumo de ração e aumentam a ingestão de água, diminuem atividade, eriçam as penas, aumentam circulação sanguínea periférica e ofegação (MACARI et al., 2000). O inverso ocorre quando as aves estão sob ambiente frio.

Os dados do presente estudo mostraram que alta temperatura de incubação associada ou não com AA não influenciou a frequências dos comportamentos de ingestão de água, ração, repouso, conforto, exploração, dissipação de calor e aquecimento, indicando que os mesmos não foram efetivos em minimizar ou evitar os efeitos do estresse por frio ou calor. Contudo, diferentemente, efeitos positivos da alta temperatura associada ou não com o AA tenham sido registrados para distúrbios da hemodinâmica (Cap. 6) e características ósseas da perna (Cap. 7). Todavia, nossos dados registram alterações nas frequências desses comportamentos entre temperaturas de criação, idades e período do dia.

No que se refere a alterações de comportamento frente à alterações da temperatura ambiente, comparado aos frangos criados sob condições termoneutras, os dados do presente estudo mostram que frangos criados sob temperatura fria diminuíram o consumo de água com o aumento da idade, não alteraram o consumo de ração, diminuiu a atividade (traduzida por aumento na frequência do comportamentos de repouso e diminuição na frequência do comportamento exploratório) apenas com 35 dias, apresentam com menos frequência comportamento de conforto pela manhã; enquanto que os frangos criados sob temperatura quente ingeriram água com maior frequência apenas os 35 dias de idade, diminuíram o consumo de ração realizado pela manhã, diminuíram a atividade a partir dos 14 dias. Ambos, contudo, exploraram mais o ambiente de criação pela manhã. Tais dados mostram que frangos criados sob ambiente quente diminuem sua atividade de consumo de ração, repouso e exploração em idade anterior á das aves criadas sob temperatura fria. Em condições de estresse térmico as aves diminuem consumo de ração e seu ritmo de atividade, passando a ficarem paradas por mais tempo, na tentativa de minimizar a produção de calor corporal; trata-se de um mecanismo de defesa das aves uma vez que, ficando paradas, gastam menos energia (SEVEGNANI et al., 2005; BARBOSA FILHO et al., 2007) e produzem menos calor. Segundo Barbosa Filho et al. (2007), o comportamento de repouso das aves em condições de estresse térmico aumenta o tempo de contato da ave com a cama ou o solo, que certamente estariam a uma temperatura inferior à do corpo do animal, favorecendo a troca de calor por condução. Assim, a maior frequência de repouso das aves aos 35 dias de idade, quando criadas em temperatura quente, pode estar relacionado com dissipação de calor dos frangos para o chão dos boxes. A redução na atividade das aves com a idade, independentemente da temperatura de criação, pode estar relacionada com o alto consumo de ração, alto metabolismo e presença de sistema ósseo jovem, bem como ossos da perna menos resistente uma vez que temperatura quente de criação diminuiu a força máxima de quebra dos fêmures e tíbias (Cap. 7). Em condições de estresse calórico o consumo de água está diretamente relacionado ao aumento da demanda de água destinada ao processo de perda de calor por meios evaporativos. Nessas condições, o alto calor específico da água faz com que ela atue como “tampão”, fazendo com que a tem-

peratura corporal permaneça constante, frente à flutuação ocorrida na temperatura ambiente (MOURA, 2001). No presente estudo, a ingestão de água esta foi contrária a ingestão de ração, com maior ingestão no período da tarde, e maior ingestão com o passar da idade, além disso, pela necessidade de refrigerar o organismo, quanto mais quente e úmido e quanto mais velha a ave, maior foi o tempo gasto na ingestão de água. Tais dados corroboraram os encontrados por Pereira et al. (2002). De acordo com o organismo das aves tem adaptações específicas em consonância com as alterações cardiorrespiratórias e metabólicas ante o estresse calórico (MACARI, 1996). Nesse contexto, o aumento na ingestão de água tem a função de refrigerar o organismo e diminuir a desidratação causada pela perda de calor por via respiratória Sevegnani et al. (2005) e Pereira et al. (2005). Essas modificações estão associadas a restabelecer a água corporal perdida na tentativa de manter o resfriamento evaporativo e manter o volume sanguíneo, para suportar o aumento no débito cardíaco induzido pela vasodilatação periférica no calor. Os estímulos da luz e da temperatura ambiental podem controlar o horário de realização do banho das aves, bem como sua ocorrência ou não (HOGAN & BOXEL, 1993; APPLEBY & HUGHES, 1991). Como citado anteriormente, este comportamento teve maior expressão durante o período da manhã, independente da temperatura de criação e foi observado com maior frequência aos 14 e 35 dias de idade, período este onde as tiveram menor ingestão de ração e/ou água. Chama a atenção que os valores de frequência registrados são muito semelhantes aos apresentados por Picolli (2004) na avaliação do desempenho e comportamento de frangos de corte criados em regime semi-confinado, o que em parte pode estar explicado pela densidade utilizada, bem menor que a dos sistemas comerciais.

Os resultados do presente estudo mostraram que frangos apresentaram o comportamento de ingestão (água+ração) com maior frequência pela manhã e diminuíram a frequência de ingestão ao longo da idade. Análise separada da frequência de ingestão de água e ração mostrou que, isso foi relacionado com a frequência do consumo de ração, o qual foi realizado com maior frequência pela manhã, período no qual a frequência desse comportamento diminui com a idade. A ingestão de ração com menor frequência à tarde ocorreu simultaneamente com a maior frequência de repouso e menor frequência do comportamento exploratório.

Maior ingestão de ração ocorreu durante o período da manhã também foi observado por Barbosa Filho et al. (2007). Em conjunto as frequências desses comportamentos indicam maior atividade das aves pela manhã do que à tarde, o que parece ser representativo do comportamento elicitado diariamente em função das variações circadianas das condições térmicas. Esse biorritmo parece estar ligado principalmente ao fotoperíodo que, neste trabalho, foi de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, sendo o período de luz dentro da câmara compreendido entre o horário das 8 às 24 h. Aumento na frequência de repouso com a idade também foi observado por Borges et al. (2009). Nossos dados também concordam com os de Rosa et al. (2002) e Sevegnani et al. (2005), que também registraram menor ingestão de ração por aves mais velhas. A redução na frequência de ingestão de ração com a idade, todavia, deve ser vista com cautela, haja vista que o consumo de ração aumentou com a idade (Cap. 5). Assim, embora a frequência de ingestão de ração tenha diminuído, o tempo de consumo ou sua ingestão deve ter aumentado. Ainda de acordo com nossos dados, os frangos diminuíram a frequência do comportamento de aquecimento com a idade, e aumentaram os de dissipação de calor. Tais dados devem ser resultantes do alto ganho de peso das aves no período (Cap. 5). Eles são muito importantes, pois mostram que os frangos estão utilizando-se de mecanismos comportamentais para manter sua normotermia, ou seja, que os frangos não se encontram em conforto térmico.

Com relação à bicagem agressiva, as aves do estudo não apresentaram incidência significativa deste comportamento, relacionado à condição de se estabelecer dominância ou um nível de hierarquia no grupo ou, ainda, pelas condições de estresse provocadas pelo módulo de produção, caracterizando-se por bicadas rápidas e fortes em locais como a crista e outras partes da cabeça (BARBOSA FILHO et al., 2007). O mesmo ocorreu para o comportamento de aquecimento, já que mesmo as aves criadas em temperatura fria, na primeira semana de criação, tiveram uma temperatura semelhante às criadas em temperatura termoneutra. A maior frequência de dissipação por calor aos 35 dias pelas aves criadas em ambas as temperaturas, indica que mesmo as aves criadas em temperatura fria estavam sob estresse por calor. Durante o estresse térmico, as aves alteraram seu comportamento para auxiliar na manutenção da temperatura corporal

e manter-se dentro de limites normais. Ajustes de comportamento podem ocorrer rapidamente e a um custo menor que os ajustes fisiológicos (PEREIRA et al., 2005).

5. Conclusões

Os frangos criados sob temperaturas fria e quente de criação apresentaram comportamentos característicos de estresse por frio e calor, indicando que alta temperatura de incubação associada ou não com AA não foram efetivos em diminuir ou evitar os efeitos do estresse térmico na criação.

6. Referências bibliográficas

- ALVES, M. de F. R. Comportamento de casais *Rhynchotus rufescens* em cativeiro: relação com imobilidade tônica e eficiência reprodutiva. 2012. 125f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. 2012.
- APPLEBY, M. C.; HUGHES, B. O. Welfare of laying hens in cages and alternative systems: environmental, physical and behavi-oral aspects. *World's Poultry Science Journal*, v.2, n.47, p.109-128, 1991.
- BARBOSA FILHO, J. A. D., SILVA, I. J. O.; SILVA, M. A. N.; SILVA, C. J. M. Avaliação dos comportamentos de aves poedeiras utilizando seqüência de imagens. *Engenharia Agrícola*, v. 27, n. 1, p. 93-99, 2007.
- BAREHAN, J. R. A comparison of the behaviour and production of laying hens in experimental and conventional battery cages. *Applied Animal Ethology*, v. 2, n. 2, p.291-303, 1976.
- BESSEI, W. Welfare of Broilers: A review. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, p. 455-466, 2006.
- BORGES, J. C; TRINDADE, J.; PICOLI, K. P.; BAADE, E. A. S. Comportamento de frangos de corte alojados em cama de maravalha e areia. *Anais da X FETEC Feira de Conhecimento Tecnológico e Científico*. 2009
- BRIGGS, G. M.; LUCKEY, T. D.; ELVENJEM, C. A.; HART, E. B. Effect of ascorbic acid on chickes growth, when added to purified rations. *Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine*, v. 55, p. 111-115, 1994.

- COELHO, M. B.; McNAUGHTON, J. L. Effect of composite vitamin supplementation on broilers Journal Applied Poultry Research, v.4, n.2, p.219–229. 1995.
- EL-BOUSHY, A. R. Vitamin E affects viability, immune response of poultry. Feedstuffs, v. 60, n. 4, p.20-26, 1988.
- GHONIM, A. I. A.; AWAD, A. L.; FATTOUH, M. H. A.; EL-SHHAT, A. M. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. Egypt Poultry Science, v. 29, p. 1085-1099, 2009.
- HOGAN, J. A.; BOXEL, F. VAN. Casual factors controlling dustbathing in Burmese red Junglefowl: some results and a model. Animal Behaviour, v. 46, p. 627-635, 1993.
- KIDD, M. T. Nutritional modulation of immune function in broilers. Poultry Science, v. 83, p. 650- 657, 2004.
- MACARI, M. Água na avicultura industrial. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 128 p.
- MAHMOUD, K. Z.; EDENS, F. W.; EISEN, E. J.; HAVENSTEIN, G. B. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. Compative Biochemistry and Physiology, v. 137, p. 35–42, 2004.
- MILLER, L.; QURESHI, M. A. Introduction of heat shock proteins and phagocytic function of chicken macrophage following in vitro heat exposure. Veterinary Immunology Immunopathology, v. 37, n. 1, p. 34-42, 1991.
- MILTENBURG, G. Avicultura. Avicultura Profes., Bogotá, v.17, n.9, p.33-35, 1999.
- MOHAMMED, K. A.; EL-BOGHDADY, A.; SOLIMAN, M. A. H.; ABD AL-GALIL, M. A.; ABD AL-ALEEM, N. M. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. Egypt Poultry Science, v. 31, n. 2, p. 379-392, 2011.
- MOURA, D. J. Ambiência na avicultura de corte. In: Silva, I. J. O. Ambiência na produção de aves em clima tropical. Jaboticabal: SBEA, 2001. p.75-149.
- NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSTIANIAK, S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. Folia Biologica (Krakow), v. 60, p. 93-97, 2012.
- PEREIRA, D. F.; SALGADO, D. D.; NAAS, I. DE A.; CURTO, F. P. F.; MURAYAMA, M. C. Determinação de um padrão de uso de bebedouro em função da temperatura

- para matrizes pesadas. Revista Brasileira de Ciência Avícola, Campinas, Suplemento 4, p.79, 2002.
- PICOLI, K. P. Avaliação de sistemas de produção de frangos de corte no pasto. 2004. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- ROSA, O. S.; FIGUEIREDO, E. A. P.; BOMM, E. R.; BOFF, J. A. Efeito da temperatura e da duração do jejum pré-abate sobre indicadores de estresse em frangos abatidos aos 35 e 49 dias. Revista Brasileira de Ciência Avícola, Campinas, Suplemento 4. p.98, 2002.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.
- SAS Institute. SAS Proprietary Software Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2002.
- SELIM, S. A.; GAAFAR, K. M.; EL-BALLAL, S. S. Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. Emirates Journal of Food and Agriculture, v. 24, n. 3, p. 264-271, 2012.
- SEVEGNANI, K. B.; CARO, I. W.; PANDORFI, H.; SILVA, I. J. O.; MOU-RA, D. J. Zootecnia de precisão: análise de imagens no estudo do comportamento de frangos de corte em estresse térmico. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 9, n. 1, p. 115-119, 2005.
- SGAVIOLI S.; BORGES L. L.; ALMEIDA, DE V. R.; THIMOTHEO, M.; OLIVEIRA, DE J. A.; BOLELI, I. C. Egg Injection of Ascorbic Acid Stimulates Leucocytosis and Cell Proliferation in the Bursa of Fabricius International Journal of Poultry Science, v. 12, 2013a.
- SGAVIOLI, S.; ALMEIDA DE V. R.; PRAES, M. F. F. M.; VICENTINI, T. I.; MATOS JÚNIOR, J. B.; MORITA, V. DE S.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. C. Effects of Intra-Egg Injection of Vitamin C on the Eggshell Mineral Absorption, Embryo Mortality and Hematological Variables in Chicks at Hot Incubation Temperature. International Journal of Poultry Science, v. 12, 2013b.
- TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; MURRAY, E. Force feeding methodology and equipment for poultry. Poultry Science, v. 63, n. 4, p.573-575, 1984.

- THORNTON, P. A. Increased environmental temperature influences on ascorbic acid activity in the domestic fowl. *Federation Proceedings*. v. 20, p. 210, 1961.
- TZSCHENTKE, B. Attainment of thermoregulation and its influence by environmental factors. *Poultry Science*, v. 86, p.1025-1036, 2007.
- TZSCHENTKE, B.; PLAGEMANN, A.; Imprinting and critical periods in early development. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, p. 626-637, 2006.
- YAHAV, S.; SASSON, R. R.; SHINDER, D, The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. *Journal of Thermal Biology*. v. 29, p. 245–250, 2004.
- YALÇIN, S.; BAGDATLIOGLU, N.; BRUGGEMAN, V.; BABACANOGLU, E.; UYSAL, I.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; SIEGEL, P. B. Acclimation to heat during incubation. 2. Embryo composition and residual egg yolk sac fatty acid profiles in chicks. *Poultry Science*, v. 87, p. 1229–1236, 2008.
- YALÇIN, S.; OZKAN, S.; CABUK, M.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; SIEGEL, P. B. Pre- and post-natal conditioning induced thermotolerance on body weight, physiological responses, and relative asymmetry of broilers originating from young and old breeder flocks. *Poultry Science*, v. 84. p. 967–976, 2005.
- ZAKARIA, A. H.; AL-ANEZI, M. A. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality and the body weights of broiler chickens. *Poultry Science*, v. 75, p. 1204–1209, 1996.