

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INJEÇÃO DE COLECALCIFEROL *IN OVO* E ADIÇÃO DE
ALENDRONATO DE SÓDIO NA DIETA HÍDRICA PARA
FRANGOS DE CORTE**

Thays Cristina Oliveira de Quadros
Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INJEÇÃO DE COLECALCIFEROL *IN OVO* E ADIÇÃO DE
ALENDRONATO DE SÓDIO NA DIETA HÍDRICA PARA
FRANGOS DE CORTE**

Thays Cristina Oliveira de Quadros

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni

Coorientadora: Dra. Sarah Sgavioli

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

2016

Quadros, Thays Cristina Oliveira
Q1i Injeção de colecalciferol *in ovo* e adição de alendronato de sódio na dieta hídrica para frangos de corte / Thays Cristina Oliveira de Quadros. -- Jaboticabal, 2016
v, 58 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Silvana Martinez Baraldi Artoni

Banca examinadora: Otto Mack Junqueira, Lizandra Amoroso, Douglas Emygdio de Faria, Ricardo Albuquerque

Bibliografia

1. Aves de produção. 2. Bisfosfonato. 3. Nutrição *in ovo*. 4. Problemas locomotores. 5. Resíduo na carcaça. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.084:636.6

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INJEÇÃO DE COLECALCIFEROL *in ovo* E ADIÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO NA DIETA HÍDRICA PARA FRANGOS DE CORTE

AUTORA: THAYS CRISTINA OLIVEIRA DE QUADROS

ORIENTADORA: SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI

COORDENADORA: SARAH SGAVIOLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:



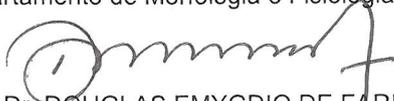
Profa. Dra. SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. OTTO MACK JUNQUEIRA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DOUGLAS EMYGDIO DE FARIA
Departamento de Zootecnia / FZEA / USP - Pirassununga/SP



Prof. Dr. RICARDO DE ALBUQUERQUE
Departamento de Nutrição e Produção Animal / FZEA / USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 05 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

THAYS CRISTINA OLIVEIRA DE QUADROS, solteira, nascida no dia 21 de janeiro de 1986, na cidade de Maringá – Paraná, filha de José Arlindo de Quadros e Neuza Silva Oliveira. Iniciou em março de 2004 o curso de Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá – Paraná, em dezembro de 2008 conclui a graduação, obtendo – se o título de Zootecnista. Em março de 2010 ingressou no curso de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), na Unesp - Campus Jaboticabal – São Paulo, obtendo o título de mestre em fevereiro de 2012, sob orientação professor Dr. Otto Mack Junqueira, no mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado na mesma Instituição, sob orientação da Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni. Durante o período do doutorado esteve por 10 meses na North Carolina State University, na cidade de Raleigh – Carolina do Norte – USA, com supervisão do Dr. Edgar Oviedo, participando do programa ciências sem fronteiras (doutorado sanduíche).

Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.

Martin Luther King

À minha amada mãe

Neuza

Meu exemplo de vida, de amor, de vontade em fazer sempre o bem, de nunca desistir de nossos sonhos, de sempre agir com o coração, de paciência, força e esperança. Apesar de todas as dificuldades da vida, de todos os momentos nem sempre bons e felizes, obrigada por todos os ensinamentos, por acreditar em mim e por estar sempre me apoiando.

Tudo de melhor que eu possa ser, todo meu amor e respeito... Amo você.

DEDICO

Ao meu primeiro amigo, meu irmão

Thiago

Por ser tão importante na minha vida, por me ajudar a ser uma pessoa melhor.
Obrigada por tudo que faz pela nossa família.

À minha avó

Geralda (*in memoriam*) pelo convívio na minha infância e por todas as demonstrações de carinho e amor em forma de um bom chazinho.

Ao meu tio

Wylis (Tio Vile)

Muito obrigada pelo carinho e amor de pai comigo, por criar em mim valores jamais esquecidos, por ser meu espelho, por ser o melhor homem que já conheci.

À minha tia

Maria (Tia Tuta)

A minha imensa gratidão, meu porto seguro, minha segunda mãe.

As minhas amigas de infância

Flávia e Isabela (THAFLAISA)

Não consigo me recordar da minha vida antes de ter vocês por perto. Sempre dentro do meu coração, Amo.

Aos meus melhores amigos

Luciana (Lola), Maristela (Cerca), Natália (Tirinha), Cynthia (Lontra), Alexandre (Frank)

Meus presentes de Deus. Com vocês tive o melhor aprendizado de vida que já pude ter, obrigada por me deixar fazer parte de suas vidas, vou levar vocês para onde quer que eu vá. Amo vocês.

À minha família de coração,

Ana Paula (Preta) e Giovani (Gordinho)

Sem palavras para agradecer e retribuir tudo que vocês fizeram e fazem por mim, nunca vou conseguir ser mais do que vocês são pra mim, sempre do meu lado nos dias de sol e nos nublados também, sempre enfrentando todas as dificuldades comigo, sempre dizendo que todo vai ficar bem. Gratidão! Amo vocês!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por estar sempre comigo, pela oportunidade de acordar todos os dias e tentar ser uma pessoa melhor, por fazer meus dias sempre de luz, mesmo diante das dificuldades.

Ao meu anjo da guarda e aos bons espíritos pela proteção, pela ajuda e auxílio em todos os caminhos percorridos até hoje.

Agradeço a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal e ao Programa de Pós – graduação em Zootecnia, pela oportunidade em participar o corpo discente desta instituição.

Agradeço o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por parte do auxílio durante todo o trabalho realizado e pelo financiamento de parte do doutorado nos Estados Unidos.

Agradeço também ao suporte financeiro da FAPESP que tornou possível a minha dedicação exclusiva às atividades de pós –graduação.

Meus agradecimentos a minha orientadora Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, pela amizade, pelo aprendizado, pela oportunidade que me concedeu de trabalharmos juntos, pelo exemplo de ser humano, por muitas vezes cuidar de mim como filha.

Ao prof. Dr. Otto Mack Junqueira que foi meu orientador no mestrado e deu início a minha vida na pós-graduação, gratidão por todo aprendizado, apoio e por sempre acreditar em mim.

A minha coorientadora Dra. Sarah Sgavioli, que teve grande contribuição no meu trabalho e por ter paciência em ensinar.

Aos membros da banca de qualificação e defesa.

A profa. Dra. Lizandra Amoroso e ao Dr. Douglas Emygio de Faria, pela valiosa contribuição no trabalho e amizade.

À minha mãe e aos meus tios (Maria, Wylis, Thiana, Margarida, Ivone e Aparecida) pelas demonstrações de amor, carinho, paciência, pelo cuidado comigo e por contribuírem na minha educação.

Agradeço ao meu amado irmão Thiago e aos meus primos pelo amor, carinho, dedicação e cuidado. Amo muito todos vocês.

A equipe de pesquisa: Giuiliana (Laka), Liliana (Anemia), Elaine (Tocha), Diana, João, Diodo (Farso), pelos momentos de descontração, risadas, companheirismo, e

por tornar possível o trabalho realizado, sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigada.

Aos amigos: Thiago (Strumi), Carol Dossi, Natalia Leitão, Mariana Piatto Berton, Greg, Milena Buzzo, Naiara Barreto, Kristie, Paulo (Charle), Victor (Charle), Anão (Rodolpho), Bá (Thiago), Mú (Murillo), Gordão (Luiz Gustavo), Cerca (Maristela), Lontra (Cynthia), Muraka (André), pela amizade, carinho, risadas e por cada momento tão especial que passamos juntos.

SUMÁRIO

INJEÇÃO DE COLECALCIFEROL <i>IN OVO</i> E ADIÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO NA DIETA HÍDRICA PARA FRANGOS DE CORTE.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Problemas locomotores.....	4
Nutrição <i>in ovo</i>	5
Colecalciferol (Vitamina D3).....	7
Alendronato de sódio.....	8
4. REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2 - NUTRIÇÃO <i>IN OVO</i> COM VITAMINA D3 INFLUÊNCIA A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DE PINTOS PÓS-ECLOSÃO E PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO.....	15
RESUMO.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Delineamento experimental.....	18
Características avaliadas.....	18
Perda de massa de ovo, eclodibilidade e mortalidade embrionária.....	18
Teor de cinzas e composição mineral dos ossos.....	19
Resistência óssea.....	19
Densidade mineral óssea.....	19
Análise estatística.....	19
RESULTADOS.....	20
Teor de cinzas e composição mineral dos ossos.....	21
Resistência óssea.....	23
Densidade mineral óssea.....	23
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

CAPÍTULO 3 – NUTRIÇÃO <i>IN OVO</i> COM VITAMINA D3 ASSOCIADA À DIETA HÍDRICA CONTENDO ALENDRONATO DE SÓDIO INFLUENCIAM A BIOMETRIA PANCREÁTICA E O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE	30
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Características avaliadas	35
Desempenho	35
Rendimento de carcaça	36
Qualidade de carne	36
Composição, densidade e área mineral óssea	37
Características sanguíneas.....	37
Biometria de órgãos	37
Análises estatísticas	37
RESULTADOS	38
Rendimento de carcaça e partes e qualidade de carne	46
Densitometria óssea.....	48
Características sanguíneas e biometria de órgãos	48
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	55

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 021889/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da injeção de calciferol na incubação sobre o desenvolvimento ósseo e do alendronato de sódio sobre o desempenho, características morfofisiológicas e qualidade da carne de frangos de corte na criação"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Silvana Martinez Baraldi Artoni está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

INJEÇÃO DE COLECALCIFEROL *IN OVO* E ADIÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO NA DIETA HÍDRICA PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO – Foram avaliados os efeitos da nutrição *in ovo* com vitamina D3 e da dieta hídrica contendo alendronato de sódio sobre o desenvolvimento ósseo e parâmetros zootécnicos. O experimento foi constituído de duas fases (incubação e criação). No período de incubação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (ovos não injetados, injetados somente com óleo de oliva, 1,2µg, 2,4 µg e 3,6 µg de vitamina D3 / 100 µL de óleo de oliva) de injeção de vitamina D3 em 600 ovos férteis de matrizes de frango de corte, favorecendo desafio para fase seguinte, ou seja, promovendo menor desenvolvimento embrionário ósseo, gerando o desafio para a fase de criação para testar os níveis de alendronato de sódio. Na fase de criação o delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (vitamina D3 durante o período de incubação e diferentes concentrações de AS no período de criação). A nutrição *in ovo* de vitamina D3 não afeta a eclodibilidade ($P>0,05$), no entanto, afeta de maneira negativa a densidade óssea de pintos pós-eclosão. O alendronato de sódio não apresentou dados significativos ($P>0,05$) para parâmetros de desenvolvimento ósseo. Portanto, conclui-se que se tornam necessárias novas pesquisas a fim de determinar níveis ideais deste fármaco com o intuito de melhorar a condição óssea de frangos de corte.

PALAVRAS – CHAVE: aves de produção, bisfosfonato, nutrição *in ovo*, problemas locomotores, resíduo na carcaça.

INJECTION OF COLECALCIFEROL *IN OVO* AND ADDITION OF SODIUM ALENDRONATE IN DIET WATER FOR BROILER

ABSTRACT – The effects of nutrition *in ovo* with vitamin D3 and hydro diet containing sodium alendronate on bone development and performance parameters were evaluated on this study. The experiment consisted in two stages (hatching and growing). The incubation period and the experimental design was completely randomized with five treatments (not injected eggs; injected only with olive oil; 1.2µg; 2.4 µg and 3.6 µg of vitamin D3 / 100 µL of olive oil) injection of vitamin D3 in 600 fertile eggs of matrices broilers, favoring a challenge to the next stage, ie, a lower bone promoting embryonic development, generating a challenge for the growing phase to test the levels of AS. The stage of growing design was completely randomized in a factorial 2 x 5 (vitamin D3 during the incubation period and different concentrations of AS in the growing period). The vitamin D3 nutrition in egg hatchability did not affect ($P > 0.05$), however, negatively affected the bone densitometry post-hatch chicks, as the sodium alendronate showed no significant data ($P > 0.05$) for bone development parameters. However, it is concluded that further studies are necessary to determine the levels of this drug in order to improve the bone condition of broilers.

KEYWORDS: production of broilers, bisphosphonate, nutrition *in ovo*, leg problems, residue on the carcass.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O grande crescimento da avicultura industrial veio acompanhado de maiores exigências do mercado consumidor internacional, no que tange aos padrões de qualidade e segurança alimentar, associados à preservação ambiental e bem-estar animal (NÄÄS, 2008). Desta forma, o aumento da produtividade deve estar alinhado às melhorias no conforto do animal e à sustentabilidade ambiental.

Para atender à crescente demanda do consumo da carne de frango, a avicultura vem mostrando maior produtividade e grande parte desta evolução é resultado da junção de fatores como melhoramento genético e manejo nutricional, que buscam constantes avanços no desempenho do frango de corte. Havenstein et al. (2003) observaram a evolução deste desempenho nas últimas décadas evidenciando aumento no peso vivo, melhora na conversão alimentar, redução da mortalidade e redução na idade ao abate. Esta evolução no desempenho ocorre principalmente para ganho de massa muscular, que é o principal parâmetro observado no desenvolvimento dos frangos de corte. No entanto, o elevado desenvolvimento de massa muscular deve ser assegurado, paralelamente, a um esqueleto bem desenvolvido e bem estruturado que suporta o crescimento da ave sem que haja danos em sua locomoção.

Sendo assim, um fator impactante no setor que vem gerando preocupação, decorrente dos prejuízos causados, são as afecções no tecido ósseo que acometem frangos de corte de crescimento acelerado. As afecções do tecido ósseo têm contribuído para a redução na produtividade em função do aumento de condenações de carcaças inteiras (ALVES, 2013).

As enfermidades do tecido ósseo são responsáveis por perdas relevantes na avicultura de corte mundial. Pesquisas feitas por Júnior et. al., (2009) estimaram que estes transtornos do esqueleto das aves resulta em taxas de mortalidade entre 2 a 8% em frangos de corte, sendo que a incidência ocorre com mais frequência em machos, pois estes têm um desempenho maior, quando comparados às fêmeas.

Dentre as enfermidades, a discondroplasia tibial (DT) é uma anormalidade metabólica de frangos de corte em crescimento causada pela formação de uma massa anormal de cartilagem não vascularizada, pouco mineralizada na metáfise da extremidade proximal da tíbia. Há persistência da cartilagem pré-hipertrófica que não foi invadida pelos vasos da metáfise e que não sofreu calcificação, ou uma assincronia na diferenciação dos condrócitos, ocasionando uma camada de condrócitos pré-hipertróficos e de uma cartilagem na tíbia proximal não calcificada e resistente à invasão vascular, que se estende distalmente na placa de crescimento da metáfise proximal da tíbia e ocasionalmente, na metáfise distal e proximal do tarsometatarso e proximal do fêmur e úmero (PONSO et al. 2012).

Sabe-se que o colecalciferol (vitamina D3) tem como função biológica atuar no metabolismo ósseo, e é diretamente responsável pelo crescimento esquelético que fornece suporte para que as aves possam obter o seu máximo desempenho produtivo, sobretudo regula o metabolismo do cálcio, ou seja, a calcificação óssea (BRITO et al. 2010). Além disso, o conteúdo de vitamina D3 no ovo é fundamental para o metabolismo do cálcio que ocorre no embrião em desenvolvimento (BETHKE et al., 1936).

Já o alendronato de sódio (AS) é um princípio ativo amino bisfosfonato que atua como inibidor específico da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (BATISTUZZO et al. 2000). Os bifosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato e apresentam elevada afinidade pelos cristais de hidroxiapatita, expostos nas superfícies ativas de reabsorção e aposição mineral nos ossos. O fármaco apresenta efeito final no tecido ósseo, que se traduz por inibição da reabsorção óssea com redução da frequência de ativação das unidades de remodelação (osteoclástica), como a profundidade dos sítios de reabsorção. Assim o equilíbrio mineral se torna positivo e aumenta a massa óssea. A estrutura química do AS é responsável por sua ósteo-seletividade (ANDRADE, 2012). Portanto, o AS aumenta a massa esquelética total, tanto na coluna vertebral como no colo do fêmur, nos quadris e no terço distal do rádio.

Alguns estudos com humanos mostram a evidência da prevenção de fraturas vertebrais e não vertebrais com o uso de alendronato e risedronato (MEUNIER, 1999; AACE, 2001; CRANNEY, 2003). No entanto, este fármaco

ainda não foi testado em frangos de corte, aumentando o estímulo de pesquisa nesta área.

Esses dados originaram as questões: se pintainhos oriundos de ovos injetados com calciferol e submetidos a posterior manejo alimentar com rações contendo AS, apresentariam melhor desempenho e desenvolvimento ósseo que os pintainhos oriundos de incubação sem injeção de calciferol e sem suplementação de AS na criação.

Considerando-se, que já existem procedimentos que permitem a inoculação massiva *in ovo* de vacinas sem causar prejuízo ao desenvolvimento embrionário, acredita-se que a suplementação exógena de embriões de frangos de corte possa ser realizada utilizando-se a mesma técnica.

Se a vitamina D atua na absorção de cálcio e o AS como inibidor da reabsorção óssea, é possível que a injeção de vitamina D3 *in ovo* durante a incubação, em conjunto com o fornecimento de água durante a criação com AS, resulte na formação de pintainhos com melhor desenvolvimento ósseo e posteriormente frangos com menor incidência de problemas de perna durante sua criação.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar o uso de vitamina D3 na incubação e posteriormente à administração de alendronato de sódio (AS) nas diferentes fases de criação seja eficaz quanto à melhora na qualidade de pintos na eclosão e no desempenho dos frangos de corte, durante o período de criação, principalmente com relação ao desenvolvimento ósseo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da nutrição *in ovo* de vitamina D3 na incubação e a administração de alendronato de sódio (AS) nas diferentes fases de criação, sobre a qualidade de pintos na eclosão e no desempenho, bem como o desenvolvimento ósseo dos frangos de corte até os 42 dias de idade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Problemas locomotores

Na avicultura, a locomoção dos frangos é essencial, pois tem um papel central no desempenho produtivo da ave. Associado aos problemas de locomoção tem-se causas infecciosas e não infecciosas, que afetam a “saúde” do membro pélvico das aves (OVIEDO-RONDÓN, 2009a). Estatísticas atuais sugerem que, rejeições totais ou parciais de carcaça, devido a problemas de perna, aumentam significativamente o custo por quilograma de peso vivo do frango (OVIEDO-RONDÓN, 2009b).

Sendo assim, um dos problemas mais graves na produção de frangos de corte é a alta incidência de distúrbios locomotores, que comprometem a mobilidade e levam a ave à claudicação (EUROPEAN COMMISSION, 2000). Aves com claudicações podem apresentar perdas na produção total. Pesquisas apontam que cerca de 10 a 40% do lucro bruto por lote, é perdido devido a problemas locomotores nas aves, que tem sua carcaça condenada completamente ou em partes, assim que chegam ao abatedouro (COOK, 2000).

As afecções ósseas resultam em diminuição do bem-estar das aves, uma vez que prejudicam o deslocamento destas para alimentar-se (PAZ et al., 2009). Os lotes avícolas que apresentam elevados percentuais de lesões locomotoras induzem a população concluir que os animais foram produzidos sem condições de bem-estar animal (MENDES et al., 2012).

Dentre as deformidades ósseas, destacam-se a discondroplasia tibial (DT), que acomete aves na fase inicial de crescimento e os problemas estruturais, que levam as deformidades e distorções dos ossos longos, sobretudo na fase final de crescimento (BARBOSA et al., 2010).

A discondroplasia tibial é caracterizada por uma massa cartilaginosa anormal, observada na extremidade proximal da tíbia, no entanto pode acometer outros ossos, como o fêmur e o úmero (LILBURN et al., 1989). Essa massa apresenta-se opaca, de tamanho variável e resistente à invasão vascular, sendo não mineralizada devido à incompleta diferenciação dos

condrócitos transitórios (MENDONÇA JÚNIOR, 2009; THORP et al., 1997; BAINS, 1994). As aves que não são afetadas com severidade aparentemente se recuperam ao longo da criação, porém, o desempenho do lote no final do período é prejudicado (GONZALES & MACARI, 2000). Os sinais clínicos de aves acometidas pela enfermidade são comumente ataxia, dificuldade para se mover, deformidade óssea e claudicação (WALDENSTEDT, 2006). Em casos mais severos os animais morrem devido à desidratação por não conseguirem caminhar e apresentam alto índice de fraturas ósseas (VELLEMAN, 2000).

Gonzales & Mendonça JR (2006) relataram que a discondroplasia em frangos pode envolver a cartilagem de conjugação, mas ocorre mais frequentemente na parte proximal da tíbia. Normalmente a discondroplasia é bilateral e esse distúrbio aparece frequentemente entre a 3ª e 8ª semanas de vida do frango, sendo os machos mais suscetíveis que as fêmeas.

A frequência de discondroplasia tibial anomalia acomete cerca de 2 % a 20 % dos lotes experimentais e comerciais (ALMEIDA PAZ, 2008; ALMEIDA PAZ et al., 2005) em animais com aproximadamente três a cinco semanas de idade (MENDONÇA JÚNIOR, 2009).

Nutrição *in ovo*

O período de incubação representa 30 % da vida de um frango de corte programado para ser abatido aos 42 dias de idade. Assim, a fase embrionária é de grande importância considerando a parcela que esta fase representa no período produtivo da ave (GONÇALVES et al. 2013). No 17º dia de incubação, o embrião começa a ingerir o líquido amniótico (UNI et al., 2003 a) e as substâncias presentes também são ingeridas. Além disso, é sabido que o embrião possui enzimas digestivas (SKLAN et al., 2003) que tornam possível a nutrição na fase pré-eclosão. O embrião pode consumir naturalmente nutrientes pela via oral antes de nascer (FERKET e UNI, 2006).

Conhecendo a capacidade digestiva de frangos de corte ainda na fase embrionária, a técnica de vacinação *in ovo* está se tornando uma alternativa cada vez mais utilizada. Este sistema permite que a vacinação inicial de imunização dos futuros pintos seja eficaz sem afetar o desenvolvimento dos embriões ou taxa de eclosão (OHTA et al., 2001). A nutrição *in ovo* consiste no

fornecimento de nutrientes para o pinto durante o seu desenvolvimento embrionário, com a finalidade de aumentar o estado nutricional do embrião, além de permitir a introdução de nutrientes específicos em contato com as células do intestino, antes mesmo da eclosão, melhorando, assim, a capacidade de digerir alimentos pelo neonato. Como essa técnica é recente, pouco se sabe acerca das quantidades e dos tipos de nutrientes que podem ser utilizados na nutrição do embrião. Muitas vezes, os níveis e a composição dos nutrientes inoculados *in ovo* são omitidos (UNI et al., 2004).

Então, a nutrição *in ovo* é uma prática que consiste na inoculação de nutrientes no líquido amniótico por meio de uma seringa (LEITÃO et al., 2005), com finalidade de aumentar o estado nutricional do embrião, o que reflete em maior eficiência digestiva redução da mortalidade e da morbidez pós-eclosão e melhor desenvolvimento do sistema imunológico (UNI et al., 2004). No entanto, as respostas positivas não dependem somente da composição da solução, mas também do volume e osmolaridade da solução injetada no âmnio (FERKET et al, 2005). Em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar desequilíbrio osmótico resultando na morte do embrião. A osmolaridade de soluções nutritivas a serem inoculadas *in ovo* a base de carboidratos deve ser mantida entre 400 a 650 mOsm, tendo como limite 800 mOsm (FERKET et al., 2005), para não ocorrer desequilíbrio.

Alguns trabalhos publicados em nutrição *in ovo*, relatam a inocularam uma mistura de aminoácidos idêntica à composição encontrada no ovo em ovos embrionados em desenvolvimento, obtendo maior peso corporal no nascimento e aos 56 dias de idade de frangos de corte (AL-MURRANI, 1982). Otha *et al.* (1999) não observaram efeitos significativos ao inocularem um *pool* de aminoácidos em ovos embrionados de frangos de corte, sugerindo que o conteúdo de aminoácidos presentes no ovo é suficiente para o desenvolvimento embrionário.

Sunde et al. (1978) melhoraram a eclodibilidade de ovos fertilizados com injeção *in ovo* de 25 D3 (OH) antes da incubação, Gonzales et al. (2013) testaram injeção de vitamina D no desempenho de frangos de corte e Bello et al. (2015) observaram taxa de cálcio na gema de machos e fêmeas oriundos de ovos injetados com 0,60 µg de 25 (OH) D3.

Colecalciferol (Vitamina D3)

O colecalciferol (vitamina D3) tem como função biológica atuar no metabolismo ósseo, e é diretamente responsável pelo crescimento esquelético que fornece suporte para que as aves possam obter o seu máximo desempenho produtivo, sobretudo regula o metabolismo do cálcio, ou seja, a calcificação óssea (BRITO et al. 2010). Segundo Perry (1991), a suplementação adequada desta vitamina na alimentação pode ser útil para facilitar a absorção de cálcio.

A principal função da vitamina D é melhorar a absorção intestinal e a mobilização, retenção e deposição de cálcio e fósforo nos ossos. A vitamina D eleva os níveis de cálcio e fósforo no plasma de modo que se possam efetuar com naturalidade os processos de mineralização nos ossos (MCDOWELL, 1989).

A vitamina D é uma molécula semelhante aos esteroides, denominadas seco-esteroides, em função da presença do núcleo peridrosciclopentanofenantreno, que por sua vez é composto por quatro anéis (ABCD) fundidos (NORMAN, 1987). Ocorrem principalmente sob duas formas: o ergocalciferol ou vitamina D2, sintetizada na epiderme pela ação da radiação ultravioleta da luz solar (comprimento de onda de 290 a 315 nm) sobre o esteroide vegetal ergosterol, independente de catálise enzimática e o colecalciferol ou vitamina D3, a partir do colesterol (BARRAL et al., 2007). A vitamina D pode ser obtida pela alimentação ou ser produzida pelo organismo, desde que haja luz suficiente, 11 a 45 minutos/dia para frangos de corte (PIZAURO JÚNIOR et al., 2002).

A ação clássica da vitamina D3 é a regulação do metabolismo do cálcio e fósforo por meio do controle dos processos de absorção intestinal e reabsorção renal dos íons $1,25(OH)_2D$, mantendo-os em concentrações plasmáticas suficientes para assegurar a adequada mineralização e o crescimento ósseo e saúde óssea global em todas as etapas da vida (CASTRO, 2011).

Com a suplementação de vitamina D ocorre a diminuição da incidência de doenças ósseas, pois a vitamina D é envolvida em vários processos

fisiológicos, incluindo a absorção de cálcio e fósforo, a mineralização óssea e mobilização (KASIM et al., 2006). No corpo, vitamina D é necessária para a absorção de cálcio e fósforo no intestino, aumentando a sua utilização eficiência e, conseqüentemente, aumentando a densidade óssea (GARCIA et al., 2012).

Fritts e Waldroup (2003), concluíram que nutrição *in ovo* com vitamina D3 e 25-OH-D3 deram origem a animais com maior desenvolvimento dos ossos. Também foi possível verificar que o desenvolvimento era significativamente maior nos animais suplementados com 25-OH-D3.

É sabido também que a vitamina D presente na gema do ovo é metabolizada pelo embrião para ser utilizada na formação do esqueleto da ave. A membrana que envolve a gema do ovo, também é afetada pelos níveis de vitamina D, facilitando posteriormente a eclosão da ave, no entanto esta depende também de outros fatores (SELL, 1994).

Nilipour (2006) constatou que a administração de vitamina D injetada in ovo aos 18 dias de incubação, melhorou a eclodibilidade, o peso dos pintos e a conversão alimentar dos frangos.

Em um estudo, a injeção *in ovo* de 25 (OH) D3 foi relatada sem ter efeitos prejudiciais na qualidade de eclodibilidade (BELLO et al., 2013). Além disso, a injeção in ovo de até 1,20 g de 25 (OH) D3 não afetou a sobrevivência ou o desempenho geral do pós-nascimento de pintos, incluindo ganho de peso vivo, de frangos de corte (BELLO et al., 2014). Supõe-se que *in ovo* administração de 25 (OH) D3 em diluente comercial no 18º de incubação pode ser capaz de melhorar o desenvolvimento ósseo pós-nascimento em frangos de corte. Além disso, Bello et al., (2013) sugeriram que a administração de 25 (OH) D3 por injeção in ovo pode ser muito mais eficaz do que a sua utilização como um suplemento dietético.

Alendronato de sódio

O alendronato de sódio (AS) é um princípio ativo amino bisfosfonato que atua como inibidor específico da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (BATISTUZZO et al. 2000). Possui em sua estrutura um grupo amino que confere maior eficácia em relação a outras drogas da outra categoria; trata-se de um inibidor específico não hormonal da reabsorção óssea mediada por

osteoclastos, não alterando sua formação nem mineralização óssea (SWEETMAN et al., 2005).

Sabe-se que o osso é o principal órgão envolvido na sustentação do organismo e é constituído por uma matriz formada de vários componentes (entre eles cálcio, fosfato e fibras colágenas), que conferem rigidez e certa maleabilidade a este tecido. Assim como outros tecidos do corpo, o osso se mantém em constante renovação, possuindo células como os osteoblastos, responsáveis pela síntese e deposição de material protéico na matriz, e os osteoclastos, os quais secretam enzimas e substâncias ácidas, que digerem a matriz e determinam sua reabsorção. Quando o equilíbrio do processo de renovação óssea é afetado, a estrutura dos ossos pode ser prejudicada, resultando no aparecimento de doenças. Sabendo que o alendronato de sódio é um potente inibidor específico da reabsorção óssea mediada por osteoclastos, e que o seu mecanismo de ação pode estar relacionado à capacidade de se fixarem na matriz óssea, sendo assimilado pelos osteoclastos e, em seguida, inibindo sua ação, o alendronato de sódio pode ser usado como fármaco na prevenção ou tratamentos de doenças ósseas (RIBEIRO e VOLPATO, 2005).

O AS pode estabelecer balanço ósseo positivo, constituindo progressivamente o osso histologicamente normal e aumentando a DMO (densidade mineral óssea). Estudos *in vitro* mostram que o Alendronato de Sódio atua principalmente unindo-se aos sítios de reabsorção óssea, sendo depois incorporado à matriz óssea na formação do osso normal, reduzindo assim a profundidade da cavidade de reabsorção. Este fármaco leva ao aumento da massa óssea até níveis normais, e ainda, não apresenta os efeitos colaterais característicos de outros agentes empregados na reabsorção óssea com estrógenos e calcitonina (SWEETMAN et al., 2005).

Os bisfosfonatos, como o alendronato por exemplo, são análogos sintéticos de pirofosfato caracterizados por ligações de P-C-P e são mais resistentes à hidrólise química e enzimática. Esses compostos exercem efeitos de inibição da reabsorção osteoclástica e inibição da mineralização óssea (FLEICH et al., 1970; MEYER, NANCOLLAS, 1973). A ligação de bisfosfonatos aos minerais do tecido ósseo leva à supressão da reabsorção óssea induzida

por osteoclastos, tendo uma ação direta mediada por osteoblastos com atividade antiabsortiva (SAHNI et al., 1993).

As propriedades deste fármaco ainda não estão totalmente esclarecidas quanto ao mecanismo de ação, o que se sabe é que devido a sua alta afinidade pela hidroxiapatita do osso, eles são rapidamente retirados da circulação sistêmica e local, aderindo-se superfície óssea (LIN, 1996), particularmente nos sítios de atividade osteoclástica. Alguns estudos revelam que os bisfosfonatos proporcionam múltiplas ações na hidroxiapatita. Inibem a precipitação de fosfato de cálcio, retardam a transformação da fase amorfa para a fase de cristalina da hidroxiapatita, inibem a agregação de cristais de hidroxiapatita e inibem sua dissolução (FRANCIS et al., 1969).

4. REFERÊNCIAS

AACE. American Association of Clinical Endocrinologists. 2001 Medical Guidelines for Clinical Practice for the Prevention and Management of Postmenopausal Osteoporosis. *Endocr Pract* 2001; 7(4):293. Disponível em URL: <http://www.medsaia.hpg.ig.com.br?osteoporosis2001>

AL-MURRANI, W.K. 1982. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. *Br Poult Sci*, 23: 171-174.

ALMEIDA PAZ, I.C.L. Problemas locomotores e técnicas de mensuração. Pages 128-137 in **Conferência APINCO 2008** de Ciência e Tecnologia Avícolas.FACTA, Santos, SP, Brasil.

ALVES, M. C. F., Condição de equilíbrio e problemas locomotores em frangos de corte. Dourados, MS: - UFGD, 2013. 75p. Dissertação (Mestrado).

ANDRADE, J. 2012. <http://www.bulas.med.br/bula/4985/endronax.htm> ACESSO EM 27 DE MAIO DE 2012.

BAINS, B.S., BRAKE, J.T., PARDUE, S.L.Reducing leg weakness in commercial broilers.*World Poultry Science*, Wageningen, v.14, n.1,p.: 24-27, 1998.

BARBOSA, A.A.; MORAES, G.H.K.; TORRES, R.A.; REIS, D.T.; RODRIGUES, C.S. E MÜLLER, E.S. 2010. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. *R Bras Zootec*, 39: 772-778.

BARRAL, D.; BARROS, A.C. E ARAÚJO, R.P.C. 2007. Vitamina D: uma abordagem molecular. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 7: 309-315.

BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. Formulário Médico-Farmacêutico. Tecnopress, 2000.

BELLO, A., W. ZHAI, P. D. GERARD, AND E. D. PEEBLES. 2013. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. **Poult.Sci.** 92:2551–2559.

BELLO, A., W. ZHAI, P. D. GERARD, AND E. D. PEEBLES. 2014. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler post-hatch performance and carcass characteristics. **Poult. Sci.** 93:155–162.

BELLO, A., NASCIMENTO, M., PELIC. N., WOMACK, S. K., ZHAI, W., GERARD, P. D., AND PEEBLES, E. D. 2015. Effects of the in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the yolk and serum characteristics of male and female broiler embryos^{1,2}. **Poultry Science** 94:734–739.

BETHKE, R. M.; RECORD, P. R.; WILDER, O. H.; WILDER, C. H. Effect of different sources of vitamin D on the laying bird II. Storage of vitamin D in the egg and chick ad mineral composition of the mature embryo. **Poultry Science**, Savoy, Illinois, v. 15, p. 336 – 344, 1936.

BRITO, J. A. G.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES P. B.; LIMA, E. M. C.; MENEGHETTI, C. Efeito da vitamina D3 e 25-hidroxi-colecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2656-2663, 2010.

CASTRO, L. C. G. O sistema endócrino vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.55, n.8, p.566-575, 2011.

CRANNEY A. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *BMJ* [Periódico on-line] 2003;327:355-6. Disponível em URL: <http://bmj.bmjournals.com/cgi/content/full/327/7411/355>

COOK, M. E. Skeletal Deformities and Their Causes: Introduction. **Poultry Science**, 79: 982-984, 2000.

EUROPEAN COMMISSION. The welfare of chickens kept for meat production. Report of the Scienti@c Committee on Animal Health and Animal Welfare. 2000.

FERKET, P., UNI, Z. Early feeding – in ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: CONFERENCE EUROPEAN POULTRY 12th, Verona. Anais... **Conference European Poultry**, 2006 (CD-ROM).

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

FLEISCH, H.; RUSSEL. R.G.G.; BISAZ, S.; MUHLBAUER, R.C.; WILLIAMS, D.A. The inhibitory effect of diphosphonates on the formation of calcium phosphate crystal in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 1, p. 12-18, 1970.

FRANCIS, M.D., RUSSELL, R.G., FLEISCH, H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. **Science**. 1969. Sep 19; 165(899):1264-6.

FRITTS, C. A. and WALDROUP, P.W.; 2003; Effect of Source and Level of Vitamin D on Live Performance and Bone Development in Growing Broilers; **Journal Application of Poultry Research**; 12:45-52.

GARCIA, A.F.Q.M; MURAKAMI, A.E.; RODRIGUEIRO, B.R.J.; DUARTE, C.R.A.; EYNG, C.; PICOLI, K.P. Vitamin D3 and its Metabolites On Performance And Bone Quality Of Broiler Chickens. **World's Poultry Science Journal, Supplement 1**. WPC2012 - Salvador - Bahia - Brazil • August – 2012.

HAVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Growth, livability and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, v. 82, n. 10, p. 1500-1508, 2013.

JUNIOR, C.X. Deformidades das pernas em frangos de corte. **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**; 2009; Campinas, São Paulo. Brasil. p. 29-41.

KASIM S, BLAKE B.L, FAN X, et al. The role of dopamine receptors in the neurobehavioral syndrome provoked by activation of L-type calcium channels in rodents. *Developmental Neuroscience*. v.28, n.6, p.505-517, 2006.

KORVER, D. Research, analytical techniques and practical experiences using HyD™. In: **ARKANSAS NUTRITION CONFERENCE**, 2005, Arkansas. Proceedings... ,2005.

LEITÃO, R.A.; LENDRO, N.S.M.; PEDROSO, A.A. et al. Efeito da suplementação de glicose in ovo sobre o desempenho inicial de pintos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. suplemento, p.69, 2005.

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996. Feb; 18(2):75-85.

LILBURN MS, LAUTERIO TJ, NGIAM-RILLING K, SMITH JH. Relationships among mineral balance en the diet, early growth manipulation, and incidence of tibial dyschondroplasia in different strains of meat type chickens. **Poult Science** 1989 ;68(9):1263-73

MCDOWELL, LEE RUSSELL; 1989; **Vitamin in Animal Nutrition**; Academic Press, Inc.

MENDES, A.S.; PAIXÃO, S.J.; MAROSTEGA, J.; RESTELATTO, R.; OLIVEIRA, P.A.V. E POSSENTI, J.C. 2012. Mensuração de problemas locomotores e de lesões no coxim plantar em frangos de corte. **Arch Zootec**, 61: 217-228.

MENDONÇA JUNIOR C.X. Fisiopatologia do sistema locomotor. In: Berchieri Junior A, Silva EM, Di Fabio J, Sesti L, Zuanaze MAF. (2 Ed), **Doenças das Aves**. Campinas: 626 FACTA: 2009. p.175-190.

MEUNIER PJ. Evidence-based medicine and osteoporosis: a comparison of fracture risk reduction data from Osteoporosis randomised clinical trials (Structured Abstract). *Int J Clin Pract* [Periódico on-line] 1999; 53(2):122-9. Disponível em URL: <http://cochrane.bireme.br/cochrane/show.php>.

MEYER, J.L.; NANCOLLAS, G.H. The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxiapatite. **Calcif. Tissue Res.**, v. 13, p. 295-303, 1973.

NÄÄS I.A. Avanços de bem-estar na produção de frangos de corte. **6° Encontro Mercolab** 641 de Avicultura. Cascavel – PR, setembro 2008.

NILIPOUR, A. H. Influencia da alimentação das matrizes na qualidade dos pintos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2006, CAMPINAS. Anais.... Campinas:**Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia**, p 175 – 190, 2006.

NORMAN, A.W. 1987. Studies on the vitamin D endocrine system in the avian. *J Nutr*, 117: 797- 807.

OHTA, Y., KIDD, M. T., 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**, v. 80, p.1430–1436, 2001.

OVIEDO-RONDÓN E. “El Sistema de Producción Avícola de Carne : 1. El Modelo Americano” XXV Curso de Especialización FEDNA: **Avances En Nutrición Y Alimentación Animal**. Saragoza, 2009a, 12 p.

OVIEDO-RONDÓN E. “Aspectos Nutricionales que Influyen Sobre La Incidencia de Problemas de Patas En Pollos de Engorde”, XXV Curso de Especialización. 2009b, 15p.

PAZ, I.C.L.A.; MILBRADT, E.L.; MENDES, A.A.; VULCANO, L.C.; FERNANDES, M.R.; MARTINS, B.; KOMIYAMA, C.M.; CAVICHIOLO, F. E GARCIA, R.G. 2009. Densidade mineral óssea de perus de corte vacinados e não vacinados contra coccidiose.

PERRY, R. W.; ROWLAND, G. N.; FOUTZ, T. L., GLISSON, J.R. Poultry malabsorption syndrome. III. Skeletal lesions inmarket age turkeys. **Avian Diseases**, v. 35, n. 4, p. 707 – 713, 1991.

PIZAURO JÚNIOR, J.M.; CIANCAGLINI, P. E MACARI, M. 2002. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Rev Bras Cienc Avic**, 4: 169- 185.

PONSO, R.; FARIA, D.E.; ALBUQUERQUE, R.; PAZ,I.C.L.A 1; ARTONI, S.M.B; SANTOS,A.L.; SAVIANI,G.3; ARAÚJO,C.M.M. Avaliação do desenvolvimento da discondroplasia tibial em frangos de corte submetidos à dieta com 25 hidroxicolecalciferol. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 153-161, 2012.

RIBEIRO, A. F.; VOLPATO, N. M. Alendronato de sódio: Metodologias para análise quantitativa. **Quim. Nova**, Vol. 28, Número 5, 852-858, 2005.

SAHNI, M.; GUENTHER, H.L.; FLEISCH, H.; MARTIN, T.J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2004-2011, 1993.

SKLAN, D.; GEYRA, A.; TAKO, E. et al. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v.89, n.6, p.747- 753, 2003.

SELL, JERRY L. Nutrient Requirements of Poultry. 9 Revised Edition. National Academy Press, 1994. 176p.

SUNDE, M.L.; TURK, C.M.; DeLUCA, H.F.; The essentiality of vitamin D metabolites for embryonic chick development. *Science*, Washington, DC v.20 n.4345, p. 1067-1069, 1978.

SWEETMAN, S.C; et al; MARTINDALE – Guia Completo de Consulta farmacoterapeutica. Barcelona. 2ª Ed. 2005.

THORP BH, DICK L, ZEFFERIES D, HOUSTON B, WILSON J. An assessment of the efficacy of the lixoscope for the detection of tibial dyschondroplasia. **Avian Pathology** 1997. 26:97- 694 104.

UNI, Z., TAKO, E. GAL-GARBER, O., SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late –term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003 a.

UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 11, p.101-111, 2004.

CAPÍTULO 2 - NUTRIÇÃO *IN OVO* COM VITAMINA D3 INFLUÊNCIA A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DE PINTOS PÓS-ECLOSÃO E PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO

RESUMO. Foram avaliados os efeitos da nutrição *in ovo* de vitamina D3 sobre parâmetros de incubação e características ósseas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 600 ovos férteis de matrizes de frangos de corte da linhagem Cobb 500 distribuídos em cinco tratamentos, no oitavo dia de incubação: ovos não injetados (controle); ovos injetados com 100 µL de óleo de oliva; ovos injetados com 1,2; 2,4 e 3,6 µg de vitamina D/100 µL de óleo de oliva, totalizando 120 ovos por tratamento. Além da eclodibilidade, se avaliou a composição mineral, resistência e densitometria óssea das tíbias e fêmures dos pintos pós-eclosão. A eclodibilidade e a mortalidade embrionária não foram significativas ($P > 0,05$) de acordo com os tratamentos aplicados. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre as porcentagens de cálcio, fósforo e cinza no fêmur e na tíbia. Houve efeito da comparação entre o controle e os níveis, e efeito quadrático dos níveis para perda de massa dos ovos, onde foi maior para os ovos injetados, quando comparado ao controle e o nível de 2,21 µg foi estimado para minimizar a perda de massa dos ovos (11,6%). A densidade mineral óssea apresentou efeito da comparação entre o controle e os níveis ($P < 0,0001$), com maior densidade para o controle, além deste, ocorreu efeito quadrático e cúbico, para tíbia e o fêmur, com os níveis de 1,48 e 1,52 µg de vitamina D3 ideais para maximizar a densidade mineral óssea. Verificou-se que injeção *in ovo* de vitamina D3 no oitavo dia de incubação não afeta a eclodibilidade. No entanto, afeta a densidade mineral óssea de pintos pós-eclosão e a perda de massa dos ovos durante a incubação, sendo recomendado o nível de 2,21 µg de vitamina D3, para manter a perda de massa dentro do limite tolerado e os níveis de 1,48 e 1,52 µg de vitamina D3 para maximizar a densidade óssea da tíbia e do fêmur das aves pós-eclosão.

Palavras-chave: Colecalciferol, densidade mineral óssea, eclodibilidade, fêmur, tíbia.

INTRODUÇÃO

Problemas com desenvolvimento ósseo constituem fonte de prejuízos econômicos na indústria avícola pela dificuldade de locomoção, que resulta em queda no consumo de ração, e conseqüentemente na produtividade do lote (DIBNER et al., 2007). Os problemas locomotores estão relacionados com condenações e desclassificações de carcaças em abatedouros (BERNARDI, 2011). Pesquisas feitas por Júnior et al., (2009) constataram que transtornos do esqueleto das aves resultaram em taxas de mortalidade entre 2 a 8% em frangos de corte, sendo que a incidência maior ocorre em machos, pois estes têm desempenho maior, quando comparados às fêmeas.

Dentre os nutrientes investigados para minimizar transtornos do esqueleto, a vitamina D, que tem expressiva participação no metabolismo ósseo, sendo diretamente responsável pelo crescimento esquelético, vem sendo testada para obtenção do máximo desempenho produtivo (BRITO et al., 2010).

Fisiologicamente, a mineralização do osso inicia-se no 8º dia de incubação, pela solubilização do cálcio presente na gema (FREEMAN & VINCE, 1974). A inoculação *in ovo* de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durante a incubação melhora a eclosão, reverte alterações ósseas, aumentam a porcentagem de cálcio na gema de machos e fêmeas oriundos de ovos injetados com vitamina D, comprovando a relação existente entre mineralização óssea e injeção de vitamina D (SUNDE et al., 1978; NARBAITZ et al., 1987; CAMPOS, 2011; GONZALES et al., 2013; BELLO et al., 2015).

A nutrição *in ovo* então pode ser descrita como uma das formas de estimular o desenvolvimento precoce do trato gastrointestinal e garantir a presença de nutrientes altamente digestíveis antes e imediatamente logo após a eclosão (NOY & UNI, 2010). O intuito do uso da nutrição pré-alojamento (PEEBBLES et al., 2005; CAREGHI et al., 2005; PEDROSO et al., 2005) ou da nutrição *in ovo* (GRODZIK et al., 2013; LEITÃO et al., 2014) é melhorar o desenvolvimento do embrião no estágio final de incubação e garantir o fornecimento de nutrientes antes e após a eclosão (FOYE et al., 2006a), além de aumentar a eficiência alimentar (KORNASIO et al. 2011), melhorar a mineralização óssea (DE OLIVEIRA, 2007; YAIR et al. 2011), fortalecer o sistema imunológico (AZADEGAN MEHR et al., 2014) e estimular o

desenvolvimento das células envolvidas no processo digestivo nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-eclosão do pintinho (AGOSTINHO et al., 2014).

No entanto, são escassas na literatura informações sobre a eficácia da injeção *in ovo* de vitamina D3 no desenvolvimento ósseo de pintos pós-eclosão.

Considerando os procedimentos que permitem a inoculação *in ovo* de vacinas sem causar prejuízo ao desenvolvimento embrionário, acredita-se que a suplementação exógena de embriões de frangos de corte possa ser realizada utilizando-se a mesma técnica (SGAVIOLI et al. 2015).

A vitamina D atua no metabolismo de absorção de cálcio, sendo possível que a injeção de vitamina D3 *in ovo* durante a incubação, resulte na formação de pintos com melhor desenvolvimento ósseo e posteriormente frangos com menor incidência de problemas de perna durante sua criação.

Com bases nessas considerações, o objetivo do trabalho foi investigar efeitos da nutrição *in ovo* de vitamina D3, sobre parâmetros de incubação, teor de cinzas, composição mineral, densidade e força óssea em pintos pós-eclosão, sobretudo também o dia de injeção, uma vez que o presente trabalho sugere o 8º dia de inoculação, diferindo de outras pesquisas que relataram efeito na inoculação de substâncias *in ovo* ao 18º dia.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (protocolo de número 021889/13).

Os ovos para incubação Cobb500 foram obtidos de matrizes com 43 semanas de idade, de incubatório comercial, Globo Aves. O total de 600 ovos (67g±2g) foram pesados e distribuídos homogeneamente em incubadora experimental CASP- de fase única com capacidade de oito mil ovos, controle automático de temperatura a cada duas horas, e monitorização automática de umidade.

Foi utilizada a técnica de nutrição *in ovo*, que consiste no fornecimento de nutrientes para o pintinho durante o seu desenvolvimento embrionário, ou

seja, antes da eclosão, por meio de injeção *in ovo* (FOYE et al., 2006a) para inoculação da vitamina D3.

Após a limpeza do local com etanol a 70%, a casca foi perfurada perto da extremidade mais fina (na extremidade oposta da célula de ar) com uma agulha estéril (BD Ultra-Fine™), no 8º dia de incubação foi injetada 1 mL de solução de vitamina D diluída em óleo de oliva no saco vitelino, cerca de 6 mm de profundidade abaixo da casca. Sendo a vitamina D lipossolúvel, o óleo de oliva foi utilizado como diluente. Após a injeção, o orifício foi selado com uma etiqueta adesiva.

Os 600 ovos sendo 120 por cada tratamento, totalizando cinco tratamentos, foram distribuídos em bandejas de incubação na máquina. Ou seja, as bandejas continham todos os tratamentos. No momento de transferência os ovos foram individualizados em embalagens de “filó” para a identificação de acordo com cada tratamento.

Os ovos foram incubados por 504 horas, totalizando 21 dias de incubação. Neste período foi feito o monitoramento, bem como o ajuste de temperatura, umidade, viragem e renovação de ar para cada dia de incubação de acordo com o período de desenvolvimento do embrião. As médias de temperatura e umidade de todo o período foram de 99,42 °F e 86,27 °F respectivamente.

Delineamento experimental

Os ovos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos: ovos não injetados (controle); ovos injetados com 100 µL de óleo de oliva, ovos injetados com 1,2 µg de vitamina D (48UI), 2,4 µg de vitamina D (96 UI) e 3,6 µg de vitamina D (144 UI)/100 µL de óleo de oliva.

Características avaliadas

Perda de massa de ovo, eclodibilidade e mortalidade embrionária

Os ovos foram pesados individualmente antes da incubação e novamente no dia 19º de incubação, para calcular a porcentagem de perda de

peso. A eclodibilidade foi medida pela relação entre o número de pintos nascidos e o número de ovos férteis incubados (de acordo com o embriodiagnóstico). O embriodiagnóstico foi realizado por meio da quebra de todos os ovos não eclodidos, para definir a idade aproximada da morte do embrião e foi realizado depois de completado o nascimento. A mortalidade embrionária foi classificada em inicial (0-7 dias), intermediária (8-14 dias) e tardia (15-21 dias).

Para as características a seguir foram selecionadas aleatoriamente 10 aves de cada tratamento, estas foram abatidas por deslocamento cervical, para a retirada da tíbia e fêmur, desprovidos de tecido aderente.

Teor de cinzas e composição mineral dos ossos

O cálcio, fósforo e cinzas do fêmur e da tíbia direita foram mensurados no Laboratório de Tecnologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Jaboticabal, SP, de acordo com as metodologias descritas por Silva & Queiroz (2002), e expresso em porcentagem da matéria seca desengordurada.

Resistência óssea

O fêmur e a tíbia esquerda foram utilizados para os ensaios de resistência mecânica do osso (três pontos). Os testes foram realizados na máquina de ensaio universal 3000 EMIC® modelo DL (UMT). A carga foi aplicada a uma taxa de 5 mm/min, com força de 2000 N para determinar a força máxima admissível (F_{max}) do osso, quantidade de deformação (curva) causada pela F_{max} , e a rigidez óssea.

Densidade mineral óssea

A densidade mineral óssea - DMO (g / cm^2) foi avaliada no fêmur e na tíbia esquerda com dupla energia absorção de raios-X (DXA), calibrado pelo fabricante (DPX-Alpha, Lunar®), com *software* de pequenos animais.

Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste estudantizado (Cramer-von-Misses) e homogeneidade das variâncias (teste de

Levene). Após esses testes, os dados foram submetidos à análise de variância usando o procedimento GLM do programa de análise estatística SAS® (2002). As médias foram comparadas por contrastes ortogonais: contraste 1: controle versus níveis de vitamina D3, contraste 2: efeito linear para os níveis, contraste 3: efeito quadrático para os níveis e contraste 4: efeito cúbico para os níveis, com probabilidade de 5%. Para o teste de frequência (eclobilidade e mortalidade embrionária), realizou-se o teste qui-quadrado do programa SAS® (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS

Perda de massa dos ovos, eclobilidade e mortalidade embrionária

A injeção de vitamina D3 afetou a perda de massa dos ovos, houve efeito da comparação entre o controle e os níveis de injeção de vitamina D ($P < 0,05$), com menor perda de massa para o controle (11,25%), quando comparado com os tratamentos com injeção de vitamina D3 (12,10%). Além disso, houve efeito quadrático ($P < 0,05$) para os níveis de injeção ($PM = 0,3675x^2 - 1,6225x + 13,398$; $R^2 = 0,98$), de acordo com a derivada máxima, se estimou que o nível de 2,21 μg de vitamina D3, proporciona a menor perda de massa dos ovos (11,60%).

Para as frequências de eclobilidade e mortalidade embrionária não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 1).

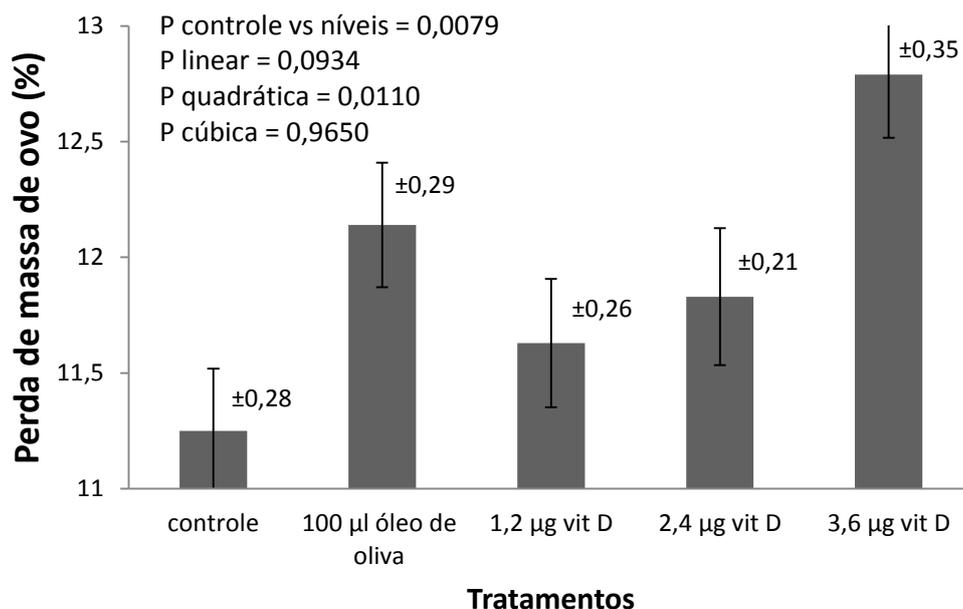


Figura 1. Porcentagem de perda de massa dos ovos para os tratamentos (ovos não injetados (controle), ovos injetados com 100 µL óleo de oliva, ovos injetados com 1,2 µg, 2,4 µg e 3,6 µg de vitamina D3/100 µL óleo de oliva).

Tabela 1 – Eclodibilidade e mortalidade embrionária de acordo com os tratamentos com.

Tratamentos	Eclodibilidade (%)	Mortalidade embrionária (%)	
		8-14 dias	15-21 dias
Controle	91,23	0,00	3,33
100 µl de óleo de oliva	87,18	0,00	5,83
1,2% de vit. D3	89,47	0,83	5,83
2,4% de vit. D3	86,84	0,00	7,50
3,6% de vit. D3	82,61	0,00	8,33
Probabilidade para o teste qui-quadrado			
P - value	0.2202	0.2873	0.2414

Seiscentos ovos férteis de frangos de corte linhagem Cobb500, foram submetidos ao tratamento de injeção ao 8º dia de incubação com vitamina D3 (VD), as médias foram comparadas utilizando teste de qui-quadrado a 5%.

Teor de cinzas e composição mineral dos ossos

Os valores encontrados para teor de cinzas, cálcio e fósforo da tíbia e do fêmur, não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de cinzas e a composição mineral óssea da tíbia e do fêmur de pintos recém-eclodidos de acordo com os tratamentos.

Tratamentos	Fêmur (g)	Cinza (%)	Ca (%)	P (%)	Tíbia (g)	Cinza (%)	Ca (%)	P (%)
Controle	0,062±0,03	29,59±0,41	11,92±0,33	6,28±0,17	0,097±0,08	29,18±0,60	11,08±0,19	5,77±0,12
0 µg de vit. D3	0,080±0,010	27,22±1,23	10,89±0,51	5,92±0,32	0,118±0,016	29,24±0,73	11,47±0,36	5,80±0,20
1,2 µg de vit. D3	0,080±0,009	28,98±0,70	11,90±0,52	6,03±0,30	0,116±0,013	28,77±0,58	10,91±0,27	5,77±0,17
2,4 µg de vit. D3	0,068±0,010	29,46±1,35	11,23±0,27	5,96±0,38	0,097±0,004	29,57±0,46	11,06±0,10	5,92±0,07
3,6 µg de vit. D3	0,069±0,008	28,68±0,58	11,40±0,27	6,42±0,15	0,097±0,005	29,44±0,73	10,82±0,38	6,04±0,21
CV%	28,46	7,59	8,10	10,78	24,25	4,00	5,84	6,45
Controle vs níveis	0,1951	0,3279	0,20149	0,7203	0,4003	0,6944	0,9717	0,5311
Linear níveis	0,2292	0,2562	0,6327	0,3106	0,0849	0,4864	0,1583	0,2463
Quadrática níveis	0,9288	0,1796	0,3122	0,5579	0,9558	0,3776	0,5655	0,6281
Cúbica níveis	0,4936	0,9935	0,1716	0,9849	0,4528	0,4889	0,3901	0,7814

Seiscentos ovos férteis de frangos de corte linhagem Cobb500, foram submetidos ao tratamento de injeção ao 8º dia de incubação com vitamina D3 (VD). Após eclosão foram coletadas de tíbia e fêmur. As médias analisadas utilizando modelos de regressão, probabilidade a 5%.

Resistência óssea

Não houve efeito ($P>0,05$) dos tratamentos sobre a resistência óssea para fêmur e tíbia para os contrastes analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Resistência óssea da tíbia e do fêmur de pintos recém-eclodidos de acordo com os tratamentos.

Tratamentos	Fêmur (N)	Tíbia (N)
Controle	12,92±1,40	9,42±0,86
0 µg de vit. D3	13,40±1,41	9,60±0,86
1,2 µg de vit. D3	14,09±1,42	10,03±0,87
2,4 µg de vit. D3	12,02±1,40	11,71±0,88
3,6 µg de vit. D3	13,73±1,42	11,25±0,86
CV%	26,28	20,51
Controle vs níveis	0,8071	0,2197
Linear níveis	0,8663	0,1010
Quadrática níveis	0,7242	0,6086
Cúbica níveis	0,3128	0,3910

Seiscentos ovos férteis de frangos de corte Cobb500, foram submetidos ao tratamento de injeção ao 8º dia de incubação com vitamina D3 (VD). Após eclosão foram coletadas de tíbia e fêmur. As médias analisadas utilizando modelos de regressão, probabilidade a 5%.

Densidade mineral óssea

Com relação à característica de densidade mineral óssea, tanto para a tíbia (0,860 e 0,790 mmAl) como para o fêmur (0,841 e 0,799 mmAl) houve efeito da comparação entre o controle e os níveis de vitamina D3, com maiores valores para o tratamento controle, quando comparado com os níveis de vitamina D3 (Tabela 4).

Tabela 4. Densidade mineral da tíbia e do fêmur de pintos recém-eclodidos.

Tratamento	Densidade tíbia (mmAl)	Densidade fêmur (mmAl)
Controle	0,836±0,002	0,841±0,001
0 µg de vit. D3	0,837±0,001	0,840±0,001
1,2 µg de vit. D3	0,806±0,005	0,813±0,006
2,4 µg de vit. D3	0,808±0,004	0,822±0,004
3,6 µg de vit. D3	0,707±0,005	0,719±0,003
CV%	1,18	1,07
Controle vs níveis	<0,0001	<0,0001
Linear níveis	<0,0001	<0,0001
Quadrática níveis	<0,0001	<0,0001
Cúbica níveis	<0,0001	<0,0001

Seiscentos ovos férteis de frangos de corte Cobb500, foram submetidos ao tratamento de injeção ao 8º dia de incubação com vitamina D3 (VD). Após eclosão foram coletadas de tíbia e fêmur. As médias analisadas utilizando modelos de regressão, probabilidade a 5%.

Ainda analisando a característica de densidade mineral óssea, os níveis de vitamina D3 utilizados demonstram efeito cúbico, tanto para densidade de tíbia (DMOT = $-0,0125x^3 + 0,0556x^2 - 0,0736x + 0,84$; $R^2 = 0,96$) quanto para densidade de fêmur (DMOF = $-0,0145x^3 + 0,066x^2 - 0,0833x + 0,84$; $R^2 = 0,98$). De acordo com a derivada máxima das equações, se estimou que maior densidade mineral óssea da tíbia e do fêmur pode ser obtida com injeção de 1,48 e 1,52 µg de vitamina D3, respectivamente.

DISCUSSÃO

A porcentagem de perda de massa até o momento da transferência é utilizado comercialmente para determinar o grau de desenvolvimento do embrião (SANTOS et al., 2009). 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 trabalho os dados demonstram que a injeção de 3,6 µg de vitamina D3 apresentou maior perda de massa dos ovos (12,53%), podendo causar uma menor eclodibilidade. No entanto, os demais tratamentos injetados com vitamina D3, tiveram perda de massa dos ovos dentro do limite aceitável para maximizar a eclodibilidade.

Semelhante ao estudo Laboissiere (2013) ao injetar *in ovo* níveis de 25(OH)D3 (vitamina D) no 18º dia de incubação não obtiveram diferença significativa para a eclodibilidade entre os ovos injetados ou não. Ipek et al.

(2004) não constataram efeito negativo sobre a eclodibilidade em razão da inoculação de soluções de glicose e ácido ascórbico na câmara de ar. Campos et al. (2007) inoculando solução de vitamina E não observaram redução na eclodibilidade quando comparado ao tratamento controle.

A integridade embrionária, bem como, os índices de eclodibilidade, estão ligados, ao local e período de inoculação. Tendo em vista os fatores que podem influenciar os índices de eclodibilidade, o presente estudo, determina que a injeção de vitamina D3 no 8º dia de incubação, não comprometeu o desenvolvimento do embrião, bem como a eclodibilidade dos mesmos. Sabe-se também que embriões de aves têm limitada capacidade de digestão e de absorção de nutrientes no período final de incubação, visto o baixo nível de enzimas e transportadores de glicose e de sódio na mucosa intestinal (UNI et al., 2003), podendo assim ser recomendado o 8º dia de incubação para a injeção.

Uni e Ferket (2003) recomendaram que nutrientes e moduladores entéricos fossem inoculados diretamente na cavidade alantóide, a fim de possibilitar a ingestão deste conteúdo pelo embrião, uma vez que estavam misturados ao líquido amniótico. Além disso, Uni & Ferket et al. (2003) sugeriram, que a osmolaridade de soluções nutritivas a serem utilizadas *in ovo*, deve ser mantida entre 400 e 650 mOsm, ou seja, altas concentrações das soluções injetadas podem interferir no equilíbrio osmótico e afetar o desenvolvimento do embrião, sendo o limite 800 mOsm. Confirmando assim, a não influencia da injeção de solução de vitamina D3 testada, sobre a eclodibilidade, uma vez que a osmolaridade (384 mOsm) do presente estudo foi inferior ao limite descrito por Ferket et al. (2005), indicando que não houve alteração no equilíbrio osmótico dos ovos.

No ovo, a forma ativa da vitamina D é fornecida ao embrião pela gema, atuando no metabolismo ósseo para a formação do esqueleto. Desta forma, a inoculação desta vitamina no período embrionário pode influenciar positivamente o crescimento ósseo nas primeiras semanas de vida da ave, visto que, nessa fase o metabolismo desse tecido é intenso e o não atendimento das necessidades nutricionais para esta função implicará em distúrbios de má formação óssea, comumente observados em lotes de frangos de corte (GONÇALVES et al., 2013). A concentração de cinzas na tíbia é,

muitas vezes, utilizada para estimar o grau de mineralização óssea de frangos de corte (SHASTAK et al., 2012). Neste estudo foi analisado o teor de cinzas no fêmur e na tíbia, porém, não foram relatadas diferenças entre os tratamentos para os níveis de vitamina D3 injetados e ovos não injetados, sendo condizente com Bello et al. (2014) que também não encontraram influencia da injeção *in ovo*, de diferentes concentrações de 25-hidroxicoilecalciferol sobre a composição mineral de tíbias de frangos Ross 708.

Apesar de não ter ocorrido diferenças para o teor de cinzas e composição mineral óssea, os dados do presente estudo demonstram influência da injeção de vitamina D3 sobre os parâmetros de densidade óssea, com maiores valores para a injeção de 1,48 e 1,52 µg de vitamina D. Sabe-se que a densidade mineral óssea (DMO) é considerada como um indicador de qualidade óssea. No entanto, somente a mineralização óssea não reflete a força de quebra e nem as propriedades mecânicas dos ossos (OVIÉDO-RONDÓN et al., 2006).

Valores crescentes de densidade mineral óssea nas fases inicial e de desenvolvimento de frangos de corte, foram encontrados por Barreiro et al. (2007), que afirmaram também que a alteração de valores densitométricos na tíbia está relacionada com a mineralização e com o aumento da resistência óssea que acompanha o desenvolvimento da massa muscular,.

CONCLUSÃO

A injeção *in ovo* de vitamina D3 no oitavo dia de incubação não afeta a eclodibilidade, tendo como os menores níveis de vitamina D3 os melhores resultados quanto à perda de massa de ovos de acordo com o recomendado, além de maximiza a densidade mineral óssea da tíbia e fêmur. Sendo assim, como conclusão é recomendada a nutrição endógena na incubação de frangos de corte o menor nível de vitamina D3 testado.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo número 2012/15365-1, 2012/21738-5. São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

BELLO, A., W. ZHAI, P. D. GERARD, AND E. D. PEEBLES. 2014. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler post-hatch performance and carcass characteristics. **Poultry Science** 93:155–162.

BELLO, A., NASCIMENTO, M., PELIC. N., WOMACK, S. K., ZHAI, W., GERARD, P. D., AND PEEBLES, E. D. 2015. Effects of the in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the yolk and serum characteristics of male and female broiler embryos^{1,2}. **Poultry Science** 94:734–739.

BERNARDI, R. Problemas Locomotores em Frango de Corte. Dourados (MS): UFGD. 62f. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Grande Dourados, 2011.

BRITO, J. A. G.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES P. B.; LIMA, E. M. C.; MENEGHETTI, C. Efeito da vitamina D3 e 25-hidroxicolecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2656-2663, 2010.

CAMPOS, A. M. A. Efeito da inoculação in ovo de soluções nutritivas sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Viçosa, MG: - UFV, 2007. 65p. Dissertação (Mestrado).

CAMPOS, A.M.A.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; SILVA, E.A.; ALBINO, L.F.T. E NOGUEIRA, E.T. 2011. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Rev Bras Zootecn**, 40: 1712- 1717.

DIBNER, J. J., J. D. RICHARDS, M. L. KITCHELL, AND M. A. QUIROZ. 2007. Metabolic challenges and early bone development. *J. Appl. Poult. Res.* 16:126–137.

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

FREEMAN, B. M., VINCE, M. A. Development of the Avian Embryo. A Behavioural and Physiological Study, Chapman and Hall, London, 1974.

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

LABOISSIÈRE, M. Parâmetros de incubação, desempenho e qualidade do esqueleto de frangos obtidos de embriões suplementados *in ovo* com 25-hidroxi-colecalciferol. Goiânia, GO – UFG, 2013. 130p. Tese (Doutorado).

NARBAITZ, R.; TSANG, C. P. W.; GRUNDER, A. A. Effects of vitamin D deficiency in the chicken embryo. *Calcified Tissue International*, Ottawa, Ontario, v. 40, p. 109 – 113, 1987.

OVIEDO-RONDÓN, E, FERKET P, HAVESTEIN G “Understanding long bone development in broilers and turkeys” *Avian and Poultry Biology Reviews*, v.17, n.3, p.77-88, 2006.

GONÇALVES, F.M; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L.; FARINA, G.; KREUZ, B.S.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A. e RUTZ, F. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Arch. Zootec.** 62 (R): 45-55. 2013.

ROMANOFF AL. Biochemistry and biophysics of the development hen's egg. *Memoirs of Cornell University Agricultural Experimental Station* 1930; 132:1-27.

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.

SAS INSTITUTE. SAS user's guide: statistics. Cary, 2002. 466p.

SGAVIOLI, S., BOLELI, I. C., GARCIA, R. G., Estresse por calor - Inovações na avicultura de corte. **Artigo técnico. Avicultura Industrial.** 2015.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos.* 3 ed. Viçosa:UFV, 2002. 235p.

SUNDE, M.L.; TURK, C.M.; DeLUCA, H.F.; The essentiality of vitamin D metabolites for embryonic chick development. *Science*, Washington, DC v.20 n.4345, p. 1067-1069, 1978.

SHASTAK, Y., M. WITZIG, K. HARTUNG, AND M. RODEHUTSCORD. 2012. Comparison of retention and prececal digestibility measurements in evaluating mineral phosphorus sources in broilers. **Poult. Sci.** 91:2201–2209.

UNI, Z., TAKO, E. GAL-GARBER, O., SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late –term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003 a.

UNI, Z. E FERKET, P.R. 2003. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. US Patent n° 6592878. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2002012436> (30/07/2014).

CAPÍTULO 3 – NUTRIÇÃO *IN OVO* COM VITAMINA D3 ASSOCIADA À DIETA HÍDRICA CONTENDO ALENDRONATO DE SÓDIO INFLUENCIAM A BIOMETRIA PANCREÁTICA E O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento ósseo e parâmetros zootécnicos em frangos de corte de 1 a 21 e de 22 a 42 dias de idade, oriundos de ovos injetados com vitamina D3 e suplementados com alendronato de sódio durante a fase de criação. Foram utilizados 1.200 pintos Cobb500[®] machos de um dia, provenientes de matrizes com 43 semanas de idade, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, resultando em 10 tratamentos com seis repetições de 20 aves cada. Os fatores estudados foram: nutrição *in ovo* (3,6µg de vit. D3/100 µL de óleo de oliva e não injetado) e níveis alendronato de sódio (0, 2, 4, 6 e 12mg/mL água). Foram avaliadas características morfológicas, zootécnicas e ósseas. Para aves oriundas de ovos injetados com vitamina D3, o nível de 12 mg de alendronato de sódio resultada em maior ($P<0,05$) ganho de peso de 1 a 21 dias de idade e maior consumo de ração, viabilidade criatória de 1 a 42 dias de idade. Aves oriundas de ovos íntegros níveis inferiores de alendronato de sódio também possuem relação positiva com o desempenho das aves. O peso e o comprimento do pâncreas possui correlação positiva ($P<0,05$) com o uso do alendronato de sódio, em ambos os tratamentos realizados durante a incubação. Existem interações entre o uso de nutrição *in ovo* com vitamina D3 e suplementação com AS durante a criação, as relações são dose-dependentes e variam de acordo com as características avaliadas. O AS influencia a biometria de pâncreas, o ganho de peso e consumo de ração, sendo específica de acordo com o tratamento utilizado durante a incubação. São necessárias novas pesquisas a fim de determinar níveis ideais deste fármaco com o intuito de melhorar a condição óssea de frangos de corte, em conjunto com a nutrição *in ovo* durante a incubação.

Palavras – chave: colecalciferol, densitometria óssea, desenvolvimento ósseo, luminosidade da carne, pâncreas.

INTRODUÇÃO

O elevado consumo de carne de frango, que corresponde a 30% do consumo mundial de carne (FAO, 2010), está ligado com o preço acessível e alto valor nutricional da carne (GARCIA et al. 2013).

Com o alto desempenho das aves, resultado de melhoramento genético e alimentação balanceada, o desenvolvimento ósseo não tem sido proporcional ao ganho de peso, os problemas locomotores em frangos de corte vêm causando alta mortalidade (GARCIA et al. 2013). A mortalidade por eliminação em função de problemas locomotores alcança índices de 3 a 6% das aves do lote, causando perdas econômicas expressivas (MENDONÇA, 2000).

Distúrbios ósseos estão entre as principais causas dos problemas locomotores de frangos de corte (BERNARDI, 2011). De maneira geral, a má formação óssea está relacionada com desordens no processo metabólico (NÄÄS *et al.*, 2012). Isso ocorre em linhagens com melhor desempenho produtivo e as mudanças na dieta, no manejo, ou nos dois pode diminuir a incidência do problema e as respectivas perdas.

A ocorrência das deformidades angulares, também chamadas de pernas tortas, está relacionada com a incompleta modelação e alinhamento do osso, em função do rápido crescimento da ave (ANGEL, 2007). Segundo Weeks et al. (2000) o grande desenvolvimento peitoral do frango de corte atual deslocou o seu centro de gravidade, influenciando negativamente a condição de equilíbrio e tornando a postura corporal das aves mais inclinadas, podendo agravar os problemas de coluna e comprometendo seu caminhar. A incidência de distúrbios locomotores afeta aproximadamente 6% de animais em lotes comerciais (ALMEIDA PAZ, 2008). Dentre as patogenias, a discondroplasia e a degeneração femoral são mais prevalentes, atingindo 50 a 80% dos problemas de perna nos lotes industriais de frangos de corte comerciais (BAINS *et al.*, 1998; MURAKAMI, 2002; ALMEIDA PAZ, 2008).

O rápido crescimento das aves interfere na deposição de peso, sobre os ossos que ainda não se encontram totalmente formados, portanto, não preparados para suportar esse peso. O resultado desta condição são as manifestações das enfermidades locomotoras, principalmente na metade final do período de criação do frango de corte (ALMEIDA PAZ *et al.*, 2009).

Suplementação alimentar com vitaminas e minerais, têm sido testadas com o intuito de melhorar o desenvolvimento ósseo e o bem-estar de frangos de corte, resultando em melhores valores zootécnicos. O colecalciferol (vitamina D) atua no metabolismo ósseo, e é responsável pelo crescimento esquelético, fornecendo suporte para que as aves possam obter máximo desempenho produtivo e sobretudo regula a calcificação óssea, além de facilitar a absorção de cálcio (BRITO et al. 2010). O conteúdo de colecalciferol também é fundamental no ovo para o metabolismo do cálcio que ocorre no embrião em desenvolvimento (BETHKE et al., 1936).

O alendronato de sódio (AS) tem sido utilizado em humanos para corrigir distúrbios ósseos tais como a osteoporose (BATISTUZZO et al. 2000). A estrutura química deste bisfosfonato tem forte afinidade com o fosfato de cálcio, o que facilita sua ligação ao osso e a inibição da reabsorção óssea (HADDAD et al. 2015) através da redução da frequência de ativação das unidades de remodelação (osteoclasto/osteoblasto). Assim, o equilíbrio mineral se torna positivo e aumenta a massa óssea e a massa esquelética total (ANDRADE, 2012). Apesar de seu uso comprovado em humanos, o AS ainda não foi utilizado aperfeiçoar a saúde óssea de frangos de corte.

Embora algumas publicações já tenham descrito a existência da nutrição com vitamina D (VD) *in ovo* com a eclodibilidade e desempenho de frangos (ONO e TUAN, 1991; IBRAHIM et al., 2012; BELLO et al., 2013; 2014) ainda faltam estudos sobre a eficácia da injeção de VD conjuntamente com o AS para corrigir desenvolvimento ósseo e assim contribuir para aprimorar o desempenho, desenvolvimento ósseo, qualidade da carne, rendimento de carcaça e conseqüentemente o bem estar destas aves.

Neste estudo investigou-se o efeito da nutrição de VD3 *in ovo* e a suplementação com AS durante a fase de crescimento no desenvolvimento ósseo, habilidade locomotora e índices zootécnicos de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental (n° 021889/13), do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Os ovos para incubação Cobb500 foram obtidos a partir de matrizes com 43 semanas de idade, de incubatório comercial Globo Aves. Os ovos foram mantidos sob condições de armazenamento comerciais durante três dias antes do início da incubação (PULIKANTI et al., 2012). O total de 3.000 ovos ($67g \pm 2g$) foram pesados e distribuídos homoganeamente em incubadora experimental CASP- de fase única, com controle automático de temperatura a cada duas horas, e monitoramento automático de umidade. Os ovos foram submetidos aos tratamentos no 8º dia de incubação, pois é nesse período onde inicia o desenvolvimento ósseo do embrião. Após a limpeza do local com etanol a 70%, a casca foi perfurada perto da extremidade mais fina (na extremidade oposta da célula de ar) com uma agulha estéril (BD Ultra-Fine™), foi injetado 1mL de solução contendo vitamina D3 e óleo de oliva no saco vitelino, em cada ovo, cerca de 6 mm de profundidade. Após a injeção, o orifício foi selado com uma etiqueta comum.

Delineamento experimental

Mil e duzentos pintos Cobb500® machos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x5, sendo dois tratamentos realizados durante a incubação: ovos íntegros e ovos injetados com 3,6 µg de vit. D3/100 µL de óleo de oliva e cinco durante a criação: níveis de alendronato de sódio durante a criação 0, 2, 4, 6 e 12mg/mL, totalizando 10 tratamentos, com seis repetições cada. Foram alojadas 20 aves por parcela. As aves foram criadas até os 42 dias de idade e receberam dieta hídrica (com alendronato de sódio) aos 14º, 21º e 35º dias de idade. Antes da dieta hídrica as aves receberam um período de jejum alimentar de seis horas para que o alendronato de sódio fosse absorvido com maior eficiência.

Manejo e programa nutricional

As aves receberam ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental, exceto durante os dias que precederam os tratamentos com alendronato de sódio e o conforto térmico foi mantido com o auxílio de exaustores e placas evaporativas, com controle automático. Os pintos foram vacinados no incubatório contra a doença de Marek e doença de Gumboro

(IBD). O seguinte programa de vacinação foi concluído durante o período experimental: gumboro no dia 7 via ocular; doença de Newcastle e gumboro(reforço) através da água de beber, usando leite em pó como veículo (2 g L⁻¹) no dia 14.

Temperatura e umidade relativa foram registradas diariamente usando dois termo-higrometros digitais colocados à altura das aves em dois locais equidistantes. As temperaturas máxima e mínima foram de 34,1°C e 22 °C e respectivamente. A umidade relativa máxima e mínima foi de 63% e 19,18%, respectivamente.

A cama foi de maravalha e a quantidade em cada parcela de 1,2 kg de matéria seca/ave alojada. O programa de luz adotado foi de 24 horas, durante todo o período experimental.

As dietas foram à base de milho e farelo de soja (Tabela 1) ajustadas de acordo com a fase (inicial: 1-21 dias; crescimento: 22 a 42 dias de idade), seguindo as exigências nutricionais estabelecidas por ROSTAGNO et al. (2011).

Tabela 1 – Percentagem e composição nutricional calculado das rações para frangos na fase inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (21-42 dias de idade).

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento
Milho	60,82	63,74
Farelo de soja 45%	35,15	29,79
Óleo de 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 Mineral e vitamínico*	0,50	0,50
TOTAL	100,00	100,00
Composição nutricional		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,883	3,121
Proteína Bruta (%)	21,27	18,86
Ca (%)	0,85	0,69
Na (%)	0,19	0,20
Fosforo disponível (%)	0,42	0,32
Metionina + cistina digestível (%)	0,88	0,77
Metionina digestível (%)	0,56	0,49
Lisina digestível (%)	1,22	1,05
Treonina digestível (%)	0,79	0,68
Triptofano digestível (%)	0,24	0,21
Arginina digestível (%)	1,32	1,16

*Os nutrientes por quilograma de dieta: De 1 a 21 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3000 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 mg, 0,57 mg de ácido fólico, biotina 0,16 mg, 34,5 mg Niacina, Pantotenato de cálcio 9,8 mg, 0,12 g de cobre, cobalto 0,02 mg, 1,3 mg de iodo, ferro 0,05 g, 0,07 g de manganês, zinco 0,09 mg, zinco orgânico 6,75 mg, 0,27 mg de selênio, colina 0,4 g, melhorador de crescimento (bacitracina-zinco) 30 mg, (narasin + nicarbazina) 0,1 g, Metionina 1,68 g. De 21 a 42 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3000 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 mg, ácido fólico 0,57 mg, Biotina 0,16 mg, niacina 34,5 mg, Pantotenato de cálcio 9,8 mg, cobre 0,12 g, Cobalt 0,02 mg, iodo 1,3 mg, Ferro 0,05 g, Manganês 0,07 g, zinco 0,09 mg, zinco orgânico 6,75 mg, Selenium 0,27 mg, 0,6 g de colina, melhorador do crescimento (avilamicina) 7,5 mg, (monensina sódica) 0,1 g, 1,4 g Metionina.

Características avaliadas

Desempenho

Para dados de desempenho foi avaliado, ganho de peso, peso médio, consumo de ração e conversão alimentar, calculados para a fase inicial (1-21 dias de idade), crescimento (22-42 dias de idade) e total (1-42 dias de idade), com exceção do peso médio de 1 a 42 dias de idade. A mortalidade foi registrada diariamente para a correção do consumo de ração e da conversão

alimentar, bem como para calcular a viabilidade criatória e eficiência produtiva $IEP = \{[Diária\ média\ de\ ganho\ de\ peso\ (g) \times\ viabilidade(\%)] / (conversão\ alimentar \times 10)\}$.

Rendimento de carcaça

Aos 42 dias de idade, oito aves por tratamento foram pesados individualmente, submetidos a um jejum de 6 horas pré-abate, atordoadas com CO₂ e abatidos por sangria. O rendimento foi obtido a partir de todo o rendimento de carcaça (sem pés, cabeça e pescoço), rendimento de peito, rendimento de coxa e sobrecoxa, rendimento de dorso e rendimento de asa.

Qualidade de carne

O músculo peitoral maior (branco) e sartório (misto) foram rapidamente removidos de oito aves/tratamento, após as pesagens. O pH foi determinado através da inserção de um eléctrodo diretamente nos músculos, utilizando um medidor de pH digital (Testo, modelo Testo-106, Lenzkirch, Alemanha). A cor da carne foi medida a partir da porção interna do peito e ao longo da coxa usando equipamento como Medidor de CR-300 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japão) e o sistema tricromático CIELAB, que determina os valores para luminosidade (L*), teor de vermelho (a*), e teor de amarelo (b*). Foi avaliada a qualidade da carne do peito (músculo *Pectoralis*) e da sobre-coxa (músculo flexor longo do hálux) de acordo com os parâmetros a seguir. Para perdas por cozimento as amostras foram embaladas em sacos plásticos e cozidas em banho-maria à 85°C por 30 minutos, com temperatura interna final entre 75-80°C. Após liberação de água exsudada e resfriamento até alcançar a temperatura ambiente, essas foram novamente pesadas e comparadas ao peso inicial (CASON et al. 1997). Para a força de cisalhamento foram utilizadas as mesmas amostras da análise de perdas por cozimento. Após pesadas, elas foram cortadas em pedaços (1,5x1,5 cm) e submetidas ao corte através da lâmina Warner-Bratzler, acoplada ao aparelho Texture Analyser TA-XT2i. Os valores são expressos em kg.cm².

Composição, densidade e área mineral óssea

Houve um abate aos 21 e aos 42 dias de idade para coleta dos fêmures e tíbias esquerdas, utilizando oito aves por tratamento. A densidade mineral óssea - DMO (g / cm²), área (cm²), e conteúdo mineral ósseo - BMC (g), foram medidos no fêmur e na tíbia. BMD foi medida na região proximal, distal e diáfise com dupla energia absorção de raios-X (DXA), calibrado pelo fabricante (DPX-Alpha, Lunar®), com software de pequenos animais.

Características sanguíneas

Aos 41 dias de idade, oito aves por tratamento foram usadas na análise das seguintes variáveis sanguíneas: hematócrito (HCT) (% PCV), teor de hemoglobina (HGB) (g / dL), pH, pressão de dióxido de carbono (pCO₂-mm Hg), pressão de oxigênio (pO₂-mmHg), excesso de base (BE_{ecf}-mM), total de dióxido de carbono (tCO₂-mM), saturação de oxigênio (SO₂-%), Na (mM), K (mM), ionizado Ca (iCA-mM), ⁺⁺ HCO₃ (mM) e glicose (mg / dL). O sangue foi coletado da veia jugular, utilizando na seringa heparina sódica (15 µg de heparina/1 mL de sangue; labtest Diagnostica.) E imediatamente inserido utilizando um analisador clínico portátil (I-STAT Co., Abbott Laboratories, EUA, CG8 + cartucho). O pH, pCO₂ e pO₂ foram ajustados para a temperatura média da superfície corporal de acordo com RICHARDS et al. (1971).

Biometria de órgãos

Após o abate aos 42 dias de idade, fígado, pâncreas, intestino delgado e rins foram coletados, pesados e com a utilização de um paquímetro digital foram mensurados os comprimentos. Foram observados também o aspecto e coloração dos órgãos.

Análises estatísticas

Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste estudantizado (Cramer-von-Misses) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Após esses testes, os dados foram submetidos à análise de variância usando o procedimento GLM do programa de análise estatística SAS ® (2002). Para os tratamentos durante a incubação em caso de feito significativo as

médias foram comparadas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, com relação aos tratamentos durante a criação foram utilizados modelos de regressão: linear, quadrático e cúbico, com a finalidade de verificar efeitos quanto aos níveis de alendronato de sódio. Sendo os níveis de alendronato de sódio não equidistantes, para algumas características não houve ajuste linear para as regressões estimadas no desdobramento.

RESULTADOS

Desempenho

A Tabela 2 demonstra que houve efeito de interação dos tratamentos “VD3” (*in ovo*) e “AS” (administrado oralmente em varias concentrações durante a fase de crescimento) sobre as variáveis de consumo de ração e ganho de peso em aves de 1 a 21 dias de idade ($P < 0,05$).

Tabela 2. Efeito da nutrição *in ovo* de vitamina D3 e concentrações de alendronato de sódio sobre o desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade .

VD3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ óleo de oliva)	Consumo de Ração (g)	Ganho de Peso (g)	Conversão Alimentar
0	1,028 \pm 0,070	0,692 \pm 0,022	1,48 \pm 0,086
3,6	1,026 \pm 0,080	0,690 \pm 0,025	1,48 \pm 0,116
AS (mg/mL)			
0	1,050 \pm 0,056	0,709 \pm 0,024	1,48 \pm 0,089
2	1,051 \pm 0,073	0,703 \pm 0,015	1,49 \pm 0,113
4	0,991 \pm 0,088	0,689 \pm 0,012	1,43 \pm 0,112
6	1,004 \pm 0,046	0,668 \pm 0,021	1,50 \pm 0,094
12	1,027 \pm 0,096	0,680 \pm 0,020	1,50 \pm 0,114
CV(%)	6,666	2,532	6,729
VD	0,9767	0,5126	0,8001
AS	0,3196	0,0003	0,7692
VDxAS	0,0289	0,0157	0,0826

Mil e duzentos frangos de corte machos Cobb500, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com diferentes concentrações de alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 21º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão. CV=coeficiente de variação.

A partir dos dados apresentados na Tabela 3 quanto ao desdobramento da interação para a variável ganho de peso de aves de 1 a 21 dias de idade, estimou-se a concentração ideal de AS para obter o maior efeito. Para as aves não nutridas com VD3, às concentrações de AS apresentam efeito quadrático ($GP = -0,0002x^2 - 0,0013x + 0,7056$; $R^2 = 0,97$), sendo estimada à concentração de 3,35 mg/mL como a ideal para se obter o maior ganho. Quanto às aves oriundas de ovos nutridos com VD3, houve efeito quártico ($GP = 3E-05x^4 - 0,0004x^3 + 0,0003x^2 - 0,0054x + 0,714$; $R^2 = 0,99$), sendo à concentração de AS estimada para produzir o maior efeito de 3,75mg/mL.

O desdobramento da interação para consumo de ração, não obteve regressão que se ajustasse para se estimar a ideal concentração, porém foi observado que para aves oriundas de ovos não nutridos com VD3 o maior consumo foram para as suplementadas com 2 mg/mL de AS, ao contrário ocorreu para aves oriundas de ovos nutridos com VD3, o maior consumo se observou nas aves suplementadas com 12 mg/mL de AS ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Portanto, os dados acima descritos indicam que as aves oriundas de ovos nutridos com VD3 obtiveram maior ganho de peso e consumo de ração quando suplementadas com a maior concentração de AS. E para aves oriundas de ovos não nutridos com VD3 os melhores valores de desempenho foram observados para as menores concentrações de AS.

Tabela 3. Desdobramento das interações entre o efeito da nutrição *in ovo* de vitamina D3 e concentrações de alendronato de sódio sobre o desempenho frangos de corte de 1 a 21 dias de idade

Alendronato de sódio (mg/mL)									
Ganho de Peso (kg)									
Vitamina D3	0	2	4	6	12	P	P	P	P
						modelo	quadrática	cúbica	quártica
0	0,704±0,025	0,704±0,017	0,700±0,012	0,688±0,002 A	0,665±0,017 B	0,0424	0,0030	0,5509	0,6229
3,6	0,714±0,026	0,702±0,015	0,682±0,006	0,654±0,014 B	0,691±0,014 A	0,0006	0,0199	0,0001	0,0415
P	0,3637	0,8758	0,1581	0,0159	0,0332				
Consumo de Ração (kg)									
Vitamina D3	0	2	4	6	12	P	P	P	P
						modelo	quadrática	cúbica	quártica
0	1,026±0,043	1,104±0,077 A	1,039±0,081	0,991±0,024	0,974±0,055 B	0,0662	-	-	-
3,6	1,075±0,060	1,009±0,036 B	0,963±0,087	1,013±0,060	1,069±0,105 A	0,1425	-	-	-
P	0,2624	0,0473	0,1392	0,6745	0,0449				

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com diferentes concentrações de alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 21º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5%. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão.

Não houve efeito ($P>0,05$) para ganho de peso e conversão alimentar nas aves de 22 a 42 dias de idade. Somente para consumo de ração houve efeito ($P<0,05$), as aves oriundas de ovos não nutridos com VD3 e que receberam AS na concentração de 4 mg/mL consumiram maior quantidade de ração, e para as aves oriundas de ovos nutridos com VD3 o maior consumo foi observado na concentração de 12mg/mL de AS (Tabela 4).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, só houve interação entre os tratamentos, para o consumo de ração nas aves de 22 a 42 dias de idade ($P<0,05$). Para o desdobramento desta variável, as concentrações de AS apresentaram efeito quártico ($CR = 0,0015x^4 - 0,0331x^3 + 0,1977x^2 - 0,2751x + 3,282$; $R^2 = 0,98$) nas aves oriundas de ovos nutridos com VD3. Quando realizada a derivada máxima da equação, a concentração 5,52 mg/mL de AS foi estimada para o maior consumo.

Na Tabela 6 é possível observar que, quando o período total de crescimento foi analisado, houve interação entre todos os tratamentos sobre as variáveis de consumo de ração e viabilidade criatória ($P<0,05$). As aves tratadas com níveis de 4 e 6mg/mL de AS e oriundas de ovos não nutridos tiveram maior ingestão de ração. Enquanto que para as aves oriundas de ovos nutridos com VD3 o maior consumo foi para a concentração de 12 mg/mL de AS. Maior viabilidade criatória foi encontrada nas aves oriundas de ovos nutridos com VD3 e tratadas com a concentração de 12mg/mL de AS obtiveram maior valor.

A concentração ideal de AS para obter o maior efeito para as variáveis consumo de ração e viabilidade criatória no período total de criação (1-42 dias de idade) foi estimada a partir dos dados apresentados na Tabela 7. O desdobramento da interação apresentou efeito cúbico ($CR = -0,0006x^3 + 0,0212x^2 - 0,1398x + 4,356$ $R^2 = 0,99$) nos níveis de AS em aves oriundas de ovos nutridos com VD3, para a característica de consumo de ração. Quando realizada a derivada máxima da equação, a concentração 11,78 mg/mL de AS foi estimada para o maior consumo. Já para o desdobramento da interação de viabilidade criatória, houve efeito cúbico ($VC = -0,0223x^3 + 0,519x^2 - 3,05x + 100,48$; $R^2 = 0,74$) para as concentrações de AS testadas em aves oriundas de ovos nutridos com VD3, o que não ocorreu nas aves oriundas de ovos não nutridos, que apresentou efeito linear. Quando realizada a derivada máxima da

equação cúbica, a concentração 7,76 mg/mL de AS foi estimada para o maior valor de viabilidade.

Tabela 4. Efeito da nutrição *in ovo* de vitamina D3 e concentrações de alendronato de sódio sobre o desempenho frangos de corte de 22 a 42 dias de idade

VD3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ óleo de oliva)	Ganho de Peso (kg)	Consumo de ração (kg)	Conversão Alimentar
3,6	1,959 \pm 0,206	3,253 \pm 0,263	1,701 \pm 0,161
0	1,993 \pm 0,190	3,353 \pm 0,264	1,690 \pm 0,148
AS (mg/mL)			
0	1,931 \pm 0,101	3,282 \pm 0,113	1,701 \pm 0,068
2	1,962 \pm 0,167	3,203 \pm 0,238	1,721 \pm 0,189
4	1,970 \pm 0,319	3,320 \pm 0,362	1,710 \pm 0,230
6	1,967 \pm 0,253	3,323 \pm 0,276	1,703 \pm 0,172
12	2,043 \pm 0,137	3,369 \pm 0,330	1,648 \pm 0,103
CV (%)	9,92	6,686	9,838
VD	0,405	0,0604	0,849
AS	0,8102	0,526	0,856
VDxAS	0,127	0,0013	0,804

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com diferentes concentrações de alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 22º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão. CV=coeficiente de variação.

Tabela 5. Desdobramento da interação do efeito da injeção de vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre consumo de ração de 22 a 42 dias de idade para frangos de corte.

Vitamina D3	Consumo de Ração (kg)					P modelo	P quadrática	P cúbica	P quártica
	Alendronato de sódio (mg/mL)								
	0	2	4	6	12				
0	3,282 \pm 0,085	3,282 \pm 0,178	3,618 \pm 0,365 A	3,587 \pm 0,199	3,139 \pm 0,246 B	0,0797	-	-	-
3,6	3,282 \pm 0,146	3,139 \pm 0,280	3,141 \pm 0,238 B	3,125 \pm 0,067	3,554 \pm 0,246 A	0,0344	0,0231	0,0193	0,0490
P	1,000	0,3419	0,0057	0,097	0,0083	-	-	-	-

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com diferentes concentrações de alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 21º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5%. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão.

Tabela 6. Efeito da injeção de vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre o desempenho frangos de corte de 1 a 42 dias de idade.

VD3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ óleo de oliva)	Ganho de Peso (kg)	Consumo de ração (g)	Conversão Alimentar	IEP	Viabilidade criatória (%)
3,6	2,621 \pm 0,251	4,280 \pm 0,350	1,640 \pm 0,115	374,871 \pm 53,716	98 \pm 2,725
0	2,686 \pm 0,194	4,381 \pm 0,292	1,635 \pm 0,115	378,554 \pm 38,697	97 \pm 3,200
AS(mg/mL)					
0	2,640 \pm 0,120	4,333 \pm 0,152	1,642 \pm 0,063	383,613 \pm 28,858	100 \pm 0,000
2	2,589 \pm 0,283	4,254 \pm 0,257	1,654 \pm 0,134	370,561 \pm 60,913	98 \pm 2,068
4	2,660 \pm 0,324	4,311 \pm 0,421	1,632 \pm 0,159	362,769 \pm 62,789	93 \pm 2,435
6	2,636 \pm 0,265	4,327 \pm 0,272	1,650 \pm 0,136	373,210 \pm 56,003	98 \pm 1,577
12	2,723 \pm 0,144	4,396 \pm 0,397	1,612 \pm 0,091	389,293 \pm 27,361	98 \pm 2,561
CV (%)	8,712	5,807	7,444	13,371	1,625
VD	0,2408	0,0959	0,8907	0,7326	0,1744
AS	0,8064	0,8935	0,9153	0,8887	<,0001
VDxAS	0,2661	0,0013	0,5501	0,6796	0,0055

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão. CV=coeficiente de variação.

Tabela 7. Desdobramento das interações entre o efeito da nutrição *in ovo* de vitamina D3 e concentrações de alendronato de sódio sobre consumo de ração e viabilidade criatória avaliados no período total de 1 a 42 dias de idade para frangos de corte.

		Alendronato de sódio (mg/mL)								
Vitamina D3		Consumo de ração (g)					P	P	P	P
		0	2	4	6	12	modelo	quadrática	cúbica	quártica
0		4,308±0,112	4,386±0,205	4,657±0,414 A	4,578±0,222 A	4,113±0,940 B	0,0797	-	-	-
3,6		4,358±0,195	4,149±0,264	4,104±0,287 B	4,138±0,072 B	4,623±0,325 A	0,0213	0,0299	0,008	0,7161
	P	0,7568	0,1684	0,005	0,0283	0,0047				
		Viabilidade criatória (%)								
Vitamina D3		0	2	4	6	12	P	P	P	P
							modelo	quadrática	cúbica	quártica
0		100±0,000	98±1,603	92±2,501	100±0,000	95±1,251 B	0,0260	0,2607	0,3147	0,3339
3,6		100±0,000	98±2,563	93±2,583	97±1,451	100±0,000 A	0,0001	0,3582	0,0003	0,0563
	P	1,000	0,7679	0,2817	0,1308	0,0003				

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5%. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão.

Rendimento de carcaça e partes e qualidade de carne

As análises para rendimento de carcaça e partes e qualidade de carne do peito (*Pectoralis major*) mostraram que não houve efeito de todos os tratamentos ($P>0,05$). No entanto, na Tabela 8 os dados de luminosidade, quanto à qualidade de sobrecoxa (m. *Sartori*), apresentaram efeito da interação entre as concentrações de AS e nutrição *in ovo* de VD3.

Tabela 8. Efeito da injeção de vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre a luminosidade de sobrecoxa avaliada aos 42 dias de idade para frangos de corte.

Vitamina D3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ óleo de oliva) (VD3)	Luminosidade
3,6	53,463 \pm 1,921
0	52,963 \pm 1,943
Alendronato de sódio (mg/mL) (AS)	
0	52,96 \pm 1,644
2	52,67 \pm 1,833
4	54,08 \pm 2,192
6	53,10 \pm 2,470
12	53,15 \pm 1,473
CV (%)	3,336
VD	0,3547
AS	0,4917
VDxAS	0,0208

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P<0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão. CV=coeficiente de variação.

O desdobramento da interação apresentado na Tabela 9 demonstra que para as aves oriundas de ovos não nutridos que receberam dieta hídrica com 4mg/mL de AS obtiveram maior luminosidade ($P<0,05$). Para as aves tratadas com 6mg/mL de AS, maior luminosidade ocorreu para as aves oriundas de ovos nutridos com 3,6 μg de VD3 ($P<0,05$). No entanto, não foi possível ajustar nenhuma equação para às concentrações de AS testadas.

Tabela 9. Desdobramento da interação do efeito da injeção de vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre qualidade de carne da sobre coxa avaliada aos 42 dias de idade para frangos de corte.

Vitamina D3	Alendronato de sódio (mg/mL)					P modelo	P quadrática	P cúbica	P quártica
	0	2	4	6	12				
0	52,758±1,40	51,602±1,66	55,625±0,63 A	51,876±1,92 B	53,192±1,43	0,0111	0,7507	0,6091	0,3651
3,6	53,174±2,00	54,096±0,77	52,836±2,21 B	54,340±2,49 A	53,120±1,68	0,7175	-	-	-
P	0,7132	0,0741	0,0236	0,0346	0,9492				

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5%. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem (P<0,05), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão.

Densitometria óssea

A densidade mineral óssea nas aves de 21 e de 42 dias de idade não apresentou efeito significativo para os tratamentos testados ($P>0,05$).

Características sanguíneas e biometria de órgãos

Os dados sanguíneos K^+ , Cai, glicose, pCO_2 , TCO_2 , SO_2 , BEecf, pH e HCO_3 não apresentaram efeito nos tratamentos ($P>0,05$). No entanto, para os valores de PO_2 houve efeito da nutrição *in ovo* de VD3, sendo o maior PO_2 obtido para as aves oriundas de ovos nutridos com VD3 ($P<0,05$) (Tabela 10).

A Tabela 10 mostra que houve efeito da interação entre os tratamentos para concentração Na, valores de HCT e teor de HGB ($P<0,05$). No entanto, no desdobramento das interações a tabela 11 mostra que não houve ajuste das regressões para as variáveis (Na, HCT e HGB). Além disso, foi observada maior concentração de hematócrito para as aves oriundas de ovos não nutridos e que não receberam dieta hídrica com alendronato de sódio, o mesmo ocorreu para teor de hemoglobina.

Tabela 10. Efeito da injeção de Vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre os parâmetros sanguíneos avaliados de frangos de corte.

VD3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ óleo de oliva)	PO_2 (mmHg)	Na (mmol/l)	HCT (%PCV)	HGB x(g/dL)
3,6	37,25 \pm 3,614 A	145,76 \pm 1,750	19,00 \pm 2,734	6,46 \pm 0,935
0	34,37 \pm 3,609 B	145,76 \pm 1,362	18,68 \pm 2,154	6,35 \pm 0,734
AS (mg/mL)				
0	37,88 \pm 3,140	145,00 \pm 2,121	18,22 \pm 4,116	6,20 \pm 1,406
2	36,10 \pm 4,931	146,00 \pm 1,763	19,00 \pm 1,699	6,46 \pm 0,575
4	35,44 \pm 3,126	146,30 \pm 0,823	19,40 \pm 1,649	6,61 \pm 0,564
6	35,00 \pm 3,620	145,70 \pm 1,494	18,70 \pm 2,263	6,37 \pm 0,771
12	34,80 \pm 4,049	145,70 \pm 1,337	18,80 \pm 2,250	6,39 \pm 0,769
CV (%)	9,668	0,976	12,549	12,567
VD	0,006	0,807	0,758	0,753
AS	0,316	0,271	0,791	0,784
VDxAS	0,181	0,018	0,049	0,046

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem ($P<0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão. CV=coeficiente de variação.

Tabela 11. Desdobramento das interações entre o efeito da nutrição *in ovo* de vitamina D3 e concentrações de alendronato de sódio sobre parâmetros sanguíneos avaliados aos 42 dias de idade para frangos de corte.

		Alendronato de sódio (mg/mL)								
Vitamina D3		Na (mmol/L)					P	P	P	P
		0	2	4	6	12	modelo	quadrática	cúbica	quártica
0		146,20±0,836A	146,20± 1,788	146,40±1,140	144,20±1,483	145,20± 1,095	0,2466	-	-	-
3,6		143,50±2,380B	145,80±1,923	146,20±0,447	146,60± 0,894	146,20±1,483	0,0580	-	-	-
P		0,0074	0,6592	0,8253	0,0525	0,2737				
		Hct (%PCV)								
Vitamina D3		0	2	4	6	12	P	P	P	P
		0	2	4	6	12	modelo	quadrática	cúbica	quártica
0		19,80 ±1,923 A	19,20±2,280	19,40±1,673	17,40±2,408	17,60±2,073	0,1738	-	-	-
3,6		16,25±5,560 B	18,80±1,095	19,40±1,816	20,00±1,224	20,00±1,870	0,2423	-	-	-
P		0,0310	0,7905	1,000	0,0899	0,1165				
		HGB x(g/dL)								
Vitamina D3		0	2	4	6	12	P	P	P	P
		0	2	4	6	12	modelo	quadrática	cúbica	quártica
0		6,740±0,642 A	6,540±0,763	6,600±0,583	5,920±0,816	5,980±0,719	0,1679	-	-	-
3,6		5,525±1,905 B	6,380±0,383	6,620±0,614	6,820±0,408	6,800±0,628	0,2356	-	-	-
P		0,0303	0,7552	0,9689	0,0852	0,1156				

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5%. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem (P<0,05), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão.

Os dados de biometria de rins, fígado e intestino delgado não apresentaram efeito ($P>0,05$), no entanto para peso de pâncreas foi observada diferença entre os tratamentos testados. A Tabela 12 mostra que as aves que receberam o tratamento de 0mg/mL (controle), 2mg/mL e 4mg/mL de AS obtiveram menor peso de pâncreas, já os dados apresentados para comprimento de pâncreas, apresentaram interação ($P<0,05$) entre a nutrição *in ovo* de VD3 e as concentrações de AS.

Tabela 12. Efeito da injeção de vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre a biometria de pâncreas de frangos de corte.

Pâncreas		
Vitamina D3 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ óleo de oliva)	Peso (g)	Comprimento (cm)
3,6	6,110 \pm 3,025	17,584 \pm 2,576
0	6,512 \pm 3,242	9,047 \pm 2,889
Alendronato de sódio (mg/mL)		
0	3,980 \pm 0,472 C	10,725 \pm 0,457
2	4,502 \pm 0,394 BC	10,175 \pm 1,102
4	4,585 \pm 0,552 BC	11,325 \pm 1,379
6	8,246 \pm 3,513 B	4,809 \pm 5,997
12	10,675 \pm 1,456 A	6,438 \pm 3,202
CV (%)	28,03	6,666
VD	0,4067	0,9767
AS	0,0016	0,3196
VDxAS	0,8958	0,0289

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade. A, B Médias seguidas de letras distintas diferem ($P<0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão. CV=coeficiente de variação.

Na Tabela 13 o desdobramento da interação demonstrado, apresentou efeito quártico ($CP=0,0343x^4-0,6756x^3+3,5868x^2-5,4956x+11$; $R^2 = 0,98$) nas concentrações de AS para as aves oriundas de ovos não nutridos com VD3, logo, a derivada da máxima equação, estimou o nível de 4,83 mg de alendronato para maior comprimento de pâncreas. Já o efeito cúbico ($CP=0,0082x^3-0,1699x^2+0,5824x+10,417$; $R^2 = 0,99$) foi observado para os dados de aves oriundas de ovos nutridos com VD3, a partir da derivada máxima, estimou-se 8,50 mg/mL de AS como o nível de maior comprimento.

Tabela 13. Desdobramento da interação do efeito da injeção de vitamina D3 *in ovo* e concentrações de alendronato de sódio sobre a biometria de pâncreas avaliados aos 42 dias de idade para frangos de corte.

Vitamina D3	Comprimento pâncreas (cm)					P modelo	P quadrática	P cúbica	P quártica
	Alendronato de sódio (mg/mL)								
	0	2	4	6	12				
0	11,000±0,56	9,500±0,14	11,950±1,90	5,680±0,00	5,425±0,60	<,0001	0,1229	<,0001	<,0001
3,6	10,450±0,07	10,850±1,34	10,700±0,70	9,500±0,00	7,113±4,31	0,0110	0,0026	0,0244	0,5814
P	0,457	1,102	1,379	5,997	3,202				

Mil e duzentos frangos de corte Cobb500 machos, oriundos de ovos injetados ou não no 8º dia de incubação com Vitamina D3 (VD3), foram suplementados semanalmente com vários níveis de Alendronato de sódio (AS). Medidas de desempenho dos frangos foram coletadas no 1º e 42º dia de idade das aves. Para os tratamentos durante a incubação as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), com relação aos tratamentos durante a fase de crescimento foram utilizados modelos de regressão.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra a influencia da nutrição *in ovo* de VD3 aliada à suplementação de AS sobre a fase de crescimento de frangos de corte.

As observações revelam que o uso da associação de nutrição *in ovo* com VD3 e AS no crescimento, na fase inicial das aves (1 a 21 dias de idade) demonstraram que as menores concentrações de AS resultaram em peso médio e ganho de peso mais expressivos para aves oriundas de ovos não injetados com VD3. O mesmo não ocorreu para aves oriundas de ovos injetados com VD3, que necessitaram de maior concentração de AS (12mg/mL) para alcançarem índices de desempenho satisfatórios. Avaliando o uso de VD3 e AS, uma vez que o manejo no período de incubação é mais cauteloso (nutrição *in ovo*), e as aves oriundas de ovos não injetados necessitaram de menor concentração de AS, ou seja, menor custo, é indicado em optar pela utilização das substâncias testadas, não sendo recomendado o uso associado de VD3 e AS, e sim, o uso separadamente.

Já para as aves de fase de 22 a 42 dias de idade e período total não foram observados dados representativos de desempenho ligados à nutrição *in ovo* com VD3 e AS no crescimento associados. O que se sabe, é que de acordo com Ribeiro e Volpato (2005), em humanos, o AS pode gerar algumas reações adversas, como irritação do trato digestivo superior (esofagiana), essa irritação já observada, prejudicou as aves utilizadas no presente estudo.

Peter et al. Majka (1998), observaram em ratos distúrbios gastrintestinais, como desconforto abdominais, dores e diarreias causadas pelo alendronato. Segundo Sousa et al. (2005) o AS pode causar irritação da mucosa do trato gastrintestinal superior e provocar esofagites nos mais variados graus de intensidade, também observado por Fernandes et al. (2002). Não existem estudos que analisaram o efeito do AS sozinho em aves incluindo a ocorrência de reações adversas como as descritas em humanos. Entretanto, os resultados encontrados indicam que tratamento somente com AS comprometeu o desempenho das aves, provavelmente devido à irritação do trato gastrintestinal. No entanto, não era previsto que o AS causasse danos gastrintestinais, já que o fármaco foi ministrado por inoculação esofágica, ou seja, o medicamento não teve contato direto com a porção superior do trato.

De maneira geral em relação ao desempenho, até o 21º dia de idade dos frangos de corte o AS não prejudicou o trato gastrintestinal superior, enquanto que ao 42º dia de idade houve irritação do trato, talvez a explicação seja pelo fato de que os animais com idade menor receberam apenas uma dosagem da dieta hídrica contendo AS, já os animais com maior idade receberam mais vezes a dieta, ou seja, ficaram mais tempo expostos ao AS, tendo assim o seu desempenho agravado.

Os resultados obtidos mostraram também que com a nutrição *in ovo* de VD3 e adição de AS na dieta hídrica das aves tornou pior a característica de luminosidade (qualidade de carne de sobrecoxa). Uma possível explicação é que o AS pode ter contribuído para desnaturação da proteína da carne de frangos de corte, embora não seja possível explicar o mecanismo exato pelo qual o AS contribuiria para tal desnaturação. De fato, segundo ANADÓN (2002), a dispersão de luz de uma superfície muscular é diretamente proporcional à sua quantidade de desnaturação proteica, interferindo na aparência física da carne, influenciando a quantidade de luz que lhe é refletida (LAWRIE, 1991; LE BIHAN-DUVAL et al., 2003). Quanto maior o grau de desnaturação proteica, menos luz é transmitido através das fibras e mais luz acaba sendo dispersa, o que leva à palidez da carne (OLIVO et al., 2001). Também não é claro como o AS afetaria as concentrações de sódio, hematócrito e teor de hemoglobina.

Os eletrólitos sanguíneos como concentração de sódio (Na), hematócrito (Hct) e teor de hemoglobina (HGB) também foram afetados pelos tratamentos do atual estudo. Não se notou diferença entre as concentrações de AS, somente as aves que eram oriundas de ovos não injetados com VD3 obtiveram resultados de maior valor de Na, Hct e HGB. Sabendo que o sódio (Na⁺), o potássio (K⁺) e o cloro (Cl⁻) íons fundamentais na manutenção da pressão osmótica, do controle da passagem de nutrientes pela membrana celular, do equilíbrio acidobásico e do metabolismo da água (Bertechini, 2006), e que os efeitos do balanço iônico da dieta no desempenho de frangos de corte podem estar relacionados com as variações no balanço ácido-base (MONGIN, 1981), é necessário manter o equilíbrio entre esses eletrólitos. Não se sabe ao certo o mecanismo de atuação da VD3 e do AS em conjunto que interferem na concentração do íon sódio, sendo necessário mais pesquisas em relação a

esta atuação em conjunto, a fim de determinar dosagens de VD e AS que não interferiam nas concentrações de íons sanguíneos, favorecendo o equilíbrio.

Ao contrário do que se esperava o estudo não apresentou resultados satisfatórios para densidade mineral óssea com os níveis crescentes de AS testados em conjunto ou não com nutrição *in ovo* de VD3. Ito et al. (2002) combinaram efeitos do AS e VD3 para tratamento de ratas castradas e observaram melhores resultados de desenvolvimento ósseo, por meio de densitometria, histologia e tomografia para tratamento de osteoporose do que para o uso apenas de AS. Sendo assim, se propõe mais estudos quando a combinação VD3 e AS para frangos de corte, quanto as respostas significativas na densidade mineral óssea, já que outros autores trabalhando com outros animais (ratos) obtiveram resultados. Não se sabe ao certo o que pode ter ocorrido no estudo com frangos, porém sabendo dos mecanismos de ação da VD3 e do AS, se supõe um conflito das ações das duas substâncias nas concentrações testadas, não sendo possível observar uma diferença da DMO.

A combinação VD3 com AS aumentou o peso e comprimento de pâncreas, mas não afetou outros órgãos. Sabe-se que alterações no pâncreas afetam a capacidade digestiva da ave, em virtude da alta correlação entre o peso e comprimento com a atividade das enzimas digestivas pancreáticas (CORLESS & SELL, 1999). Em função disso, sugere-se que concentrações crescentes de AS tenha alterado a capacidade digestiva das aves, uma vez que o peso e comprimento do pâncreas foram superiores para aves com maior volume de AS. Uma explicação considerável, é que além do AS, a nutrição *in ovo* (3,6 µg/µg de VD3) também tenha influenciado na biometria pancreática das aves. Ainda não se tem evidências quanto à associação da hipertrofia do pâncreas e níveis de AS.

Quanto à VD3, é observado que apesar do rim ser o principal sítio de hidroxilação para a forma ativa da VD, foi identificada a presença de receptores de VD em outros tecidos, como próstata, mama, cólon, pâncreas e células do sistema imune (Schuch; Garcia; Martini; 2009), podendo sugerir uma maior atividade do pancreática, já que em nosso estudo houve aumento de peso e comprimento desse órgão.

No geral, os resultados mostram que a maioria dos parâmetros avaliados demonstrou influencia quanto ao uso de VD3 (nutrição *in ovo*) e AS

(fase de crescimento), no entanto, não foi possível observar dados significativos para densidade mineral óssea.

Uma vez que os dados significativos foram observados na interação de VD3 AS para a maioria dos parâmetros avaliados, os mesmos não foram satisfatórios, sendo assim, de qualquer forma é possível indicar somente o uso de AS como uma interessante alternativa para melhorar a saúde óssea e conseqüentemente os índices de desempenho de frangos de corte. No entanto, torna-se necessário a continuidade das pesquisas a fim de indicar uma melhor dosagem.

CONCLUSÕES

Existem interações entre o uso de nutrição *in ovo* com VD3 e suplementação com AS durante a criação, as relações são dose-dependentes e variam de acordo com as características avaliadas. O AS influencia o a biometria do pâncreas, o ganho de peso e consumo de ração, sendo específica de acordo com o tratamento utilizado durante a incubação. Sendo assim, de acordo com os dados apresentados é recomendado o uso individual de cada tratamento, a combinação da nutrição *in ovo* com VD3, bem como a suplementação com AS não foram satisfatórias.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo número 2012/15365-1, 2012/21738-5. São Paulo, Brasil.

REFERÊNCIAS

ANADÓN, H. L. S. Biological, nutritional and processing factors affecting breast meat quality of broilers. 2002. 171f. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal and Poultry Sciences) – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.

ANGEL R. Metabolic Disorders: Limitations to Growth of and Mineral Deposition into the Broiler Skeleton after Hatch and Potential Implications for Leg Problems. **Poultry Research**, v. 16, p.138-149, 2007.

ALMEIDA PAZ, I.C.L., MENDES, A.A., MARTINS, M.R.F.B. **International Journal of Morphology**, 27: 571-575. 2009.

ALMEIDA PAZ, I.C.L. Problemas locomotores e técnicas de mensuração. Pages 128-137 in Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. FACTA, Santos, SP, Brasil.

ANDRADE, J. 2012. <http://www.bulas.med.br/bula/4985/endronax.htm>
ACESSO EM 27 DE MAIO DE 2012.

BAINS, B.S., BRAKE, J.T., PARDUE, S.L.Reducing leg weakness in commercial broilers.**World Poultry Science**, Wageningen, v.14, n.1,p.: 24-27, 1998.

BATISTUZZO, J. A O.; ITAYA, M.; ETO, Y. Formulário Médico-Farmacêutico. Tecnopress, 2000.

BELLO, A., W. ZHAI, P. D. GERARD, AND E. D. PEEBLES. 2013. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. **Poult.Sci.** 92:2551–2559.

BELLO, A., W. ZHAI, P. D. GERARD, AND E. D. PEEBLES. 2014. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler post-hatch performance and carcass characteristics. **Poult. Sci.** 93:155–162.

BERTECHINI, A. B. Nutrição de monogástricos. Lavras: UFLA, 2006. 301 p.

BERNARDI, R. Problemas Locomotores em Frango de Corte. Dourados (MS): UFGD. 62f. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Grande Dourados, 2011.

BETHKE, R. M.; RECORD, P. R.; WILDER, O. H.; WILDER, C. H. Effect of different sources of vitamin D on the laying bird II. Storage of vitamin D in the egg and chick ad mineral composition of the mature embryo. **Poultry Science**, Savoy, Illinois, v. 15, p. 336 – 344, 1936.

BORGES, S.A. Suplementação de cloreto de potássio e bicarbonato de sódio para frangos de corte durante o verão. 1997. 84f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

BRITO, J. A. G.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES P. B.; LIMA, E. M. C.; MENEGHETTI, C. Efeito da vitamina D3 e 25-hidroxicolecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2656-2663, 2010.

CASON, J.A. et al . Effect of muscle oppositon during rigor on development of broiler breast meat tenderness. **Poult. Sci.** , Savoy, v. 76, p. 725-787, 1997.

CORLESS, A.B.; SELL, J.L. The effects of delayed acess to feed and water on the physical and functional development of the digestive system of young turkeys. **Poultry Science**, v.78, p.1158-1169, 1999.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. **Agrobusiness handbook**. Pout. Meat & Eggs.

GARCIA, A.Q.M., MURAKAMI, A.E.; DUARTE, C.R.A.; ROJAS, I.C.O.; PICOLI, K.P.; PUZOTTI, M.M. 2013 Use of Vitamin D3 and Its Metabolites in Broiler Chicken Feed on Performance, Bone Parameters and Meat Quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 26, n.3, p. 408-415.

HADDAD, P. T., SALAZAR, M. E HERNANDES, L. M. Histomorfometria da matriz orgânica do fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio. **Revista Brasileira de Ortopedia**. 2015; 50(1):100–104.

ITO M, AZUMA Y, TAKAGI H, KOMORIYA K, OHTA T, KAWAGUCHI H. Curative effect of combined treatment with alendronate and 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on bone loss by ovariectomy in aged rats. *Jpn J Pharmacol*. 2002;89(3):255–66.17.

LAWRIE, R. A. Meat science. New York : Pergamon, 1991. 293p.

LE BIHAN-DUVAL, E. et al. Genetic parameters of meat technological quality traits in a grand-parental commercial line of turkey. *Genetics, Selection, Evolution*, Jouy-en-Josas, v. 35, p. 623-635, 2003.

MENDONÇA JUNIOR, C. X. 2000. Enfermidades do sistema locomotor. Pages 29–36 in **Doenças das Aves**. A. Berchieri Junior and M. Macari, ed. FACTA, Campinas, Brazil.

MONGIN, P. Recent advances in dietary cation-anion balance: applications. In: **POULTRY PROCEEDINGS NUTRITION SOCIETY**, 1981, Cambridge. Proceedings... Cambridge : n.i., 1981. V.40, p.285-294.

NÄÄS IA, BARACHO MS, BUENO LGF, MOURA DJ, VERCELINO RA, SALGADO DD. Use of Vitamin D to Reduce Lameness in Broilers Reared in Harsh Environments. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.14, n.3, p. 159-232, Jul - Sept 2012.

OLIVO, R. et al. Fatores que influenciam na cor de filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 25, n. 289, p. 44-49, 2001.

ONO, T., AND R. S. TUAN. 1991. Vitamin D regulation of yolk calcium mobilization during chick embryonic development: expression of vitamin D-dependent Ca²⁺-binding protein (calbindin) in the yolk sac. Page 325 in *Avian Incubation*, S. G. Tullett ed. Cambridge University Press, Cambridge, England.

PETER, C. P.; KINDT, M. V.; MAJKA, J. A. Comparative study of potential for bisphosphonates to damage gastric mucosa of rats. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.43 (5) p.1009-1015, 1998.

PULIKANTI, R., E. D. PEEBLES, W. ZHAI, L. W. BENNETT, AND P. D.GERARD. 2012. Physiological relationships of the early post-hatch performance of broilers to their embryo and eggshell characteristics. **Poult. Sci.** 91:1552–1557.

RIBEIRO, A. F.; VOLPATO, N. M. Alendronato de sódio: Metodologias para análise quantitativa. **Quim. Nova**, Vol. 28, Número 5, 852-858, 2005.

RICHARDS, S. A. 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**, v.216, p.1-10, 1971.

ROSTAGNO, H. S. (2011). Tabelas Brasileiras para aves e suínos. **Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3 Edição Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia.

SAS INSTITUTE. SAS user's guide: statistics. Cary, 2002. 466p.

SOUSA, C.D.C., SANTOS, O.F., MACHADO, S.M. Úlcera do esôfago relacionada ao alendronato de sódio. *Gastroenterologia e endoscopiadigestiva*; 21(3):123- 126, 2005.

SOUSA, C.D.C., SANTOS, O.F., MACHADO, S.M. Úlcera do esôfago relacionada ao alendronato de sódio. *Gastroenterologia e endoscopiadigestiva*; 21(3):123- 126, 2005.