

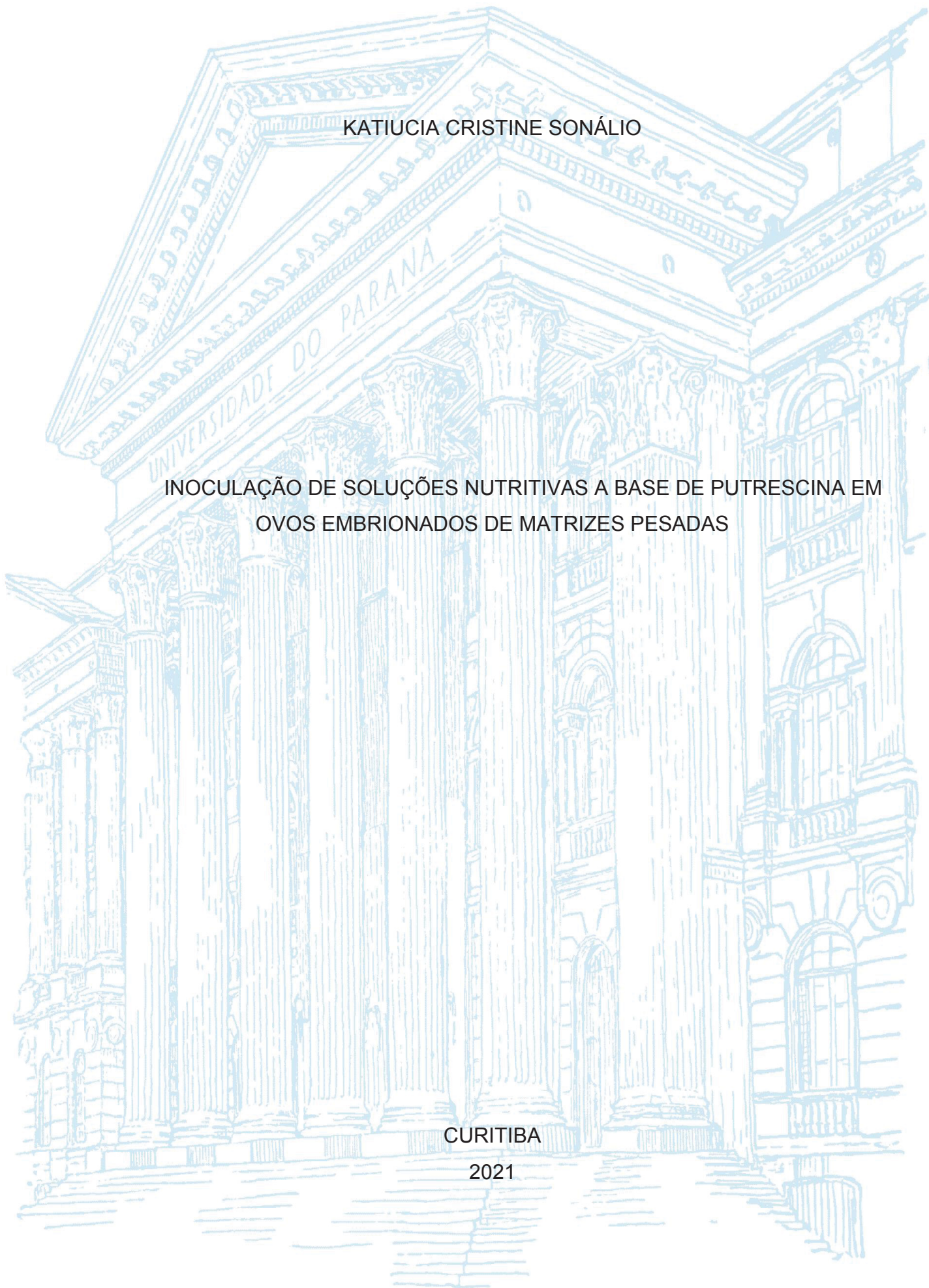
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATIUCIA CRISTINE SONÁLIO

INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES NUTRITIVAS A BASE DE PUTRESCINA EM
OVOS EMBRIONADOS DE MATRIZES PESADAS

CURITIBA

2021



KATIUCIA CRISTINE SONÁLIO

INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES NUTRITIVAS A BASE DE PUTRESCINA EM
OVOS EMBRIONADOS DE MATRIZES PESADAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Alex Maiorka

Co-orientadora: Profª. Dra. Chayane da Rocha

CURITIBA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Sonálio, Katiucia Cristine

Inoculação de soluções nutritivas a base de putrescina em ovos embrionados de matrizes pesadas. / Katiucia Cristine Sonálio. - Curitiba, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Alex Maiorka.

Coorientador: Chayane da Rocha.

1. Aminoácidos na nutrição animal. 2. Putrescina. 3. Frango - Embrião. I. Maiorka, Alex. II. Rocha, Chayane da. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de KATIUCIA CRISTINE SONALIO intitulada: **Inoculação de soluções nutritivas a base de putrescina em ovos embrionados de matrizes pesadas.**, sob orientação do Prof. Dr. ALEX MAIORKA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica
05/03/2021 13:57:36.0
ALEX MAIORKA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
10/03/2021 09:38:27.0
FABIANO DAHLKE

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
05/03/2021 18:23:58.0

ANA VITORIA FISCHER DA SILVA

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares por me acompanharem durante esta jornada e pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador Alex Maiorka pelos ensinamentos, aconselhamento e pelas oportunidades. A Professora Chayane pelos ensinamentos, pelos conselhos, sempre me incentivando e me mostrando os caminhos quando tudo era difícil. A Professora Simone e ao Professor Scandolera pelos ensinamentos e por todo o apoio sempre.

Aos amigos Leopoldo, Lucas, Vitor, Isa, Marley, Franciele, Kariny e Leandro, a todos colegas do Lepnan e Lenucan por sempre estarem comigo durante estes dois anos, me auxiliando em todas as tarefas sempre, sem medir esforços.

Ao Hair pelos ensinamentos, pela paciência e por toda a ajuda durante a realização deste projeto. A todos do LNA pelo apoio e pelo auxílio durante a realização das minhas atividades.

A todos os professores do Lepnan e Lenucan, aos funcionários da fazenda Canguiri e ao Ismael por toda a ajuda recebida.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A Capes pela bolsa de mestrado que me foi concedida.

Muito obrigada a todos!

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz”

Ayrton Senna

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar soluções nutritivas com diferentes níveis de putrescina (PUT) e putrescina associada à maltose (M), sacarose (S) e β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) inoculadas *in ovo* e seus efeitos sobre o rendimento da incubação, reservas de glicogênio hepático e muscular peitoral, morfologia intestinal e desempenho de frangos de corte na fase inicial. Para isso, foram realizados 2 experimentos, no experimento 1 foram avaliados 5 tratamentos constituídos por 4 soluções nutritivas com diferentes concentrações de putrescina (0,015%; 0,030%; 0,060% e 0,090%) e um grupo controle com inoculação de solução fisiológica (NaCl, 0,9%). No experimento 2 foram avaliados 5 tratamentos constituídos por 4 soluções nutritivas, PUT 0,015%, PUT+M+S, PUT+HMB, PUT+M+S+HMB e um grupo controle com inoculação de solução fisiológica. Em ambos os experimentos, cada tratamento foi composto de 128 ovos, divididos em 8 repetições, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado na incubadora. A inoculação das soluções nutritivas ocorreu aos 17 dias de incubação. Ao nascimento avaliou-se a taxa de eclodibilidade e o peso corporal (PC) do pintinho. O saco da gema, fígado, peito e intestino foram pesados para determinar o seu percentual em relação ao PC ao nascimento. Foram realizadas coletas de fígado e peito para determinar a concentração de glicogênio e fragmentos do jejuno e íleo para a avaliação da morfologia intestinal. Após a eclosão, as aves foram alojadas de acordo com os tratamentos recebidos durante a incubação. O desempenho foi avaliado por meio do consumo de ração, do ganho de peso e da conversão alimentar aos 7, 14 e 21 dias. No experimento 1, a taxa de eclodibilidade, o peso do pintinho ao nascimento e peso dos órgãos não foram afetados pela inoculação de diferentes concentrações de PUT *in ovo*. As vilosidades intestinais ao nascimento foram maiores nos grupos suplementados com PUT. A concentração de glicogênio hepático ao nascimento foi maior nos grupos suplementados, porém diminuíram de acordo com incremento nos níveis de PUT. O desempenho das aves até os 21 dias não foi influenciado pela PUT *in ovo*. Portanto, a suplementação *in ovo* com PUT promoveu maiores vilosidades intestinais dos pintinhos ao nascimento. No experimento 2, a eclodibilidade diferiu estatisticamente entre os tratamentos, com menor valor no tratamento com PUT+M+S+HMB. Ao nascimento, o peso da gema apresentou-se menor no tratamento com a associação de todas as substâncias. Com 4 dias o PC da ave e o percentual de peso do peito foram significativamente menores no tratamento com a inoculação de PUT+M+S+HMB. Para altura de vilo e profundidade de cripta ao nascimento, as aves que receberam PUT+M+S apresentaram os maiores valores. O desempenho aos 21 dias não foi diferente entre os tratamentos. Portanto, a inoculação da solução de PUT+M+S+HMB influenciou de forma negativa a taxa de eclodibilidade e não afetou o desempenho aos 21 dias. Desta forma, conclui-se que a inoculação de soluções nutritivas a base de putrescina *in ovo* promoveram maiores vilosidades intestinais dos pintinhos ao nascimento, porém não afetaram o desempenho aos 21 dias de criação.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, nutrição do embrião, 1,4-diaminobutano, β -hidroxi- β -metilbutirato, dissacarídeos.

ABSTRACT

The objective of this study was to develop and evaluate nutritional solutions with different levels of putrescine (PUT) and putrescine associated with maltose (M), sucrose (S) and β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) inoculated *in ovo* and their effects on incubation performance, hepatic and pectoral glycogen reserves, intestinal morphology and performance of broilers in the initial phase. For this, 2 experiments were carried out. In experiment 1, 5 treatments were evaluated, constituted by 4 nutritive solutions with different concentrations of putrescine (0.015%; 0.030%; 0.060% and 0.090%) and a control group with inoculation of saline solution (NaCl, 0.9%). In experiment 2, 5 treatments were evaluated, consisting of 4 nutrient solutions, PUT 0.015%, PUT + M + S, PUT + HMB, PUT + M + S + HMB and a control group with inoculation of saline solution. In both experiments, each treatment consisted of 128 eggs, divided into eight replicates, distributed in a completely randomized design in the incubator. The inoculation of nutrient solutions occurred at 17 days of incubation. At hatch, the hatchability rate and body weight (BW) of the chick were evaluated. The yolk sac, liver, breast and intestine were weighed to determine their percentage in relation to BW at hatch. Liver and breast collections were performed to determine the concentration of glycogen and fragments of the jejunum and ileum for the evaluation of intestinal morphology. After hatching, the birds were housed according to the treatments received during the incubation. The performance was assessed using feed intake, weight gain and feed conversion at 7, 14 and 21 days. In experiment 1, hatchability rate, chick weight at hatch and organ weight were not affected by the inoculation of PUT *in ovo*. Intestinal villi at hatch were higher in groups supplemented with PUT. The concentration of hepatic glycogen at hatch was higher in the supplemented groups but decreased according to the increase in PUT levels. The performance of birds up to 21 days was not influenced by the inoculation of PUT *in ovo*. Therefore, supplementation *in ovo* with PUT promoted greater intestinal villi of the chicks at hatch. In experiment 2, hatchability differed statistically between treatments, with less value in the treatment with PUT + M + S + HMB. At hatch, the yolk weight was lower in the treatment with the combination of all substances. At 4 days, the bird's BW and the percentage of breast weight were significantly lower in the treatment with the inoculation of PUT + M + S + HMB. For villus height and crypt depth at hatch, birds that received PUT + M + S had the highest values. Performance at 21 days was not different between treatments. Therefore, inoculation of the PUT + M + S + HMB solution negatively influenced the hatchability rate and did not affect performance at 21 days. Thus, it is concluded that the inoculation of nutritive solutions based on putrescine *in ovo* promoted greater intestinal villi of the chicks at hatch but did not affect performance at 21 days of creation.

Keywords: embryonic development, embryo nutrition, 1,4-diaminobutane, β -hydroxy- β -methylbutyrate, disaccharides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DO OVO FÉRTIL.....	19
FIGURA 2. EMBRIÃO DE GALINHA E SEUS ANEXOS EMBRIONÁRIOS.....	22
FIGURA 3. BIOSÍNTESE E INTERCONVERSÃO DAS POLIAMINAS.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DA DIETA EXPERIMENTAL	46
TABELA 2. EFEITO DA INOCULAÇÃO DA PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NA TAXA DE ECLODIBILIDADE (%) AOS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO (504 HORAS)	48
TABELA 3. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NO PERCENTUAL MÉDIO DO PESO DA GEMA (%), FÍGADO (%), PEITO (%) E INTESTINO (%) EM RELAÇÃO AO PESO CORPORAL (PC) DOS PINTINHOS AO NASCIMENTO E PESO CORPORAL (PC) E INTESTINO (%) AOS 4 DIAS APÓS NASCIMENTO	49
TABELA 4. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO (Mg / g DE TECIDO ÚMIDO) NO FÍGADO E NO MÚSCULO PEITORAL DE PINTINHOS AO NASCIMENTO	50
TABELA 5. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO JEJUNO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS PÓS NASCIMENTO	51
TABELA 6. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO ÍLEO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS PÓS NASCIMENTO	53
TABELA 7. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NO CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO EM GRAMAS (CRM), GANHO DE PESO MÉDIO EM GRAMAS (GPM) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DAS AVES AOS 7, 14 E 21 DIAS	54
TABELA 8. VALORES DE pH E OSMOLARIDADE (mmol/kg) DAS SOLUÇÕES A BASE DE PUTRESCINA ASSOCIADAS A MALTOSE (M), SACAROSE (S) E BETA-HIDROXI-METIL-BUTIRATO (HMB)	67

TABELA 9. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DA DIETA EXPERIMENTAL	70
TABELA 10. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NA TAXA DE ECLODIBILIDADE (%) AO NASCIMENTO (504 HORAS)	72
TABELA 11. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NA RELAÇÃO DO PESO DO OVO (RPO) / PESO DO PINTINHO (RPP) AO NASCIMENTO (504 HORAS)	73
TABELA 12. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NO PERCENTUAL MÉDIO DO PESO DA GEMA (%), FÍGADO (%), PEITO (%) E INTESTINO (%) EM RELAÇÃO AO PESO CORPORAL (PC) DOS PINTINHOS AO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS	74
TABELA 13. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO (Mg / g DE TECIDO ÚMIDO) NO FÍGADO E NO MÚSCULO PEITORAL DE PINTINHOS AO NASCIMENTO	75
TABELA 14. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO JEJUNO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4DIAS	76
TABELA 15. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO ÍLEO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS	77
TABELA 16. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB <i>IN OVO</i> NO CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO EM GRAMAS (CRM), GANHO DE PESO MÉDIO EM GRAMAS (GPM) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DAS AVES AOS 7,14 E 21 DIAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AB – Alcian blue.

ANOVA – Análise de variância.

ATP – Adenosina trifosfato.

CA – Conversão alimentar.

CN – Controle negativo.

CO² – Gás Carbônico.

CRIPTA – Profundidade da cripta.

CRM – Consumo de ração médio.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico.

EPM – Erro padrão da média.

FYT – Unidades de medida de atividade de fitase.

G – Gramas.

GABA – Ácido gama-aminobutírico.

GPM – Ganho de peso médio.

HE – Hematoxilina - eosina.

HMB – β -hidroxi- β -metilbutirato.

HMG-CoA – Beta-hidroxi-beta-metilglutaril coenzima A.

Kg – Quilogramas.

Kcal – Quilocalorias.

M – Maltose.

NaCl – Cloreto de sódio.

O² – Oxigênio.

ODC – Ornitina descarboxilase.

PA – Padrão analítico.

PO – Peso do ovo.

PP – Peso do pintinho.

PUT – Putrescina.

RPO x RPP – Relação do peso do Ovo x Relação do peso dos pintinhos.

RNA - Ácido ribonucleico.

S – Sacarose.

TGI – Trato gastrointestinal.

VILO – Altura de vilo.

LISTA DE SÍMBOLOS

® – Marca registrada

μm – Micrometro

°C – Graus Celsius

% – Percentagem

mOsm – Miliosmol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1 ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DO OVO E DO EMBRIÃO	18
1.1 ANATOMIA DO OVO	18
1.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	20
2. NUTRIÇÃO <i>IN OVO</i>	23
2.1 NUTRIÇÃO <i>IN OVO</i> NA AVICULTURA E SUAS PERSPECTIVAS	23
2.2 PRINCIPAIS NUTRIENTES PARA INOCULAÇÃO <i>IN OVO</i>	24
2.2.1 PUTRESCINA	25
2.2.2 MALTOSE E SACAROSE	28
2.2.3 β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO	29
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 - EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA <i>IN OVO</i> NO RENDIMENTO DA INCUBAÇÃO, RESERVA DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR, MORFOLOGIA INTESTINAL E DESEMPENHO DE AVES DE CORTE 38	
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 SELEÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS	42
2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES NUTRITIVAS E INOCULAÇÃO	42
2.3 VARIÁVEIS DE RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO	43
2.4 ANÁLISE DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR	44
2.5 ANÁLISE DE MORFOLOGIA INTESTINAL	44
2.6 DESEMPENHO	45
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
3 RESULTADOS	48
4 DISCUSSÃO	55
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 3 - EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES A BASE DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E B-HIDROXI-B-METILBUTIRATO <i>IN</i>	

OVO NO RENDIMENTO DA INCUBAÇÃO E DESEMPENHO DE AVES DE CORTE

62

1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 SELEÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS.....	66
2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES NUTRITIVAS E INOCULAÇÃO	66
2.3 VARIÁVEIS DE INCUBAÇÃO	68
2.4 ANÁLISE DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR.....	68
2.5 ANÁLISE DE MORFOMETRIA INTESTINAL.....	69
2.6 DESEMPENHO.....	69
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
3 RESULTADOS.....	72
4 DISCUSSÃO	79
5 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83

INTRODUÇÃO

A produção de frango de corte evolui constantemente em busca de produtos mais eficientes por meio de linhagens melhoradas, nutrição mais precisa, uso de tecnologias nas instalações e no ambiente de criação de aves, fazendo com que a idade de abate do frango de corte fosse significativamente reduzida ao longo das últimas décadas. Com isso, o período de incubação se torna cada vez mais expressivo e atualmente representa entre 30% a 40% do ciclo de vida total do animal, dependendo do peso de abate desejado (CAMPOS, 2010).

Durante o processo de incubação, o embrião se desenvolve se todos os nutrientes necessários estiverem disponíveis no ovo, uma vez que a disponibilidade de nutrientes nas aves é limitada pela quantidade e qualidade dos nutrientes que estão disponíveis do ovo (SANTOS, 2007). Após a eclosão, para que as aves alcancem elevada produtividade, é necessário que estas sejam capazes de digerir e absorver os nutrientes fornecidos pela dieta (VIEIRA; POPHAL, 2000). Porém, nas primeiras horas pós-eclosão e durante os primeiros dias de vida o trato digestório das aves encontra-se fisiologicamente imaturo e com as funções digestivas limitadas, o que pode diminuir a disponibilidade de nutrientes para o seu crescimento (CAMPOS et al., 2011; UNI et al., 1999; VIEIRA; POPHAL, 2000).

Uma das alternativas para estimular e antecipar o desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) é o fornecimento de compostos com potencial efeito benéfico para os embriões durante o período de incubação. Essa técnica de fornecer substâncias nutritivas antes da eclosão é definida como alimentação *in ovo* (UNI; FERKET, 2003). A nutrição *in ovo* vem sendo testada com o intuito de disponibilizar determinadas substâncias e/ou nutrientes ao embrião antes do momento da eclosão, buscando antecipar o desenvolvimento do TGI, aumentar as reservas de glicogênio, reduzir a mortalidade pós-eclosão, aumentar a taxa de crescimento e eficiência alimentar (UNI; FERKET, 2004; UNI; FERKET, 2010; KORNASIO et al., 2011).

A partir de 2000, estudos sobre nutrição *in ovo* se intensificaram, buscando soluções nutritivas que possam ser inoculadas e apresentem potencial de promover aumento na produtividade para frangos de corte. Dentre os estudos, várias substâncias foram testadas para nutrição *in ovo*, dentre elas podemos citar os carboidratos (BOTTJE et al., 2010; ZHAI et al., 2011; BHANJA et al., 2015; ABOUSAAD et al., 2017), aminoácidos (EBRAHIMI et al., 2017; GAO et al., 2017;

ZHANG et al., 2018; ZHU et al., 2019), putrescina (GOES et al., 2020) e combinações de diversos compostos (UNI et al., 2005; FOYE et al., 2006; FOYE et al., 2007; CHEN et al., 2010; KORNASIO et al., 2011; YAIR et al., 2013, DAL PONT et al., 2019; GOES et al., 2020).

Em busca de substâncias com potencial para compor as soluções nutritivas selecionamos a putrescina, um composto orgânico com baixo peso molecular e altamente solúvel em água (JANNE et al., 1978). A putrescina têm importantes funções biológicas como a modulação da estrutura do DNA e a tradução do mRNA, apresentando desta forma, função essencial na promoção da proliferação e migração celular (MORGAN, 1990, WANG, et al., 1991; MATTHEWS, 1993; NOWOTARSKI et al., 2013 e LIU et al., 2019).

A putrescina foi testada como nutriente em dietas exógenas para frangos de corte por Smith et al. (1990), onde os autores concluíram que aves alimentadas com putrescina tiveram aumento da concentração desta nos tecidos e um aumento na taxa de crescimento quando utilizado níveis moderados de putrescina dietética. Já nos níveis mais elevados (0,8 ou 1,0%) observou-se um potencial efeito de toxicidade da putrescina. Em outro estudo conduzido por Smith et al (2000), os autores avaliaram a putrescina na dieta para perus de corte e observaram que a suplementação com putrescina (0,2%) promoveu o desenvolvimento precoce do trato intestinal que resultou em aumento das taxas de crescimento das aves na fase de recria. Recentemente, Goes et al. (2020) avaliaram a putrescina como componente de soluções nutritivas *in ovo* e observaram um efeito trófico no desenvolvimento das vilosidades intestinais das aves suplementadas com putrescina, porém em doses superiores a 0,1% observou-se um efeito negativo que resultou em um pior índice de conversão alimentar aos 7 dias de idade.

Além do desenvolvimento intestinal é necessário que pintinho recém eclodido esteja preparado para receber a nova dieta baseada em carboidratos, basicamente na forma de amido, presente em quantidades mínimas dentro do ovo. Estudos demonstram que a concentração de carboidrato da dieta promove mudanças na atividade das dissacaridases intestinais, onde aves alimentadas com dietas ricas em carboidratos apresentaram maiores atividades destas enzimas, ao passo que a ausência de carboidratos na dieta leva à redução da atividade das dissacaridases intestinais (SIDDONS, 1972; SELL et al., 1991). Ainda, a suplementação de carboidratos *in ovo* pode elevar a concentração de glicogênio hepático no embrião

(TAKO et al., 2004; UNI et al., 2005), evitando que esses animais usem energia proveniente do catabolismo de proteínas e garantindo reservas suficientes de glicose para suportar a fase crítica da eclosão.

Além do melhor aproveitamento da dieta pelo animal, é importante encontrar soluções que possam auxiliar no aumento de deposição de massa muscular. A inoculação de soluções *in ovo* tem mostrado o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) como uma substância de potencial na busca pelo maior desenvolvimento muscular e seus efeitos poupadores de massa magra por incrementar as reservas de glicogênio (TAKO et al., 2004), essenciais no momento da eclosão quando o pintinho realiza grande esforço físico para quebra da casca do ovo. Os efeitos do HMB, sacarose e maltose *in ovo* já foram estudados (TAKO et al., 2004; UNI et al., 2005), entretanto, o uso de tais compostos associados à putrescina em uma única solução nutritiva ainda não foi avaliada.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar o potencial biológico de soluções nutritivas a base de putrescina e de putrescina associada à sacarose, maltose e HMB inoculadas em ovos embrionados de matrizes pesadas sobre o rendimento de incubação, morfometria do trato gastrointestinal, concentração de glicogênio hepático e muscular e desempenho de frangos de corte durante a fase inicial de criação.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 ASPECTOS ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS DO OVO E DO EMBRIÃO

1.1 ANATOMIA DO OVO

De acordo com Brake et al. (1997) e Cesario (2013), o ovo é composto por estruturas como a gema, chalaza, albúmen, membranas da casca, casca e cutícula (Figura 1). Nas aves essas estruturas possuem uma composição funcional e nutricional característica, mas podem ser discretamente modificadas de acordo com a idade da ave reprodutora, sua dieta e ao ambiente de criação (VIEIRA, 2007).

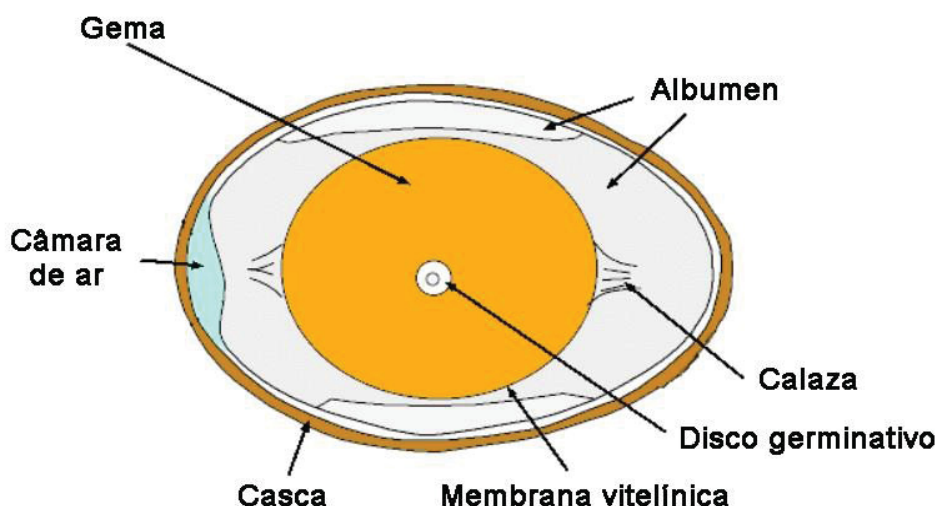
A casca do ovo é uma barreira mecânica composta basicamente por uma fração orgânica (3,5%), com diferentes tipos de matrizes proteicas envolvidas no processo de mineralização da casca, e uma fração mineral (96,5%), composta basicamente por cálcio (98,2%), magnésio (0,9%) e fósforo (0,9%) (ROMANOFF; ROMANOFF, 1949; PARSONS, 1982; NYS et al., 1999). A casca tem como funções evitar a entrada de microrganismos, atuar no controle das trocas gasosas por difusão passiva de oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água através dos seus poros (COTTA, 2002) e é responsável pelo fornecimento do cálcio necessário para o desenvolvimento do embrião (ALCROFT, 1964). Externamente à casca encontra-se a cutícula, uma camada proteica formada por mucoproteínas constituída de aproximadamente 90% de proteínas, além de pequenas quantidades de carboidratos e lipídios (BRAKE et al., 1997). A cutícula é responsável por controlar a permeabilidade da casca e evitar a entrada de microrganismos através da mesma (MUÑOZ et al., 2015). A casca possui ainda outras duas membranas localizadas na sua face interna que estão em contato com o albúmen, com exceção porção basal do ovo, onde essas membranas se separam para formar a câmara de ar. Este espaço é preenchido por ar logo após a postura do ovo, em consequência da formação de vácuo provocado pelo gradiente de temperatura do corpo da ave e o meio ambiente, aumentando gradativamente com avanço da incubação (STADELMAN; COTTERILL, 1994; POLLOCK; OROSZ, 2002; GHERARDI; VIEIRA, 2018).

O albúmen é constituído por camadas proteicas distintas e água, (DAVIS & REEVES, 2002) e pode ser dividido em estruturas como as chalazas (que envolvem

a gema), a camada fina interna que envolve as chalazas (albúmen fluído interno), a camada densa que é a maior porção do albúmen (albúmen denso) e a camada mais fina externa (albúmen fluído interno) (SOLOMON, 1997; ITO et al., 2013). O albúmen tem como função fornecer água, minerais e aminoácidos ao embrião, além de proteger das infecções microbianas e auxiliar na manutenção da temperatura interna (STURKIE, 1998). É composto por diversos tipos de proteínas, sendo a principal a ovoalbumina, representando 54% do total de proteínas, seguido da ovotransferrina (13%), ovomucóide (11) e ovoglobulinas (8%) (JONHSON, 2000). A ovoalbumina é fonte de aminoácido para o embrião e a ovotransferrina possui capacidade de se ligar aos metais e, portanto, previne o crescimento de bactérias patogênicas. Já a proteína ovomucóide tem ação de antitripsina que juntamente com a lisozima previne a degradação da albumina durante o armazenamento e a incubação (POWRIE; NAKAI, 1985; JONHSON, 2000; ITO et al., 2013).

A gema é envolta pela membrana vitelínica e permanece estável no centro geométrico do ovo. Representa uma importante fonte de nutrientes para o embrião visto que é a porção mais rica do ovo, sob o ponto de vista nutricional, e é composta principalmente por lipídios e proteínas (EVERAERT; DECUYPERE, 2013). Os lipídios presentes na gema subdividem-se em triglicerídeos (65%), fosfolipídios (28,3%) e colesterol (5,2%) (PRIVETT et al., 1962). Já os carboidratos na gema totalizam não mais que 1%, dos quais apenas 0,3% estão na forma de glicose livre. Os carboidratos não livres estão na sua maioria ligados a proteínas e lipídios (ROMANOFF; ROMANOFF, 1949). O blastodisco está situado na superfície da gema e contém o código genético do ovo, que irá coordenar o processo de desenvolvimento embrionário (ITO et al., 2013).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DO OVO FÉRTIL



FONTE: Adaptado de CESÁRIO (2013).

1.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Em todas as espécies ovíparas o desenvolvimento embrionário é uma fase dependente dos nutrientes, das particularidades do ovo e dos fatores físicos da incubação, tais como a temperatura, umidade relativa, fluxo permanente de oxigênio (O_2) e da viragem dos ovos. O desenvolvimento do embrião é um processo de grande complexidade que pode ser dividido nas fases de diferenciação celular e crescimento ou maturação embrionária (DEEMING, 2002; EVERAERT; DECUYPERE, 2013). Durante os primeiros 12 dias de incubação de um embrião de galinha são formados a maioria dos tecidos embrionários e extraembrionários. Esta fase, denominada de diferenciação celular, é caracterizada pela especialização das células e formação dos tecidos. Na fase seguinte tem-se a fase de crescimento do embrião e contínuo desenvolvimento dos órgãos, resultado de uma elevada atividade metabólica, de proliferação celular e maturação dos tecidos até que o pinto esteja pronto para eclodir (DEEMING, 2002; BOERJAN, 2006; EVERAERT; DECUYPERE, 2013).

Ao mesmo tempo em que ocorre o desenvolvimento dos tecidos embrionários desenvolvem-se também os anexos embrionários a partir dos três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme) (BARBOSA, 2011). Esses

anexos são denominados como saco vitelínico, âmnio, alantóide e córion (ALCROFT, 1964; CESARIO et al., 2013) (Figura 2).

O saco vitelínico é responsável pela nutrição do embrião, local de síntese de proteínas, aminoácidos e sangue, além do crescimento de vasos e proliferação de células tronco. Antes da eclosão, no terço final da incubação, o saco vitelínico residual é internalizado na cavidade abdominal do pintinho, constituindo a única fonte de nutrientes entre o momento da eclosão e o fornecimento da dieta pós-eclosão (FREEMAN; VINCE, 1974; NOY et al., 2001; GONÇALVES et al., 2013).

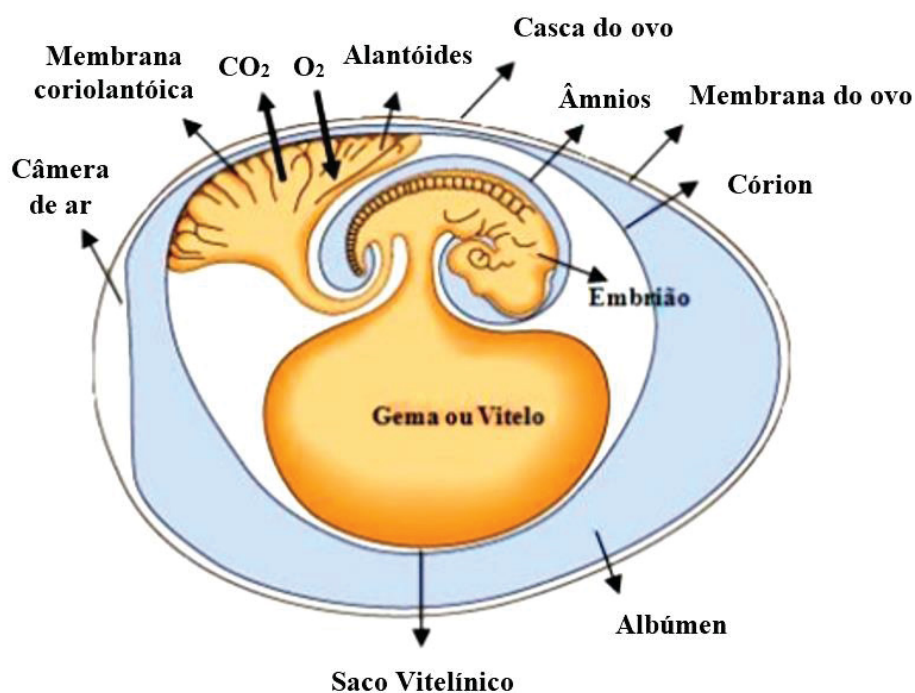
A fusão das pregas amnióticas produz uma bolsa repleta de líquido salino, que possui função de proteção do embrião, evitando a sua desidratação e oscilações de temperatura (ROMANOFF, 1960). O líquido amniótico confere ainda proteção contra choques mecânicos e evita a aderência do embrião as membranas extraembrionárias, prevenindo possíveis malformações (ROMANOFF, 1960). Por volta do 15º dia o embrião inicia a ingestão desse fluido, embora tenha sido relatada a ingestão a partir do 10º dia (FREEMAN; VINCE, 1974). Este processo de ingestão se estende até aproximadamente o 19º dia e inicia o processo de adaptação do trato gastrointestinal para a nutrição pós-eclosão (SKLAN et al., 2003; CAMPOS et al., 2010).

O alantóide é o anexo embrionário onde são depositados os resíduos provenientes do metabolismo do embrião, especialmente produtos residuais do rim. A união do alantóide ao córion dá origem a membrana corioalantóide (MCA), que circunda o embrião (DEEMING, 2002). A MCA é responsável pelo transporte de cálcio da casca do ovo para o embrião, atua como órgão respiratório e desempenha papel importante no equilíbrio ácido-base do embrião e na reabsorção de água e eletrólitos da cavidade alantoide, onde os resíduos urinários são excretados (GABRIELLI; ACCILI, 2010; EVERAERT; DECUYPERE, 2013). E por fim o córion, que envolve todas as estruturas embrionárias, possuindo função protetora (FOYE et al., 2006).

O desenvolvimento embrionário é um processo dependente de constantes reações bioquímicas que transformam os substratos em energia para que todos os demais processos metabólicos sejam realizados com eficiência pelo embrião. Durante a primeira semana de incubação as células sanguíneas ainda são imaturas e o sistema vascular pouco desenvolvido, assim o fornecimento de oxigênio é restrito, limitando a glicólise anaeróbica ao teor de glicose presente no ovo, que é

principal fonte de energia metabólica (KUCERA et al., 1984; MORAN, 2007; EVERAERT; DECUYPERE, 2013). Quando a membrana corioalantóide torna-se funcional possibilita o acesso ao O₂ e, desta forma, torna-se possível a realização de reações de beta-oxidação. Essas reações permitem a combustão dos ácidos graxos da gema e assim os ácidos graxos se tornam a principal fonte de energia para o embrião. (SATO et al., 2006; MORAN, 2007; EVERAERT; DECUYPERE, 2013). Durante os últimos dias de incubação há uma grande demanda de energia pelo embrião e neste período ocorre também a transição de respiração corioalantóide para respiração pulmonar, reduzindo a disponibilidade de O₂ e conseqüentemente a utilização de ácidos graxos para produção de energia. Desta forma, a glicose passa a ser novamente uma fonte energética (MORAN, 2007). Logo após a eclosão, as reservas de glicogênio do pintinho, estocadas no fígado, se esgotam rapidamente e a insuficiência de glicose induz o embrião a mobilizar proteína corporal para o processo de gliconeogênese (CHRISTENSEN, 2001). Assim, enquanto o pintinho não tem acesso à alimentação exógena, o músculo peitoral torna-se a principal fonte de proteína e aminoácidos para gliconeogênese, tanto pelo seu tamanho quanto pela capacidade de estocar glicogênio (DE OLIVEIRA et al., 2008). Essa energia é utilizada para os processos de termorregulação, atividade muscular, sobrevivência e crescimento, até que os pintinhos sejam capazes de consumir e utilizar os nutrientes provenientes da dieta (FERKET; UNI, 2006; MORAN, 2007).

FIGURA 2. EMBRIÃO DE GALINHA E SEUS ANEXOS EMBRIONÁRIOS



FONTE: Adaptado de CESARIO (2013).

2. NUTRIÇÃO *IN OVO*

2.1 NUTRIÇÃO *IN OVO* NA AVICULTURA E SUAS PERSPECTIVAS

A nutrição ou alimentação *in ovo* é a inoculação de soluções contendo nutrientes ou substâncias específicas dentro do ovo, disponibilizando assim compostos de origem exógena ao embrião antes do processo de eclosão (UNI; FERKET, 2003; ROCHA; MAIORKA, 2013). Os estudos com nutrição *in ovo* iniciaram-se na década de 40, onde Couch et al. (1948) descreveram pela primeira vez a inoculação de compostos em ovos férteis durante o período de incubação. No estudo, ovos oriundos de reprodutoras que consumiram dietas deficientes em biotina produziram embriões saudáveis quando administrou-se biotina, via injetável, entre 72 e 96 horas de incubação. Porém, com a utilização de máquinas de vacinação *in ovo* em larga escala, houve o interesse em introduzir substâncias juntamente com as vacinas administradas nos incubatórios, durante a transferência de ovos da incubadora ao nascedouro.

A eficiência da técnica de alimentação *in ovo* e os efeitos das substâncias inoculadas dependem da idade da ave reprodutora, da espécie avaliada, do local de aplicação e das características específicas das substâncias inoculadas. Os compostos utilizados na nutrição *in ovo* podem ser injetados diretamente no embrião, no âmnio, no alantóide, na câmara de ar ou no saco vitelino (ROCHA; MAIORKA, 2013). Dentre os possíveis locais para inoculação de compostos, o mais comumente utilizado em estudos com nutrição *in ovo* é no líquido amniótico, pois a partir do 16º dia de incubação o embrião inicia a ingestão oral do líquido amniótico e isso permite o contato direto desses compostos com os tecidos entéricos (UNI; FERKET, 2003, FERKET, 2006, ROCHA; MAIORKA, 2013).

O desenvolvimento do sistema gastrointestinal acontece ao longo de toda incubação, porém suas habilidades funcionais só começam a desenvolver a partir do 15º dia de incubação, quando o embrião inicia a ingestão oral do líquido amniótico. Com isso, a suplementação de nutrientes no fluido amniótico pode acelerar o desenvolvimento intestinal preparando o pintinho para o período de adaptação pós-eclosão (ROCHA; MAIORKA, 2013). A técnica de alimentação *in ovo* permite inúmeras possibilidades de interferências positivas no desenvolvimento e maturidade precoce do embrião, dependendo dos nutrientes utilizados e suas diferentes funções. Tais funções incluem: fontes de energia; estimuladores de ativação do sistema imunológico; metabolismo protéico; agentes tróficos que estimulam maior desenvolvimento da mucosa intestinal e conseqüentemente possibilitam aumentar as reservas de glicogênio hepático e muscular; reduzir a mortalidade; aumentar a taxa de crescimento e a eficiência alimentar (UNI; FERKET, 2004; UNI; FERKET 2010; CAMPOS et al., 2010; KORNASIO et al., 2011).

2.2 PRINCIPAIS NUTRIENTES PARA INOCULAÇÃO *IN OVO*

Diversos estudos foram realizados com nutrição *in ovo* utilizando diferentes compostos, como sacarose, maltose e glicose, consideradas fontes energéticas e estimuladoras do intestino delgado (TAKO et al., 2004; TAKO et al., 2005; BOTTJE et al., 2010; ZHAI et al., 2011; ABOUSAAD et al., 2017). Ainda, foram realizados estudos com compostos como a metionina, lisina, treonina, arginina, leucina e HMB, que atuam no metabolismo de proteínas, (AL-MURRANI., 1982; OTHA et al., 1999; KADAM et al., 2008; EBRAHIMI et al., 2017; GAO et al., 2017; ZHANG et al., 2018;

ZHU et al., 2019) e por fim, estudos que utilizam novas substâncias, com potenciais efeitos metabólicos benéficos para o embrião, como a putrescina (GOES et al., 2020).

A putrescina foi avaliada na dieta de perus de corte, aumentando a taxa de crescimento das aves na fase inicial (SMITH et al., 2000). Em outro estudo, Lui et al. (2019) mostrou que a atrofia da mucosa foi melhorada pela suplementação dietética com putrescina em leitões recém-desmamados. Recentemente a putrescina foi utilizada para alimentação *in ovo* em um estudo realizado por Goes et al. (2020), e apresentou-se como agente tróficos no desenvolvimento das vilosidades intestinais.

Amplamente testados na nutrição *in ovo*, os carboidratos, especialmente os dissacarídeos maltose e sacarose, podem aumentar o nível de glicose disponível para o embrião e estimular a produção e a atividade das enzimas da borda em escova (sacarase e maltase) (TAKO et al., 2004). Este fator é fundamental pois logo após a eclosão estes animais são submetidos a dietas ricas em carboidratos, mais especificamente o amido (UNI et al., 2003; UNI; FERKET, 2004).

Já o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) vem sendo estudado como um ingrediente na nutrição *in ovo*, buscando o maior desenvolvimento muscular desses animais. Ao estudarem os efeitos da inoculação *in ovo* de carboidratos e HMB, Tako et al. (2004) observaram melhores resultados no desenvolvimento intestinal de aves que receberam suplementação de HMB *in ovo* e maior ganho de peso ao nascimento e após a eclosão nas aves que receberam alimentação *in ovo*.

2.2.1 PUTRESCINA

As aminas biogênicas são bases orgânicas nitrogenadas que possuem baixo peso molecular (LADERO et al., 2010). Um subgrupo das aminas biogênicas são as poliaminas: putrescina, espermidina e espermina. Estas são sintetizadas a partir da metionina e ornitina em vias curtas e altamente reguladas. As enzimas regulatórias são a ornitina descarboxilase (ODC), que catalisa a síntese de putrescina a partir de ornitina, e a S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC), que regula a doação de grupos aminopropil de metionina para os substratos putrescina e espermidina na síntese de espermidina e espermina (PEGG, 1986; SMITH et al, 2000; SODA, 2011) (Figura 3).

A putrescina tem a estrutura química simples ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$), é altamente solúvel em água e possui funções biológicas intracelulares importantes como a modulação da estrutura do DNA, a tradução do mRNA e a atividade da proteína, bem como desempenham papéis essenciais na promoção da proliferação e migração celular, uma vez que estimulam reações fisiológicas que envolvem atividades anabólicas, como a síntese de ácidos nucleicos, de proteínas e modulam a expressão de genes importantes para proliferação das células (JANNE et al., 1978; LUCK et al., 1980; HEBY, 1986; WANG, et al., 1991).

Observa-se que as células de crescimento rápido têm concentrações mais altas de poliaminas do que células de crescimento lento. As concentrações de poliaminas aumentam antes dos aumentos na síntese de DNA, RNA e proteína (MORGAN, 1990; SMITH et al., 2000). Portanto, um aumento na concentração intracelular de putrescina correlaciona-se com o aumento da proliferação celular e é tipicamente observado em situações com elevada taxa de proliferação celular, como durante o curso de doenças cancerígenas e durante o desenvolvimento embrionário. (PEGG, 1986; PEGG, 2009; GERNER et al., 2004). Por outro lado, a cessação do crescimento celular foi correlacionada com concentrações reduzidas de poliaminas, enquanto a redução na concentração celular de putrescina inibe a proliferação celular e perturba a integridade do epitélio intestinal (HEBY et al., 1990; HEBY; PERSSON, 1990; JALADANKI; WANG, 2011).

Em um estudo conduzido por Bardócz et al. (1998), a putrescina também possui função essencial no intestino delgado ao formar succinato via gama-aminobutírico (GABA) e servir como uma fonte de metabolização instantânea de energia prontamente disponível. Os autores observaram que em ratos em jejum, apesar de uma diminuição nas concentrações de putrescina nos tecidos do intestino delgado, a captação de putrescina da circulação foi significativamente aumentada e mais de 80% imediatamente convertida em succinato, sendo possível que a putrescina disponibilizada pela circulação sistêmica possa fornecer energia metabolizável rápida ao intestino.

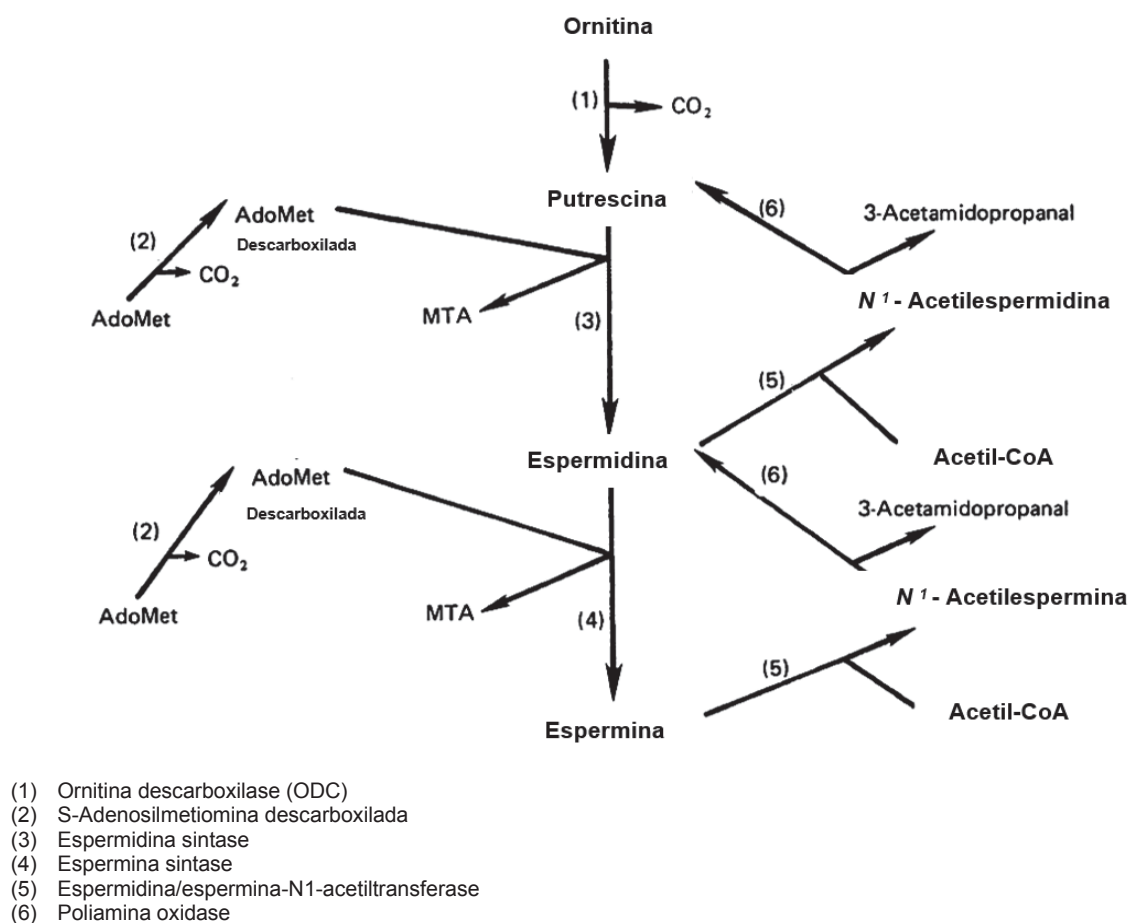
Avaliando diferentes concentrações de putrescina na dieta para frango de corte, Smith (1990) observou seus efeitos na taxa de crescimento dos pintinhos. O autor verificou que o fornecimento de dietas contendo 0,2% e 0,4% de putrescina proporcionou maior taxa de crescimento em comparação com a dieta sem adição de putrescina. No nível de 0,6%, observou-se que a taxa de crescimento retornou aos

níveis do grupo controle, enquanto nos níveis de 0,8 e 1,0% de putrescina cresceram mais lentamente do que os as aves do grupo controle e foram considerados tóxicos para os animais, já que diminuiu a ingestão de alimentos e conseqüentemente o ganho de peso. Com isso, inferiu-se que doses inferiores podem ser fornecidas por meio da dieta e possuem ação de promotores de crescimento, porém o excesso de putrescina na dieta de frangos de corte pode ser tóxico para o organismo e prejudicar o desempenho desses animais.

Na sequência de estudos, Smith et al. (2000) avaliaram o efeito de dietas suplementadas com 0,2%, 0,4% e 0,6% de putrescina para perus de corte. Os animais alimentados com 0,2% registraram o maior ganho de peso na fase inicial, já na fase de crescimento as aves mais pesadas foram aquelas alimentadas com 0,4% de putrescina até os 21 dias de idade. Desta forma, concluiu-se que os suplementos de putrescina podem promover o crescimento de perus no período inicial e que esse desenvolvimento precoce do trato intestinal resulta em aumento das taxas de crescimento das aves na fase de recría.

Em um estudo pioneiro com putrescina na nutrição *in ovo*, Goes et al. (2020), testaram quatro diferentes níveis de putrescina (0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2%) e observaram que a putrescina se comportou como agente trófico no desenvolvimento das vilosidades intestinais. Porém, nas doses superiores a 0,1% a putrescina apresentou efeito negativo nos animais, o que resultou em maior produção de muco para proteção do epitélio intestinal e pior conversão alimentar na fase pré-inicial.

FIGURA 3. BIOSÍNTESE E INTERCONVERSÃO DAS POLIAMINAS



FONTE: Adaptado de PEGG (1986)

2.2.2 MALTOSE E SACAROSE

Os dissacarídeos, maltose e sacarose, são um grupo de carboidratos classificados como açúcares simples e formados pela união de duas moléculas de monossacarídeos (UNI et al., 2005).

Nas aves, a formação de dissacarídeos no lúmen intestinal se inicia com a digestão de carboidratos, principalmente o amido, pela ação da enzima amilase pancreática (GONZÁLES; SILVA, 2003). O resultado da hidrólise do amido é a formação de moléculas menores como a maltose e a sacarose, as quais são hidrolisadas por ação das enzimas dissacaridases específicas, sacarase e maltase, presentes no lúmen e na membrana borda em escova do intestino delgado (CHOTINSKY et al., 2001). A hidrólise da sacarose e da maltose libera uma molécula de glicose e outra de frutose e duas moléculas de glicose,

respectivamente. Dessa forma, os monossacarídeos estão prontos para serem absorvidos e metabolizados por processos de glicogênese ou glicólise (CHOTINSKY et al., 2001; GONZÁLES; SILVA, 2003).

As enzimas são proteínas substrato dependentes e estudos demonstram que a concentração de carboidrato da dieta promove mudanças na atividade das dissacaridasas intestinais. Aves alimentadas com dietas ricas em carboidratos, especialmente o amido, apresentaram maiores atividades de dissacaridasas, ao passo que a ausência de carboidratos na dieta leva à redução da atividade das dissacaridasas intestinais (SIDDONS, 1972; SELL et al., 1991).

De acordo com Uni et al. (2003), o fornecimento de carboidratos de fácil digestão para o embrião, ainda aos 17,5 dias de incubação, pode estimular a produção e a atividade das enzimas sacarase e maltase, fator esse fundamental quando logo após a eclosão as aves iniciam a ingestão de dietas ricas em carboidratos. Segundo Moran Jr. (1985), a digestão e a absorção de carboidratos são altamente adaptáveis de acordo com sua presença na dieta. Desse modo, podemos considerar que o contato antecipado com dissacarídeos, como a maltose e a sacarose, é importante para que a produção das enzimas presentes nos enterócitos seja estimulada antes da eclosão, visto que a concentração de carboidratos no ovo é muito baixa. Ainda, a suplementação de carboidratos *in ovo* pode elevar a concentração de glicogênio hepático no embrião (TAKO et al 2004; UNI et al., 2005), evitando que esses animais usem energia proveniente da depleção de proteínas, garantindo reservas suficientes de glicose para suportar a fase crítica da eclosão.

2.2.3 β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO

O β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) é um produto resultante do metabolismo da leucina pela ação da enzima α -cetoisocaproato dioxigenase e sua principal função está relacionada ao anabolismo e catabolismo proteicos (NISSEN et al, 1996). O HMB atua como um agente anticatabólico e pode ser responsável pelo efeito inibitório sobre a degradação de proteínas, além de afetar o crescimento muscular por meio de um efeito direto na proliferação celular, talvez por ser uma fonte de síntese de colesterol, que é necessário para a síntese de novas membranas ou

regeneração de membranas danificadas (NISSEN et al, 1996; ANTHONY et al., 2000; TAKO et. al, 2004; UNI et al., 2005).

Estudando os efeitos da inoculação *in ovo* de dextrina e HMB em embriões sobre o período de jejum pós-eclosão de frangos de corte, Kornasio et al. (2011) observaram um significativo aumento nas concentrações de glicogênio hepático e do músculo peitoral aos período pré eclosão, na eclosão e 24 horas pós eclosão. Essa diferença observada após a eclosão deve-se, provavelmente, a maior capacidade das aves do grupo IOF de digerir e absorver o seu primeiro alimento, que ocorreu em função do desenvolvimento aprimorado do intestino delgado das aves do grupo IOF (TAKO et al., 2004; FOYE et al., 2007; KORNASIO et al. 2011). Resultados semelhantes para aumento da reserva de glicogênio já haviam sido encontrados por Uni et al. (2005), onde os autores relataram que a administração *in ovo* de sacarose, maltose, dextrina e HMB resultou em um aumento de aproximadamente 6 a 12 mg de glicogênio por grama de tecido embrionário do fígado. Essa fonte de energia adicional foi essencial para suprir o déficit energético do embrião e provavelmente apoiou o desenvolvimento tardio, resultando em um aumento significativo no peso corporal e no peso do músculo peitoral na eclosão quando comparados aos animais que não receberam suplementação *in ovo* (UNI et al., 2005).

Ao estudarem os efeitos da inoculação *in ovo* de maltose, sacarose, dextrina, e/ou HMB, Tako et al. (2004) observaram melhores resultados dos 19 dias de incubação até o terceiro dia pós-eclosão quando avaliaram o desenvolvimento intestinal de aves que receberam apenas suplementação de HMB *in ovo*. Verificou-se ainda o aumento na altura e na área superficial das vilosidades, maior atividade da enzima sucrase-isomaltase, além de maior ganho de peso na eclosão e nos períodos pós-eclosão avaliados (3, 7 e 10 dias).

A utilização do HMB como componentes da solução para alimentação *in ovo* e seus efeitos sobre o organismo animal vem sendo estudada. Entretanto, o uso de HMB associado à putrescina ainda não foi estudado, desta forma, levantou-se a hipótese de que o fornecimento da combinação de putrescina e HMB pode promover efeitos metabólicos positivos para os embriões de aves.

REFERÊNCIAS

ABOUSAAD, S.; LASSITER, K.; PIEKARSKI, A.; CHARY, P.; STRIPLIN, K.; CHRISTENSEN, K.; BIELKE, LR.; HARGIS, B.M.; DRIDI, S.; BOTTJE, W.G. Effects of In Ovo feeding of dextrin-iodinated casein in broilers: I. Hatch weights and early growth performance. **Poultry Science**, 2017.

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

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

ANTHONY, J.C.; YOSHIZAWA, F.; ANTHONY, T.G.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S.; KIMBALL, S.R. Leucine Stimulates Translation Initiation in Skeletal Muscle of Postabsorptive Rats via a Rapamycin-Sensitive Pathway. **The Journal of Nutrition**. v. 130, p. 2413–2419, 2000.

BARBOSA V.M. Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário. **FEP MVZ UFMG**. Belo Horizonte, 2011.

BHANJA, S.K.; GOEL, A.; PANDEY, N.; MEHRA, M.; MAJUMDAR S.; MANDAL A.B. In ovo carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 163-173, 2015.

BOERJAN, M. Early Embryogenesis of the chick. In: Post Graduation Course in Incubation Biology and Management. **University of Wageningen, Holland**, 2006.

BOTTJE, W.; WOLFENDEN, A.; DING, L.; WOLFENDEN, R.; MORGAN, M.; PUMFORD, N.; LASSITER, K.; DUNCAN, G.; SMITH, T.; SLAGLE, T.; HARGIS, B. Improved hatchability and posthatch performance in turkey poults receiving a dextrin-iodinated casein solution in ovo. **Poultry Science**, v. 89, p. 2646–2650, 2010.

BRAKE, J.; WALSH, T.J.; BENTON, JR.; PETITTE, C.E.; MEIJERHOF, R.; PENALVA, G. Egg handling and storage. **Poultry Science**, v. 76, p. 144-151, 1997.

CAMPOS, A.M.; GOMES P.C.; ROSTAGNO H.S. Nutrição in ovo de frangos de corte. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 7, p. 1304-1313, 2010.

CAMPOS, A.M.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; DA SILVA, E.A.; ALBINO, L.F. T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1712–1717, 2011.

CESARIO, M.D. Desenvolvimento embrionário pré e pós postura – períodos críticos. In: Macari M. et al. Manejo da incubação. **FACTA**, p. 48-62, 2013.

CHEN, W.; WANG, R.; XIONG, X.L.; WAN, H.F.; XU, J.; PENG, J. Influence of in ovo injection of disaccharides, glutamine and β -hydroxy- β -methylbutyrate on the development of small intestine in duck embryos and neonates. **British Poultry Science**, v. 51:5, p. 592-601, 2010.

CHOTINSKY, D.; TONCHEVA, E.; PROFIROV, Y. Development of disaccharidases activity in the small intestine of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 42, p. 389-393, 2001.

CHRISTENSEN, V.L. et al. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, p.1729-1735, 2001.

COUCH J.R.; CRAVENS, W.W.; ELVEHJEM, C.A. Studies on the role of biotin in embryonic development of the domestic fowl. **Poultry Science**, v. 27, p. 657, 1948.

COTTA, J.T.B. Galinha: produção de ovos. **Viçosa: Aprenda Fácil**, p. 260, 2002.

DAVIS, C.; REEVES, R. High Value Opportunities from The Chicken Egg. **A report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC**, 2002.

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

DE OLIVEIRA, J.E.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's poultry science journal**, v. 64, n. 4, p. 488-499, 2008.

EBRAHIMI, M.; JANMOHAMMADI, H.; DAGHIGH KIA, H.; MOGHADDAM, G.; RAJABI, Z.; ABBAS RAFAT, S.; JAVANMARD, A. The effect of L-lysine in ovo feeding on body weight characteristics and small intestine morphology in a day-old Ross broiler chick. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 168, p. 116-124, 2017.

EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: Macari M. et al. Manejo da incubação. **FACTA**, p. 31-45, 2013.

FERKET, P. Incubation and *in ovo* nutrition affects neonatal development. **Proceedings of the 33^o Annual Carolina Poultry Nutrition Conference**, Durham, North Carolina, 2006.

FERKET, P.; UNI, Z. Early feeding – in ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: **Conference European Poultry**, 12. Verona. Anais... Verona: Conference European Poultry, 2006.

FOYE, O.; FERKET, P.; UNI, Z. The effects of in ovo feeding of protein and beta-methylbetahydroxy butyrate (HMB) on nutrient digestion and absorption in neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 85, p. 1185–1192, 2006.

FOYE, O.T.; FERKET, P.R.; UNI, Z. The Effects of In Ovo Feeding Arginine, β -Hydroxy- β -Methyl-Butyrate, and Protein on Jejunal Digestive and Absorptive Activity

in Embryonic and Neonatal Turkey Poults. **Poultry Science**, v. 86, p. 2343–2349, 2007.

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

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

GAO, T.; ZHAO, M.M.; LI, Y.J.; ZHANG, J.L.; LI, L.L.; GAO, F.; ZHOU, G.H. Effects of in ovo feeding of L-arginine on the development of digestive organs, intestinal function and post-hatch performance of broiler embryos and hatchlings. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, p. 166-175, 2017.

GERNER E.W.; MEYSKENS F.L. Jr: Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 781-792, 2004.

GHERARDI, S.R.M.; VIEIRA, R.P. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo: revisão de literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 15, 2018.

GOES, E.C.; CARDOSO DAL PONT, G.; OLIVEIRA, P.R.; DA ROCHA, C.; MAIORKA, A. Effects of putrescine injection in broiler breeder eggs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1–11, 2020.

GONZÁLES, F.H.D.; SILVA, S.C. Bioquímica Clínica de Glicídeos. In: Introdução a Bioquímica Veterinária. Porto Alegre: **UFRGS**, p.153-209, 2003.

GONÇALVES, F.M; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L.; FARINA, G.; KREUZ, B.S.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F. Nutrição in ovo: Estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola, Universidade Federal de Pelotas. **Archivos da Zootecnia**, v. 62, p. 45-55, 2013.

HEBY, O. Putrescine, Spermidine, and Spermine. **Physiology**, p. 12-15, 1986.

HEBY, O.; HOLM, I.; PERSSON, L.O. Polyamine-mediated control of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression in mammalian cells. **Biochemical Society Transactions**, v.18, p. 1084-1087, 1990.

HEBY, O.; PERSSON, L. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15(4), p. 153–158, 1990.

ITO, N.M.; MIYAJI, C.I.; MIYAJI, S.O. Sistema reprodutor e formação do ovo. In: Macari M. et al. Manejo da incubação. **FACTA**, p. 01-28, 2013.

JALADANKI, R.N.; WANG, J.Y. Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. In: **Colloquium series in Integrated Systems Physiology**, p.103, 2011.

JÄNNE, J.; PÖSÖ, H.; RAINA, A. Polyamines in rapid growth and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 473, p. 241-293, 1978.

JOHNSON, A.L. Reproduction in the female. In: Witton GC, editor: **Sturkie's avian physiology**. San Diego, p. 569-596, 2000.

KADAM, M.M.; BHANJA, S.K.; MANDAL, A.B.; THAKUR, R.; VASAN, P.; BHATTACHARYA, A.; TYAGI, J.S. Effect in ovo supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 49(6), p. 736-741, 2008.

KORNASIO, R.; HALEVY, O.; KEDAR, O.; UNI, Z. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**. Champaign, v. 90, p. 1467-1477, 2011.

KUCERA, P.; RADDATZ, E.; BAROFFIO, A. Respiration and metabolism of embryonic vertebrates, chapter Oxygen and glucose uptake in the early chick embryo. R.S. Seymour, Dordrecht, The Netherlands. **Springer Science**, p. 299-309, 1984.

LADERO, V.; CALLES-ENRIQUEZ, M.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, A. M. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6(2), p. 145–156, 2010.

LIU, B.; JIANG, X.; CAI, L.; ZHAO, X.; DAI, Z.; WU, G.; LI, X. Putrescine mitigates intestinal atrophy through suppressing inflammatory response in weanling piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2019.

LUCK, G.D.; MORTON, J.J.; BAYLIN, S.B. Ornithine decarboxylase is important in intestinal mucosa maturation and recovery from injury in rats. **Science**, v. 210, p. 195-198, 1980.

MATTHEWS, H.R. Poliaminas, estrutura da cromatina e transcrição. **BioEssays**, v. 15, p. 561-566, 1993.

MORAN JR., Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, p.1043-1049, 2007.

MORAN JR., E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **Journal of Nutrition**, v.115, p. 665-674, 1985.

MORGAN, D.M.L. Polyamines and cellular regulation: perspectives. **Biochemical Society Transactions**, v.18, p.1080-1084, 1990.

MUÑOZ, A.; DOMÍNGUEZ-GASCA, N.; JIMENEZ-LÓPEZ, C.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A.B. Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding trans-shell Salmonella contamination in chicken eggs. **Food Control**, v. 55, p. 31-38, 2015.

NISSEN, S.L.; SHARP, R.; RAY, M.; RATHMACHER, J.A.; RICE, D.; FULLER, J.C.; CONNELLY, A.S. JR.; ABUMRAD, N. Effect of leucine metabolite b-hydroxy-b methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, p. 2095-2104, 1996.

NOWOTARSKI, S.L.; WOSTER, P.M.; CASERO, R.A. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. **Expert reviews in molecular medicine**, v.15, p.1-21, 2013.

NOY, Y.; GEYRA, A.; SKLAN, D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch. **Poultry Science**, v. 80, p. 912-919, 2001.

NYS, Y.; HINCKE, M.T.; ARIAS, J.L.; GRACIA-RUIZ, J.M. SOLOMOM, S.E. Avian Eggshell Mineralization. **Poultry and Biology Reviews**, v. 10 (3), p. 143-166, 1999.

OHTA, Y.; TSUSHIMA, N.; KOIDE, K.; KIDD, M.T.; ISHIBASHI, T. Effect of Amino Acid Injection in Broiler Breeder Eggs on Embryonic Growth and Hatchability of Chicks. **Poultry Science**, v. 78, p. 1493–1498, 1999.

PARSONS, A.H. Structure of the Eggshell. **Poultry Science**, v. 61, p. 2013-2021, 1982.

PEGG, A.E., Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 234, p. 249-262, 1986.

PEGG, A.E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**, v. 61, p. 880-894, 2009.

PRIVETT, O.S.; BLAND, M.L.; SCHMIDT, J.A. Studies on the composition of egg lipid. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 463-468, 1962.

POLLOCK, G.C.; OROSZ, S.E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **The Veterinary Clinics of North American. Exotic Animal practice**, v. 5 (3), p. 441–474, 2002.

POWRIE, W.D.; NAKAI, S. Characteristics of edible fluids of animal origin: eggs. In: **Food Chemistry**. O. Fennema ed. 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York. 1985.

ROCHA, C.; MAIORKA, A. Nutrição In Ovo. In: Macari M. et al. Manejo da incubação. **FACTA**, p. 223-239, 2013.

ROMANOFF, A.L.; ROMANOFF, A.J. The Avian Egg. New York: **John Wiley and Sons**, p. 918, 1949.

ROMANOFF A.L. The avian embryo. **The Macmillan Company**, New York. 1960.

SANTOS, T.T. Influência da inoculação de ingredientes intra ovo em aspectos produtivos e morfológicos de frangos de corte oriundos de distintos pesos de ovos. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, p. 63, 2007.

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

SELL, J.; ANGEL, C.; PIQUER, F.; MALLARINO, E.G.; AL-BATSHAN, H.A. Development patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. **Poultry Science**, v. 70, p. 1200-1205, 1991.

SIDDONS, R.C. Effect of diet on disaccharidase activity in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 27, p. 343-352, 1972.

SKLAN, D.; GEYRA, A.; TAKO, E.; GAL-GERBER, O.; UNI, Z. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 747-753, 2003.

SMITH, T.K. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. **Experimental Biology and Medicine**, v. 194(4), p. 332-336, 1990.

SMITH, T.K.; TAPIA-SALAZAR, M.; RICQUE-MARIE, D. Feed- Feed - borne biogenic amines : Natural toxicants or growth promoters ?. **Biogenic Amines**, v. 10(8), p. 24-32, 2000.

SODA, K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30:95, 2011.

SOLOMON, S.E. Egg & eggshell quality. Ames, **Iowa State University Press**; p.149, 1997.

STURKIE, P.D. Sturkie's avian physiology. 5th ed. **London: Academic**, 1998.

STADELMAN, W.J.; COTTERILL, O.J. Egg Science and Technology. 4 thed. **New York: The Haworth Press**, p. 591, 1994.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and betahydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, p. 2023-2028, 2004.

TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression. and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 339 - 346, 2005.

UNI, Z.; Noy, Y.; Sklan, D. Posthatch Development of Small Intestinal Function in the Poult. **Poultry Science**, v. 78, p. 215-222, 1999.

UNI, Z.; FERKET, P.R. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. **US Regular Patent US**, US 8734837 B2, v. 6, 2003. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8734837>> Acesso em mar. de 2020.

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.

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

UNI Z.; FERKET P.R. Alimentação in ovo – Impacto sobre o desenvolvimento intestinal, teor corporal de energia e desempenho. In: **Conferência FACTA de Ciência e Tecnologia Avícolas**; Santos, São Paulo. Brasil, p.109-119, 2010.

UNI, Z.; FERKET, P.R.; TAKO, E.; KEDAR, O.; In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, p. 764-770, 2005.

UNI, Z.; SMIRNOV, A; SKLAN, D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320-327, 2003.

VIEIRA, S.; POPHAL, S. Nutrição Pós-Eclosão de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 189-199, 2000.

VIEIRA, S.L. Chicken Embryo Utilization of Egg Micronutrients. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n.1, p. 01-08, 2007.

WANG, J.Y.; MCCORMACK, S.A.; VIAR, M.J.; JOHNSON, L.R. Stimulation of proximal small intestinal mucosal growth by luminal polyamines. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 261, 1991.

ZHAI, W.; GERARD, P.D.; PULIKANTI, R.; PEEBLES. E.D.; Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings. **Poultry Science**, v. 90, p. 2134-2143. 2011.

ZHANG, X.Y.; LI, L.L.; MIAO, L.P.; ZHANG, N.N.; ZOU, X.T. Effects of in ovo feeding of cationic amino acids on hatchability, hatch weights, and organ developments in domestic pigeon squabs (*Columba livia*). **Poultry Science**, v. 97, p. 110–117, 2018.

ZHU, M.K.; ZHANG, X.Y.; DONG, X.Y.; ZOU, X.T. Effects of in ovo feeding of L-lysine on hatchability, hatching time, and early post-hatch development in domestic pigeons (*Columba livia*). **Poultry Science**, v. 98, p. 5533–5541, 2019.

YAIR, R.; SHAHAR, R.; UNI, Z. Prenatal nutritional manipulation by in ovo enrichment influences bone structure, composition, and mechanical properties. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 2784–2793, 2013.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA *IN OVO* NO RENDIMENTO DA INCUBAÇÃO, RESERVA DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR, MORFOLOGIA INTESTINAL E DESEMPENHO DE AVES DE CORTE

(Effect of putrescine inoculation *in ovo* on hatchability, hepatic and muscular glycogen reserve, intestinal morphology, and performance of broilers)

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar soluções nutritivas com níveis crescentes de putrescina sobre o rendimento de incubação, concentração de glicogênio hepático e muscular, morfometria do intestino e desempenho de frangos de corte durante a fase inicial. Para isso, foi conduzido um experimento onde foi aplicado um delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos constituídos por 4 soluções nutritivas com doses crescentes de putrescina (0,015%; 0,030%; 0,060% e 0,090%) e um grupo controle com inoculação de solução de cloreto de sódio (NaCl; 0,9%). Ao nascimento, foram avaliados: taxa de eclodibilidade; relação entre peso do ovo e peso do pintinho; relação entre peso do saco da gema, fígado, peito e intestino e peso do pintinho; concentração de glicogênio no fígado e músculo peitoral; características morfológicas do jejuno e íleo. Após a eclosão, 400 aves foram alojadas em gaiolas metabólicas de acordo com os tratamentos recebidos durante a incubação, com 8 repetições de 10 pintinhos cada. As aves receberam ração e água *ad libitum*. As aves e sobras de ração foram pesados nos dias 7, 14 e 21 para cálculo do consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar nos períodos. A taxa de eclodibilidade, o rendimento do pintinho ao nascimento e peso dos órgãos não foram afetados pela inoculação de níveis crescentes de putrescina. As vilosidades intestinais ao nascimento foram maiores nos grupos suplementados com putrescina ($P < 0,001$). Ao nascimento as quantidades de glicogênio hepático foram maiores nos grupos com os menores níveis de putrescina e diminuíram com o aumento das doses de putrescina ($P = 0,017$). O desempenho das aves até os 21 dias de criação não foi influenciado pela inoculação de putrescina *in ovo*. Portanto, a inoculação de putrescina promoveu maiores vilosidades intestinais dos pintinhos ao nascimento. Rendimento da incubação e desempenho não foram afetados com a inoculação de putrescina *in ovo*.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, nutrição do embrião, 1,4-diaminobutano, desenvolvimento intestinal

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the inoculation of nutrient solutions with increasing levels of putrescine on hatchability, concentration of hepatic and muscular glycogen, intestinal morphometric structure, and performance of broilers during the initial phase. A completely randomized design was conducted with 5 treatments consisting of 4 nutritive solutions with increasing doses of putrescine (0.015%; 0.030%; 0.060%, and 0.090%) and a control group with inoculation of sodium chloride solution (NaCl; 0.9%). At hatch, the following variables were evaluated: hatchability rate; ratio between egg weight and chick weight; ratio between yolk sac, liver, breast and intestine weight, and chick weight; glycogen concentration in the liver and breast; morphologic characteristics of the jejunum and ileum. After hatch, 400 birds were housed in metabolic cages according to the treatments received during the incubation, with 8 replicates of 10 chicks each. All birds and feed leftovers were weighed on days 7, 14, and 21 to calculate feed intake, body weight gain, and feed conversion ratio. The hatchability rate, chick performance at hatch, and organ weight were not affected by the inoculation of increasing levels of putrescine. Intestinal villi at hatch were higher in groups supplemented with putrescine ($P < 0.001$). At hatch, the amounts of hepatic glycogen at hatch were higher in groups with the lowest levels of putrescine and decreased with increasing doses ($P = 0.017$). Growth performance from 1 to 21 days was not influenced by the inoculation of putrescine. In conclusion, the doses of putrescine used in this study promoted higher intestinal villi of chicks at hatch. Incubation yield and performance were not affected by the use of putrescine *in ovo*.

Keywords: embryonic development, embryo nutrition, 1,4-diaminobutane, intestinal development.

1 INTRODUÇÃO

Logo após a eclosão, é necessário que as aves sejam capazes de digerir e absorver os nutrientes fornecidos pela dieta para que alcancem máxima produtividade (VIEIRA; POPHAL, 2000). Porém, nos primeiros dias de vida, o trato digestório dos pintinhos ainda não está fisiologicamente desenvolvido e apresenta funções digestivas limitadas, o que pode diminuir o aproveitamento de nutrientes para o seu crescimento (CAMPOS et al., 2011).

A alimentação do embrião a partir da inoculação de substâncias *in ovo* é capaz de fornecer compostos específicos com a finalidade de antecipar o desenvolvimento do trato gastrointestinal; aumentar as reservas de glicogênio; aumentar a taxa de crescimento e a eficiência alimentar das aves (UNI; FERKET, 2004).

Dentre os compostos com potencial a ser utilizado *in ovo* para os embriões de aves encontra-se a putrescina. A putrescina é uma molécula orgânica de baixo peso molecular sintetizada, nos tecidos animal, a partir da ornitina por meio da ornitina descarboxilase (ODC), que é a etapa limitante da taxa na biossíntese desta poliamina (TABOR; TABOR, 1976; LIU et al., 2019). A putrescina apresenta estrutura química simples ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$), solúvel em água, mais facilmente metabolizada pelo embrião, e, portanto, indicada para administração *in ovo* (JANNE, et al., 1978), (GOES et al., 2020). Possui um papel importante na regulação da síntese dos ácidos nucléicos; modulação da estrutura do DNA e tradução do mRNA, desempenhando funções essenciais na proliferação, crescimento e diferenciação celular (TABOR; TABOR, 1984; MATTHEWS, 1993; WALLACE, et al., 2003; NOWOTARSKI, et al., 2013; HUSSAIN et al., 2017; LIU et al., 2019). Como a proliferação e migração celular são importantes para manutenção da morfologia e função da mucosa (LIU et al., 2019), a suplementação de putrescina pode promover o desenvolvimento precoce do trato intestinal, aumentando as taxas de crescimento das aves (SMITH, et al., 2000).

A putrescina possui função essencial no intestino delgado ao formar succinato via gama-aminobutírico (GABA) e servir como uma fonte de metabolização instantânea de energia prontamente disponível (BARDÓCZ, et al., 1998). Os autores observaram que em ratos em jejum, apesar de uma diminuição nas concentrações de putrescina nos tecidos do intestino delgado, a captação de putrescina da

circulação foi significativamente aumentada e mais de 80% imediatamente convertida em succinato, sendo possível que a putrescina disponibilizada pela circulação sistêmica possa fornecer energia metabolizável rápida ao intestino.

A putrescina foi testada como nutriente em dietas para frango de corte em um estudo conduzido por Smith et al. (2000), onde a inclusão de putrescina na dieta resultou em maior taxa de crescimento, maior peso percentual de intestino em relação ao peso corporal do animal e aves mais pesadas na fase de crescimento. Em um estudo recente, Goes et al. (2020) avaliaram pela primeira vez a putrescina como componente de soluções nutritivas *in ovo*. Os autores observaram um efeito trófico que favoreceu o peso intestinal após o nascimento, porém, com dois dias após eclosão houve um aumento no número de células caliciformes, o que pode ter afetado negativamente a taxa de conversão alimentar aos sete dias.

Como não há registro do limite tóxico de putrescina para embriões de aves na literatura, com base no estudo de Goes et al. (2020), optou-se por testar doses inferiores a 0,1% de putrescina *in ovo*, a fim de entender melhor os efeitos dessa substância sobre os embriões de frangos de corte. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de soluções nutritivas contendo níveis crescentes de putrescina inoculados *in ovo* sobre o rendimento da incubação, morfometria intestinal, concentração de glicogênio hepático e muscular ao nascimento e no período pós-natal, além de avaliar os indicadores zootécnicos durante a fase inicial de criação de frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA SCA) da Universidade Federal Do Paraná. O presente estudo teve a duração total de 42 dias, sendo os 21 dias iniciais necessários para o período de incubação e os 21 dias após o nascimento necessários para a avaliação do desempenho das aves.

2.1 SELEÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS

Foram incubados um total de 640 ovos provenientes de um lote de matrizes com 34 semanas de idade, da linhagem Ross[®], oriundos de um matrizeiro comercial. Os ovos foram pesados individualmente e em seguida foram selecionados ovos com o peso médio de $64,42 \pm 0,82$ gramas, livres de trincas, deformidades ou sujidades. Antes da entrada no incubatório, os ovos foram desinfetados com uma solução de formaldeído e permanganato de potássio na proporção de 2:1, (14ml de formol para 7g de permanganato de potássio por metro cúbico) e permaneceram na sala de estocagem por 3 dias sob temperatura constante de 19 °C.

No dia da incubação os ovos foram submetidos ao pré-aquecimento por 6 horas a temperatura de 26 °C e umidade de 65% e em seguida foram distribuídos na incubadora (Avicomave[®], Iracemápolis, Brasil) e mantidos a temperatura de 37,5 °C e 55% de umidade até o momento da inoculação, as 408 horas (17 dias). Para assegurar que todos os ovos fossem inoculados no mesmo momento de desenvolvimento embrionário, no início do processo de incubação, as bandejas foram inseridas na incubadora com 60 minutos de intervalo entre elas.

Os ovos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos constituídos por 4 soluções nutritivas contendo doses crescentes de putrescina (PUT 0,015%, PUT 0,030%, PUT 0,060% e PUT 0,090%) e um grupo controle inoculado com solução de cloreto de sódio (NaCl; 0,9%). Cada tratamento foi composto por 128 ovos divididos em 8 repetições de 16 ovos cada. No 10º dia de incubação, os ovos foram submetidos a ovoscopia para descarte de ovos inférteis e com mortalidade embrionária precoce.

2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES NUTRITIVAS E INOCULAÇÃO

As soluções nutritivas a base de putrescina foram preparadas em laboratório previamente higienizado, com equipamentos e utensílios estéreis e sob uma capela

de fluxo laminar, a fim de evitar a contaminação microbiológica. Para preparação das soluções, a putrescina ($\geq 99,0\%$ pureza; Sigma[®], SP, Brasil) foi diluída em solução salina esterilizada (0,9%). O pH e osmolaridade das soluções foram analisadas com um pHmetro (Gehaka-PG1800) e um osmômetro (Knauer-K7400S), respectivamente, uma vez que o pH inferior à 4 e a osmolaridade superior a 800 mmol/kg podem interferir e dificultar o desenvolvimento embrionário (UNI; FERKET, 2003). Os valores de pH das soluções com concentrações crescentes de putrescina (0,015%, 0,030%, 0,060% e 0,090%) foram de 8,43, 9,64, 9,93 e 10,26 respectivamente. Para osmolaridade, os resultados foram de 285 mmol/kg na solução 0,015%, 296 mmol/kg na solução 0,030%, 297 mmol/kg nas soluções 0,060% e 0,090% de putrescina.

O procedimento de injeção *in ovo* das soluções foi baseado no descrito por Uni e Ferket (2003). A inoculação *in ovo* das soluções ocorreu no 17º dia de incubação (408 horas), em sala previamente higienizada e aquecida com temperatura constante de 36 °C. As soluções foram mantidas em banho maria a 37,5 °C para evitar que variações térmicas afetassem o embrião no momento da inoculação. Os ovos foram retirados da incubadora e levados para a sala de inoculação, onde foi realizada a ovoscopia a fim de observar a posição do embrião, do líquido amniótico e dos vasos de maior calibre. Após serem desinfetados com álcool 70%, os ovos foram perfurados na região da câmara de ar com auxílio de um perfurador manual de inox (Kitchen Craft[®]). Na sequência, 0,5 ml da solução foi injetada diretamente no líquido amniótico de cada embrião conforme seu tratamento correspondente por meio de agulhas de 3 mm e seringas de 1 ml. Imediatamente após a inoculação, o orifício dos ovos foi selado com cera de abelha em seguida os ovos foram transferidos para o nascedouro (Avicomave[®], Iracemápolis, Brasil) e mantidos à temperatura de 36,8 °C com 68% de umidade até o momento do nascimento.

2.3 VARIÁVEIS DE RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO

O nascedouro foi aberto após 504 horas de incubação (21 dias) e os pintinhos foram retirados. Os pintinhos foram então pesados e a sexagem foi realizada por meio da observação do empenamento das asas das aves de acordo com o manual da linhagem (AVIAGEN, 2018). A relação entre o peso do ovo e o peso do pintinho

foi determinada pelas médias do peso dos animais ao nascimento e o peso do ovo antes da incubação: $(\text{peso médio do pintinho (g)} * 100) / \text{peso médio do ovo (g)}$.

Logo após a abertura dos nascedouros, 6 aves de cada tratamento foram selecionadas e submetidas ao procedimento de eutanásia, onde gema, fígado, intestino total e peito foram pesados com balança de precisão (Bioprecisa®-FA2104N) para calcular seu peso relativo em relação ao peso corporal do pintinho $(\text{g de tecido} / \text{g de peso corporal}) * 100$.

Ao final do período de incubação foi realizado o embriodiagnóstico e os ovos não eclodidos foram abertos individualmente e classificados conforme a fase de desenvolvimento embrionário no momento da morte (WILSON, 2004; TULLETT, 2010).

A taxa de eclodibilidade foi calculada pelo número de pintinhos eclodidos em relação ao número de ovos férteis e expressa em percentual.

2.4 ANÁLISE DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

A avaliação de glicogênio hepático e muscular foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito por Hassid et al., (1957) e Dal Pont et al., (2019) e expressos em mg/g de tecido úmido. Para isso, o fígado e o músculo peitoral de 6 pintinhos por tratamento foram coletados logo após a eclosão, pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -20°C até o momento das análises.

2.5 ANÁLISE DE MORFOLOGIA INTESTINAL

A análise das variáveis morfométrica da mucosa intestinal foram realizadas ao nascimento e no 4° dia pós-eclosão. Em cada idade foram coletados fragmentos de 4 cm do jejuno (2 cm acima do divertículo da gema) e do íleo (2 cm abaixo do divertículo da gema) de 6 aves por tratamento. Amostras dos segmentos intestinais foram seccionadas longitudinalmente, estendidas em papel firme, grampeadas pelas extremidades, lavadas cuidadosamente com solução salina 0,9%, e fixadas em formol tamponado a 10%. Para determinar a altura dos vilos, profundidade de cripta e número de células calciformes foram realizados cortes histológicos com 5 μm de espessura, fixado em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (HE) e alcian blue (AB). A leitura das lâminas das porções intestinais foi realizada através de um

microscópio óptico (LEICA®-DM500) acoplado a uma câmera (TOUPCAM®) com captura de imagens pelo programa (TOUPVIEW®).

Foram avaliados 10 vilos e criptas por ave para determinação da altura das vilosidades (VI), da profundidade das criptas (CR) e da contagem de células caliciformes. A altura dos vilos foi mensurada a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas até o seu ápice, e as criptas, da base até a região de transição cripta:vilo. As células caliciformes foram contadas ao longo de 200 µm, na porção intermediária da vilosidade (ROCHA et al., 2014).

2.6 DESEMPENHO

Para o ensaio de desempenho 400 pintinhos foram sexados, alojados e criados até os 21 dias de idade, de acordo com os 5 tratamentos da inoculação. Os pintinhos foram alojados em gaiolas metálicas medindo 0.98m x 0.45m x 0.50m (comprimento x largura x altura), equipadas com comedouro e bebedouro tipo calha. O controle de temperatura da sala foi feito conforme manual da linhagem Ross®. A ração fornecida foi idêntica para todos os tratamentos e formulada à base de milho e farelo de soja, de acordo com as exigências nutricionais das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (ROSTAGNO et al, 2017) para a fase inicial de criação (Tabela 1).

As variáveis de desempenho foram obtidas semanalmente (1, 7, 14 e 21 dias) por meio da pesagem das aves, da ração ofertada e das sobras de ração, para cálculo do consumo de ração médio (CRM), ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA) no período acumulado, corrigidos para o peso das aves mortas.

TABELA 1. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DA DIETA EXPERIMENTAL

Ingredientes (%)	Dieta Inicial
Milho	57,063
Farelo soja	38,500
Óleo soja	1,000
Fosfato bicálcico	1,000
Calcário	1,170
Sal	0,510
DL-metionina	0,264
L-lisina	0,111
L-treonina	0,032
Cloreto colina	0,100
Premix vitamínico ¹	0,130
Premix mineral ²	0,050
Enzima fitase ³	0,015
Enzima carboidrase ⁴	0,005
Composição nutricional calculada	
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.947
Proteína bruta (%)	21,994
Extrato etéreo (%)	3,758
Fibra bruta (%)	2,507
Cálcio (%)	0,893
Fósforo disponível (%)	0,448
Sódio (%)	0,218
Cloro (%)	0,379
Lisina digestível (%)	0,568
Metionina digestível (%)	0,888
Metionina + Cistina digestível (%)	0,570
Cistina digestível (%)	0,236
Arginina digestível (%)	1,199
Triptofano digestível (%)	0,779
Treonina digestível (%)	0,915
Valina digestível (%)	0,880
Isoleucina digestível (%)	0,740

¹ Suplementação por kg de produto: vitamina A, 14,43 UI; vitamina D3, 234,06 UI; vitamina E, 19,48 ppm; vitamina K3, 10,16 ppm; vitamina B1, 31,20 ppm; vitamina B2, 15,56 ppm; ácido pantotênico, 0,78 ppm; vitamina B6, 0,058; vitamina B12, 7,78 ppm; ácido nicotínico, 78,03 ppm; ácido fólico, 194,93 ppm; biotina, 1596,39 ppm.

² Suplementação por kg de produto: selênio, 0,2250 ppm; cobre, 7,50 ppm; ferro, 30,00 ppm; iodo, 0,513 ppm; manganês, 45,00 ppm; zinco, 45,00 ppm.

³ Ronozyme Hiphos (CT) 20.000 FYT /g de produto.

⁴ Ronozyme HiStarch (CT) 80 KNU/g de produto.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de incubação foram analisados de acordo com delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os dados de desempenho considerou-se como bloco o sexo dos animais, e neste caso analisado de acordo com um delineamento em blocos casualizados.

Todos os dados coletados foram submetidos à análise de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos. Em seguida os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para avaliar a relação entre as doses de putrescina e as variáveis de interesse, os dados foram analisados por regressão polinomial. Para isso, considerou-se como estatisticamente significativos valores com $P \leq 0,05$ e marginalmente estatisticamente valores com $P \geq 0,05$ a $\leq 0,1$.

3 RESULTADOS

A taxa de eclodibilidade não foi afetada pela inoculação de putrescina *in ovo* ($P = 0,634$) (Tabela 2). Na avaliação da mortalidade, através do embriodiagnóstico dos ovos não eclodidos, se observou que 86,6% dos embriões morreram na fase considerada tardia (15 a 21 dias de incubação).

TABELA 2. EFEITO DA INOCULAÇÃO DA PUTRESCINA *IN OVO* NA TAXA DE ECLODIBILIDADE (%) AOS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO (504 HORAS)

Dose de putrescina	% Eclodibilidade
CN	74,18
0,015%	78,12
0,030%	71,56
0,060%	74,68
0,090%	68,75
EPM	1,901
P valor	0,634
P linear	0,277
P quadrático	0,637

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl 0,9%)

EPM = Erro padrão da média

A relação de peso do ovo e peso do pintinho não foi afetada pelos diferentes tratamentos ($P = 0,210$) e foi de 69,32%, 70,53%, 67,80%, 71,34%, 69,68% respectivamente para o tratamento controle (solução salina 0,9%), PUT 0,015%, PUT 0,030%, PUT 0,060% e PUT 0,090%. O peso do pintinho ao nascimento não apresentou diferença entre os tratamentos ($P = 0,353$). As variáveis de peso da gema ($P = 0,289$), do fígado ($P = 0,686$), do peito ($P = 0,879$) e do intestino ($P = 0,489$) em relação ao peso corporal do pintinho ao nascimento não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Aos 4 dias após o nascimento o peso corporal da ave ($P = 0,723$) não apresentou diferença estatística, no entanto, o percentual de peso do intestino em relação ao peso corporal do pintinho ($P = 0,054$) apresentou-se marginalmente estatisticamente, com valores numericamente maiores nos tratamentos com PUT 0,015% e PUT 0,060% (Tabela 3).

TABELA 3. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA *IN OVO* NO PERCENTUAL MÉDIO DO PESO DA GEMA (%), FÍGADO (%), PEITO (%) E INTESTINO (%) EM RELAÇÃO AO PESO CORPORAL (PC) DOS PINTINHOS AO NASCIMENTO E PESO CORPORAL (PC) E INTESTINO (%) AOS 4 DIAS APÓS NASCIMENTO

Doses putrescina	Ao nascimento					Aos 4 dias	
	PC(g) ¹	Gema ²	Fígado ²	Peito ²	Intestino ²	PC (g) ³	Intestino ⁴
CN	44,51	14,96	2,40	2,99	4,03	97,16	14,48
0,015%	45,24	12,41	2,56	3,00	4,91	91,23	14,88
0,030%	43,62	13,54	2,53	2,89	4,86	96,73	13,19
0,060%	42,71	11,13	2,63	2,80	4,95	97,86	14,73
0,090%	44,23	11,85	2,70	2,81	4,79	97,23	13,64
EPM	0,402	0,587	0,066	0,060	0,179	1,610	0,228
P valor	0,353	0,289	0,686	0,879	0,489	0,723	0,054
P linear	0,352	0,082	0,313	0,699	0,375	0,536	0,338
P quadrático	0,234	0,352	0,980	0,934	0,267	0,914	0,948

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl 0,9%)

EPM = Erro padrão da média

¹ PC = Peso corporal de 6 animais por tratamento eutanasiados para coleta de dados ao nascimento

² Peso do tecido em relação ao peso corporal de 6 animais por tratamento.

³ PC = Peso corporal de 6 animais por tratamento eutanasiados para coleta de dados aos 4 dias após o nascimento.

⁴ Peso do intestino em relação ao peso corporal de 6 animais por tratamento eutanasiados para coleta de dados aos 4 dias após o nascimento.

Para a concentração de glicogênio hepático (Tabela 4) observou-se uma resposta linear (P- linear = 0,017) decrescente em relação ao aumento das doses de putrescina. Na análise do glicogênio muscular peitoral observou-se efeito quadrático (P - quadrático = 0,022) em resposta aos níveis crescentes de putrescina.

TABELA 4. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA *IN OVO* NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO (Mg / g DE TECIDO ÚMIDO) NO FÍGADO E NO MÚSCULO PEITORAL DE PINTINHOS AO NASCIMENTO

Dose de putrescina	Glicogênio Hepático	Glicogênio
CN	6,406	1,737
0,015%	6,318	2,245
0,030%	7,311	1,981
0,060%	4,958	1,967
0,090%	3,793	1,221
EPM	0,413	0,123
P valor	0,034	0,084
P linear	0,017	0,134
P quadrático	0,064	0,022

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl 0,9%)

EPM = Erro padrão da média

Glicogênio Hepático = $8,392 - 0,6586 \text{ dose}$; $R^2 = 0,1753$

Glicogênio Muscular = $0,0956 + 1,160 \text{ dose} - 0,1613 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,2446$

Todos os dados da avaliação morfológica do jejuno são apresentados na tabela 5. Foi observada influência significativa da concentração de putrescina sobre a morfometria intestinal do jejuno ao nascimento. A altura do vilão (Vilão) apresentou diferença significativa com efeito linear crescente ($P < 0,001$) conforme aumentou-se a concentração de putrescina nas soluções nutritivas, sendo observados os maiores valores (332,98 μm e 318,42 μm) nos tratamentos PUT 0,060% e PUT 0,090%, respectivamente. A profundidade de cripta (Cripta) foi maior no tratamento com PUT 0,060% e PUT 0,090% (72,20 μm e 71,58 μm) respectivamente, onde foi observado efeito quadrático ($P < 0,001$) entre a profundidade de cripta e os níveis crescentes de putrescina nas soluções. Quanto ao número de células calciformes, observou-se diferença significativa com um efeito linear ($P < 0,001$) para o aumento de células calciformes de acordo com o aumento dos níveis de putrescina, demonstrando que os maiores valores foram obtidos nos tratamentos PUT 0,090% (17,91 células em 200 μm) e PUT 0,060% (17,72 células em 200 μm) respectivamente.

Aos quatro dias após o alojamento, observou-se diferença significativa entre os tratamentos para altura do vilão e profundidade de cripta. Para altura do vilão observou-se efeito quadrático ($P < 0,001$), o maior valor (484,50 μm) foi observado no tratamento PUT 0,030% e o menor valor (418,87 μm) no tratamento PUT 0,090%. Para profundidade de cripta verificou-se um efeito linear ($P < 0,001$) sendo que a profundidade de cripta diminuiu linearmente de acordo com aumento dos níveis de

putrescina, com os maiores valores observados nos tratamentos controle e 0,015% (126,54 μm e 125,94 μm) respectivamente, o menor valor foi encontrado no tratamento PUT 0,060% (105,65 μm). Na avaliação do número de células caliciformes observou-se diferença entre os tratamentos com um incremento linear de acordo com o aumento das doses de putrescina ($P < 0,001$), sendo que o menor número de células caliciformes foi observado no tratamento controle negativo (22,60 células em 200 μm) e o maior número no tratamento PUT 0,090% (27,66 células em 200 μm).

TABELA 5. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA *IN OVO* NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO JEJUNO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS PÓS NASCIMENTO

Doses putrescina	Ao nascimento			4º dia após o nascimento		
	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³
CN	287,20	41,65	14,21	441,25	126,54	22,60
0,015%	307,62	57,26	14,26	451,35	125,95	25,36
0,030%	307,82	61,40	16,07	484,50	115,73	24,21
0,060%	332,98	71,58	17,72	456,35	105,65	25,46
0,090%	318,42	72,20	17,91	418,84	114,44	27,66
EPM	3,130	1,110	0,014	5,10	1,684	0,030
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P linear	<0,001	<0,001	<0,001	0,232	<0,001	<0,001
P quadrático	0,063	<0,001	0,949	<0,001	0,084	0,840

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl 0,9%).

EPM = Erro padrão da média

¹ Vilo = Altura da vilosidade (mensurada a partir da região basal até o seu ápice).

² Cripta = Profundidade de cripta (mensurada da base até a região de transição cripta:vilo).

³ Caliciformes = Número de células ao longo de 200 μm na porção intermediária da vilosidade.

Ao nascimento:

Vilo = $275,7 + 8,780 \text{ dose}$; $R^2 = 0,0526$

Cripta = $3,686 + 23,17 \text{ dose} - 1,987 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,3166$

Caliciformes = $11,69 + 1,087 \text{ dose}$; $R^2 = 0,1429$

Aos 4 dias após nascimento:

Vilo = $309,9 + 85,46 \text{ dose} - 11,18 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,0491$

Cripta = $135,5 - 4,451 \text{ dose}$; $R^2 = 0,0467$

Caliciformes = $20,97 + 1,021 \text{ dose}$; $R^2 = 0,0767$

Quanto à avaliação morfológica do íleo (Tabela 6), ao nascimento observou-se diferença para altura do vilo e profundidade de cripta, sendo que tanto para altura

do vilo ($P < 0,001$) quanto para profundidade de cripta ($P = 0,034$) verificou-se uma resposta quadrática para os níveis crescentes de putrescina. O número de células caliciformes diferiu entre os tratamentos com uma resposta quadrática ($P = 0,023$) de acordo com os níveis de putrescina inoculados *in ovo*. Aos 4 dias observou-se diferença estatística para altura do vilo e profundidade de cripta, sendo que a altura do vilo ($P \leq 0,001$) apresentou efeito linear crescente com o aumento dos níveis de putrescina, enquanto para profundidade de cripta ($P = 0,008$) o aumento dos níveis de putrescina resultou em um efeito linear decrescente. O número de células caliciformes apresentou diferença significativa entre os tratamentos com uma resposta quadrática ($P < 0,001$) em relação ao aumento nos níveis de putrescina, sendo que o menor valor foi observado no tratamento controle (25,88 células em 200 μm) e os maiores valores (32,45 e 30,64 células em 200 μm) foram observados nos tratamentos PUT 0,030% e PUT 0,090% respectivamente.

TABELA 6. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA *IN OVO* NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO ÍLEO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS PÓS NASCIMENTO

Doses putrescina	Ao nascimento			4º dia após o nascimento		
	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ²	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³
CN	220,60	52,88	12,89	288,98	96,23	25,88
0,015%	262,73	59,88	15,88	303,00	96,11	29,42
0,030%	263,28	67,43	14,64	290,50	83,93	32,45
0,060%	244,08	66,15	15,79	333,68	97,45	28,56
0,090%	256,45	68,61	15,40	308,18	85,25	30,64
EPM	2,779	1,069	0,013	3,480	1,100	0,333
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P linear	0,006	<0,001	<0,001	≤0,001	0,008	<0,001
P quadrático	<0,001	0,034	0,023	0,321	0,868	<0,001

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl 0,9%)

EPM = Erro padrão da média

¹ Vilo = Altura da vilosidade (mensurada a partir da região basal até o seu ápice).

² Cripta = Profundidade de cripta (mensurada da base até a região de transição cripta:vilo).

³ Caliciformes = Número de células ao longo de 200 μm na porção intermediária da vilosidade.

Ao nascimento:

Vilo = $148,9 + 50,61 \text{ dose} - 5,662 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,0633$

Cripta = $30,00 + 14,00 \text{ dose} - 1,278 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,0968$

Caliciformes = $8,563 + 2,997 \text{ dose} - 0,3130 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,0596$

Aos 4 dias após nascimento

Vilo = $277,2 + 6,909 \text{ dose}$; $R^2 = 0,0808$

Cripta = $100,0 - 2,063 \text{ dose}$; $R^2 = 0,1092$

Caliciformes = $16,11 + 6,477 \text{ dose} - 0,7017 \text{ dose}^2$; $R^2 = 0,0864$

Na avaliação de desempenho, as variáveis de consumo médio de ração (CRM), ganho médio de peso (GPM) e conversão alimentar (CA) nos períodos de 1 a 7, 1 a 14 e 1 a 21 dias após o alojamento não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 7).

TABELA 7. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE PUTRESCINA *IN OVO* NO CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO EM GRAMAS (CRM), GANHO DE PESO MÉDIO EM GRAMAS (GPM) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DAS AVES AOS 7, 14 E 21 DIAS

Doses Putrescina	7 Dias ¹			14 Dias ²			21 Dias ³		
	CRM7	GPM7	CA7	CRM14	GPM14	CA14	CRM21	GPM21	CA21
CN	168,7	133,3	1,269	530,5	408,3	1,301	1173,3	855,4	1,346
0,015%	160,8	122,0	1,271	514,3	393,2	1,309	1114,0	816,6	1,365
0,030%	169,9	132,6	1,290	550,6	414,6	1,338	1187,2	882,2	1,349
0,060%	167,2	133,0	1,240	543,5	414,5	1,317	1186,2	875,7	1,355
0,090%	163,0	128,8	1,294	541,2	414,4	1,311	1181,6	864,2	1,369
EPM	2,614	2,320	0,0124	7,038	6,873	0,012	12,383	10,086	0,006
P valor	0,742	0,454	0,698	0,528	0,849	0,935	0,243	0,242	0,833
P linear	0,740	0,920	0,827	0,373	0,508	0,889	0,326	0,343	0,449
P quad	0,747	0,888	0,565	0,576	0,915	0,488	0,899	0,522	0,793

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl 0,9%).

EPM = Erro padrão da média.

¹ 7 dias = Dados coletados no período de 1 a 7 dias.

² 14 dias = Dados coletados no período de 1 a 14 dias.

³ 21 dias = Dados coletados no período de 1 a 21 dias.

4 DISCUSSÃO

A taxa de eclodibilidade não foi afetada pela inoculação de soluções de putrescina *in ovo*. Neste estudo foram utilizadas doses de putrescina inferiores a 0.1%, conforme recomendado por Goes et al (2020), que observaram uma menor taxa de eclodibilidade nos tratamentos com a inoculação de putrescina *in ovo*, fato que pode estar relacionado com a toxicidade da putrescina para os embriões nas doses utilizadas (0,1%, 0,15% e 0,2%). A osmolaridade das soluções de putrescina ficou abaixo de 800 mOsm, que de acordo com Uni e Ferket (2003) são adequadas para soluções a serem inoculadas *in ovo* sem prejuízos fisiológicos aos embriões e conseqüentemente à eclodibilidade. O pH das soluções apresentou maior alcalinidade de acordo com o aumento das concentrações de putrescina. No ovo, durante o desenvolvimento embrionário o pH oscila conforme a fase do desenvolvimento e os substratos envolvidos no metabolismo do embrião. Ocorre uma interação entre o sangue, âmnio e fluido do alantóide para regular o pH do sangue e do âmnio, que permanecem constantes, enquanto o pH do alantoide diminui (BOUTILIER et al., 1977). O pH do âmnio parece ser tamponado pelo nível de HCO_3^- no alantóide, que atua tanto como fonte de HCO_3^- respiratório quanto sítio de processos de acidificação, uma vez que a partir do 14º dia o nível de HCO_3^- amniótico aumenta e o do alantoide diminui (BOUTILIER et al., 1977; EVERAERT, N.; DECUYPERE, 2013). Assim, tal capacidade de manter o equilíbrio do pH durante o desenvolvimento embrionário pode ser uma possível razão pelo qual o embrião restabelece o equilíbrio ácido básico após a inoculação de soluções alcalinas, sem prejuízos na taxa de eclodibilidade.

Os resultados observados para relação entre o peso do ovo e peso do pintinho ao nascimento corroboram com os resultados encontrados por Goes et al. (2020), onde os autores relataram que diferentes concentrações de putrescina (0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2%) não diferiram do tratamento controle para a relação peso do ovo/peso pintinho ao nascimento.

Os percentuais de peso do peito e do fígado em relação ao peso corporal do pintinho ao nascimento corroboram com os resultados encontrados por Goes et al. (2020), que também não encontraram diferença entre diferentes doses de putrescina utilizadas. No entanto, para o percentual de intestino em relação ao peso do pintinho, os resultados encontrados neste estudo foram distintos aos encontrados

por Goes et al. (2020), que observaram maior percentual de peso do intestino em relação ao peso corporal nas aves inoculadas com putrescina na concentração de 0,15%, dose superior as que foram avaliadas neste estudo.

Em um estudo com suplementação de putrescina na dieta inicial para perus de corte, Smith et al. (2000) avaliaram o efeito dos níveis 0,2%, 0,4% e 0,6% de putrescina e verificaram que as aves que receberam ração com putrescina 0,2% tiveram uma maior taxa de crescimento e peso percentual do intestino em relação ao peso corporal dos animais e concluíram que o desenvolvimento precoce do trato intestinal resulta em maiores taxas de crescimento corporal na fase de crescimento. O maior peso do intestino nestes estudos pode ser atribuído a intensa capacidade da putrescina em atuar na proliferação celular, crescimento e diferenciação da mucosa intestinal (HEBY, 1986; WANG et al., 1991; LIU et al., 2019). Porém, quando a putrescina foi inoculada *in ovo* este efeito de aumento de peso do intestino não foi observado com 24 horas após o nascimento (GOES et al., 2020) e com 48 horas após nascimento neste estudo. Uma hipótese para a ausência de diferença de peso do intestino após o nascimento nos estudos com inoculação *in ovo* pode ser devido a intensa transformação que ocorre no intestino após a eclosão e durante os primeiros dias de vida do pintinho, com a mudança no perfil dos enterócitos para rápida adaptação a dieta exógena (MORAN, 1985; UNI et al., 1995). Com base nisso, observou-se que o fornecimento constante de putrescina através da dieta inicial apresentou melhores resultados para peso do intestino quando comparados a suplementação de putrescina *in ovo*.

A suplementação *in ovo* com putrescina resultou em maior altura dos vilos e profundidade das criptas no jejuno e íleo dos pintinhos ao nascimento. Os efeitos da suplementação de poliaminas são conhecidos por promover a proliferação celular, incluindo células intestinais (WANG et al., 1991; SMITH et al., 2000; LIU et al., 2019). Este papel essencial para a proliferação celular se dá através de seu envolvimento na transdução de sinal e em quase todas as etapas do DNA, RNA e síntese de proteínas. Visto que a renovação celular no epitélio intestinal é maior do que na maioria das outras partes o corpo, as poliaminas podem ser consideradas vitais para a estrutura adequada e funções do trato digestivo (SEIDEL et al., 1985; DUFOUR et al., 1988).

As células caliciformes atuam na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal, pois secretam mucinas glicoprotéicas cuja função primária é de proteger o

epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta durante o desenvolvimento *in ovo* e após a eclosão (UNI; FERKET, 2003). Neste estudo, o aumento de células caliciformes observado nas aves suplementadas com soluções de putrescina são semelhantes ao relatados por Goes et al. (2020), onde as concentrações de putrescina utilizadas para alimentação *in ovo* apresentaram maior número de células caliciformes, sugestivos de uma resposta do tecido intestinal ao possível efeito tóxico da putrescina para o embrião.

No estudo de Goes et al. (2020) os autores observaram maior percentual de peito nas aves suplementadas com putrescina, fato que poderia estar relacionado com a capacidade da putrescina de disponibilizar energia prontamente para o intestino, poupando energia de outras fontes utilizadas durante a fase final do desenvolvimento embrionário, como por exemplo aminoácidos glicogênicos do músculo peitoral (KEIRS et al., 2002), evitando assim a perda de tecido. Bardócz et al. (1998) observaram que as poliaminas podem ser catalisadas na forma de um ácido conhecido como gama-aminobutírico, que é subseqüentemente convertido para succinato e incorporado no ciclo de Krebs, portanto podem servir como uma fonte de metabolização instantânea de energia, suporte às necessidades metabólicas do tecido intestinal e possivelmente aumentar os níveis de glicogênio no fígado e músculos. Neste estudo, observamos que a quantidade de glicogênio hepático foi maior nos tratamentos com menores níveis de suplementação de putrescina (PUT 0,015% e PUT 0,030%), diminuindo linearmente com o acréscimo de putrescina nas soluções. Resultados similares foram observados na avaliação do glicogênio do músculo peitoral, onde os tratamentos PUT 0,015%, 0,030% e 0,060% apresentaram as maiores quantidade de glicogênio por grama de tecido. No entanto, a maior concentração de putrescina não apresentou o mesmo efeito de poupar energia em forma de glicogênio hepático ou do músculo peitoral, o que pode estar associado a um efeito negativo em relação as maiores concentrações de putrescina (PUT 0,09%) como observado por Goes et al. (2020) que relatou possíveis efeitos tóxicos em doses superiores a 0,1%.

Os resultados obtidos neste estudo para desempenho dos animais nos períodos avaliados não apresentaram diferenças entre os tratamentos. No estudo de Goes et al. (2020) os autores observaram pior conversão alimentar, aos 7 dias, em aves alimentadas *in ovo* com soluções de putrescina de maior concentração, o que pode estar relacionado ao maior gasto energético para atender às demandas de

energia para a maturação intestinal, manter o crescimento das vilosidades, estimular a produção de mucina e a manutenção do tecido intestinal. Por outro lado, Smith et al. (2000) argumentam que a suplementação de putrescina pode promover o crescimento de perus no período inicial e que esse desenvolvimento precoce do trato intestinal resulta em aumento das taxas de crescimento das aves na fase de recria.

O fato de a putrescina *in ovo* não ter influenciado no desempenho, neste estudo, pode estar relacionado ao período logo após a eclosão. Nesse momento se inicia uma intensa proliferação de novos enterócitos, formados na cripta de Lieberkühn, migrando para o topo das vilosidades (MORAN, 1985) e que podem interferir no efeito da putrescina inoculada *in ovo* e no desempenho subsequente, visto que estes novos enterócitos se desenvolvem com orientação seletiva para a digestão dos grupos nutricionais presentes nos alimentos da dieta exógena (MORAN, 1985; UNI et al., 1999; VIEIRA; POPHAL, 2000; REICHER et al., 2020).

Portanto, como o período logo após a eclosão é muito complexo e com importantes mudanças na morfologia intestinal precisamos entender melhor com a interação entre a putrescina e a transição da nutrição embrionária à base de ovo, à nutrição através da dieta influenciam no desenvolvimento do trato gastrointestinal, consumo de ração e consequente desempenho de frangos de corte na fase inicial.

5 CONCLUSÃO

O rendimento de incubação e o desempenho não foram afetados pelo uso da putrescina *in ovo* nos níveis (0,015%, 0,030%, 0,060% e 0,090%). A inoculação de putrescina *in ovo* promoveu maiores vilosidades intestinais dos pintinhos ao nascimento.

REFERÊNCIAS

- AVIAGEN. Ross broiler management handbook. 2018. Disponível em: <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-BroilerHandbook2018-EN.pdf> Acesso em 01 de set. de 2019.
- AVIAGEN. Ross How to... Hatchery. 2017. Disponível em: <http://eu.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Resources_Tools/Ross_How_Tos/RossHatcheryHowToSummary-1to11-EN17.pdf> Acesso em 01 de set. de 2019.
- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; PUSZTAI, A. Putrescine as a source of instant energy in the small intestine of the rat. **Gut**, v. 42, p. 24-28, 1998.
- BOUTILIER, R.G.; GIBSON, M.A.; TOEWS, D.P.; ANDERSON, W. Gas exchange and acid-base regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo. **Respiration Physiology**, v. 31, p. 81-89, 1977.
- CAMPOS, A.M.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; DA SILVA, E.A.; ALBINO, L. F.T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1712–1717, 2011.
- DAL PONT, G.C.; GOES, E.C.; DA SILVA, K.F.; DE OLIVEIRA, S.G.; DA ROCHA, C.; MAIORKA, A. Glycerol in ovo feeding as an energy substrate improves performance of broilers from young breeders. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, p.1453–1461, 2019.
- DUFOUR, C.; DANDRIFOSSE, G.; FORGET, P.; VERMESSE, F.; ROMAIN, N.; LEPOINT, P. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. **Gastroenterology**, v. 95, p. 112–116, 1988.
- EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: Macari M. et al. Manejo da incubação. **FACTA**, p. 31-45, 2013.
- GOES, E.C.; CARDOSO DAL PONT, G.; OLIVEIRA, P.R.; DA ROCHA, C.; MAIORKA, A. Effects of putrescine injection in broiler breeder eggs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p.1–11, 2020.
- HASSID, W.Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 34–50, 1957.
- HEBY, O. Putrescine, Spermidine, and Spermine. **Physiology**, v. 1, p. 12–15, 1986.
- HUSSAIN, T.; TAN, B.; REN, W.; RAHU, N.; KALHORU, D.H.; YIN, Y. Exploring polyamines: Functions in embryo/fetal development. **Animal Nutrition**, v. 3, p. 7–10, 2017.
- JÄNNE, J.; PÖSÖ, H.; RAINA, A. Polyamines in rapid growth and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 473, p. 241-293, 1978.

KEIRS, R.W.; PEEBLES, E.D.; HUBBARD, S.A.; WHITMARSH, S.K. Effects of supportive gluconeogenic substances on the early performance of broilers under adequate brooding conditions. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 367–372, 2002.

LIU, B.; JIANG, X.; CAI, L.; ZHAO, X.; DAI, Z.; WU, G.; LI, X. Putrescine mitigates intestinal atrophy through suppressing inflammatory response in weanling piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2019.

MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I.S.; NAAS, I.A; MARTINS, P.C. Manejo da Incubação (3ª Edição). Jaboticabal, SP: **FACTA**, 2013.

MATTHEWS, H.R. Poliaminas, estrutura da cromatina e transcrição. **BioEssays**, v. 15, p. 561-566, 1993.

MORAN, E.T. JR. Digestion and Absorption of Carbohydrates in Fowl and Events through Perinatal Development. **The Journal of nutrition**, v. 115, p. 665-674, 1985.

NOWOTARSKI, S.L.; WOSTER, P.M.; CASERO, R.A. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15:e3, 2013.

REICHER, N.; MELKMAN-ZEHAVID, T.; DAYAN, J.; UNI, Z. It's All About Timing: Early Feeding Promotes Intestinal Maturation by Shifting the Ratios of Specialized Epithelial Cells in Chicks. **Frontiers in Physiology**, 2020.

ROCHA, C.; DURAU, J.F.; BARRILLI, L.N.E.; DAHLKE, F.; MAIORKA, P.; MAIORKA, A. The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. **American Historical Review**, v. 119, p. 71–79, 2014.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; DE OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C., ... Euclides, R. Tabelas brasileiras para suínos e aves. In **Composição de alimentos e exigências nutricionais**, 2017.

SEIDEL, E.R.; HADDOX, M.K.; JOHNSON, L.R. Ileal mucosal growth during intraluminal infusion of ethylamine or putrescine. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 249, p. 1857-1985, 1985.

SMITH, T.K. Effect of Dietary Putrescine on Whole Body Growth and Polyamine Metabolism. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1990.

SMITH, TREVOR K; TAPIA-SALAZAR, M.; RICQUE-MARIE, D. Feed- Feed - borne biogenic amines : Natural toxicants or growth promoters ? 1. **Biogenic Amines**, v. 10(8), p. 24–32, 2000.

TABOR, C.W.; TABOR, H. 1,4-Diaminobutane (Putrescine), Spermidine, and Spermine. **Annual Review of Biochemistry**, 1976.

TABOR, C.W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, p. 749-790, 1984. Disponível em: <www.annualreviews.org by Purdue University Indianapolis> Acessado em mai. de 2020.

TULLETT, S. Como Investigar as Práticas de Incubação. **Ross Tech**. 2010. Disponível em: <http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ross-Tech-SET-2010.pdf> Acessado em jun. de 2020.

UNI, Z.; FERKET, P. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding of enteric modulators. 2003. **US Regular Patent**, US 8734837 B2, v. 6. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8734837>>. Acessado em jun. de 2020.

UNI, Z.; FERKET, P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60(1), p. 101–111, 2004.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre - and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320-327, 2003a.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch Changes in Morphology and Function of the Small Intestines in Heavy- and Light-Strain Chicks. **Poultry Science**, v. 74, p. 1622-1629, 1995.

UNI, Z., NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch Development of Small Intestinal Function in the Poult. **Poultry Science**, v. 78, p. 215-222, 1999.

VIEIRA, S.; POPHAL, S. Nutrição Pós-Eclosão de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 189–199, 2000.

WALLACE, H.M.; FRASER, A.V.; HUGHES, A.A perspective of polyamine metabolism. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 1–14, 2003.

WANG, J.Y.; MCCORMACK, S.A.; VIAR, M.J.; JOHNSON, L.R. Stimulation of proximal small intestinal mucosal growth by luminal polyamines. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 1991.

WILSON, H.R. Hatchability Problem Analysis. Animal Science, University of Florida. 2004. Disponível em: <https://www.cluckinggoodpoultry.com.au/uploads/1/1/5/6/115683901/hatchability_problem_analysis.pdf> Acessado em abr. de 2020.

CAPÍTULO 3 - EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES A BASE DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO *IN OVO* NO RENDIMENTO DA INCUBAÇÃO E DESEMPENHO DE AVES DE CORTE

“Effect of the inoculation of solutions based on putrescine, maltose, sucrose and β -hydroxy- β -methylbutyrate *in ovo* on hatchability and performance of broilers.”

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar soluções nutritivas a base de putrescina (PUT), associadas à maltose (M), sacarose (S) e/ou β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) e investigar se essas soluções são capazes, além de beneficiar a estrutura morfológica do trato gastrintestinal, de aumentar a reserva de energia do pintinho para o momento da eclosão e melhorar o desempenho na fase inicial. Foram avaliados 4 tratamentos constituídos por PUT a 0,015%, PUT 0,015% + M (25 g/L) + S (25 g/L), PUT 0,015% + HMB (0,1%) e PUT 0,015% + M (25 g/L) + S (25 g/L) + HMB (0,1%), além de um tratamento controle, com inoculação de solução fisiológica (NaCl, 0,9%). Ao nascimento e aos 4 dias pós eclosão, foram avaliados os percentuais do saco da gema, do fígado, do peito e do intestino em relação ao peso do animal (PC). Fragmentos de jejuno e íleo dos pintinhos foram coletados para avaliação da morfologia intestinal. Ainda ao nascimento, foram coletadas amostras de fígado e peito para mensuração da concentração de glicogênio. Aos 7, 14 e 21 dias foram avaliados o consumo médio de ração, ganho médio de peso e conversão alimentar. Ao nascimento, o peso da gema apresentou-se significativamente ($P = 0,025$) maior no tratamento PUT 0.015%. Com 4 dias, o peso da ave ($P < 0,001$) e o percentual do peso do peito em relação ao peso corporal ($P = 0,023$) foram significativamente menores no tratamento com a inoculação de PUT + M + S + HMB. Para altura das vilosidades (VI) e profundidade de cripta (CR) ao nascimento foram maiores nas aves que receberam PUT + M + S. Aos 21 dias, as variáveis de desempenho não diferiram entre os tratamentos. Portanto, a inoculação da solução de PUT associada a M, S e HMB influenciou de forma negativa a taxa de eclodibilidade. Aos 21 dias as variáveis de desempenho não foram afetadas pela suplementação *in ovo*. A inoculação *in ovo* de PUT+M+S+HMB influenciou positivamente no desenvolvimento das vilosidades intestinais ao nascimento.

Palavras-chave: 1-4 diaminobutano, nutrição do embrião, dissacarídeos, hidroximetil-butirato.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate putrescine-based nutritional solutions (PUT), associated with maltose (M), sucrose (S) and / or β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) and investigate whether these solutions are capable, in addition to benefit the morphological structure of the gastrointestinal tract, to increase the energy reservation of the chick at the time of hatching and improve performance in the initial phase. Four treatments were evaluated, constituted by PUT 0.015%, PUT 0.015% + M (25 g / L) + S (25 g / L), PUT 0.015% + HMB (0.1%) and PUT 0.015% + M (25 g / L) + S (25 g / L) + HMB (0.1%), in addition to a control treatment, with inoculation of saline solution (NaCl, 0.9%). At hatch and 4 days after hatching, the percentage of the yolk sac, liver, breast and intestine in relation to the animal's weight (BW) were evaluated. Fragments of chicks' jejunum and ileum were collected to evaluate intestinal morphology. At hatch, liver and breast samples were collected to measure glycogen concentration. At 7, 14 and 21 days the average feed intake, average weight gain and feed conversion were evaluated. At hatch, the yolk weight was significantly ($P = 0.025$) higher at treatment PUT 0.015%. At 4 days, the bird's weight ($P < 0.001$) and the percentage of the breast weight in relation to the body weight ($P = 0.023$) were significantly lower in the treatment with the inoculation of PUT + M + S + HMB. For villus height (VH) and crypt depth (CD) at hatch, they were higher in birds that received PUT + M + S. At 21 days, the performance variables did not differ between treatments. Therefore, the inoculation of the PUT solution associated with M, S and HMB negatively influenced the hatchability rate. At 21 days, performance variables were not affected by *in ovo* supplementation. *In ovo* inoculation of PUT + M + S + HMB positively influenced the development of intestinal villi at hatch.

Keywords: 1-4 diaminobutane, embryo nutrition, disaccharides, hydroxymethyl-butyrate.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento inicial do trato digestivo é crucial para que as aves alcancem o máximo crescimento e a máxima eficiência alimentar, uma vez que o seu crescimento e desenvolvimento são dependentes da rápida digestão e absorção de nutrientes, que por sua vez, é resultado direto do desenvolvimento funcional e morfológico do intestino (UNI et al., 1999; TAKO et al., 2004).

Para estimular o desenvolvimento precoce do trato gastrointestinal pode-se utilizar como estratégia a nutrição *in ovo*. Essa técnica consiste na inoculação de compostos com efeitos benéficos para o embrião, antes do momento da eclosão (UNI et al., 2003). Com a maior disponibilidade de nutrientes pode-se aumentar a quantidade de energia disponível para o embrião, antecipar o desenvolvimento intestinal e conseqüentemente aumentar a taxa de crescimento e o desempenho dos animais (UNI; FERKET, 2004; UNI; FERKET 2010; KORNASIO et al., 2011; DAL PONT et al., 2019; GOES et al., 2020).

Diversos estudos com nutrição *in ovo* buscam soluções nutritivas que potencializem a produtividade dos animais, desde o nascimento do pintinho até o momento do abate dos frangos. Assim, diversas substâncias vêm sendo testadas, como carboidratos (ZHAI et al., 2011; BHANJA et al., 2015; ABOUSAAD et al., 2017), proteínas e HMB (FOYE et al., 2006; FOYE et al., 2007; KORNASIO et al., 2011), a putrescina (GOES et al., 2020) e associações de diferentes compostos, como maltose, sacarose, dextrina e β -hidroxi- β -metilbutirato (UNI et al., 2005).

A putrescina, possui funções intracelulares essenciais, como a modulação da estrutura do DNA e a tradução do mRNA, destacando a sua participação no processo de divisão celular, especialmente no crescimento e diferenciação da mucosa intestinal (HEBY, 1986; WANG, et al., 1991; HUSSAIN et al., 2017; LIU, et al., 2019). A putrescina na nutrição *in ovo* estimulou o desenvolvimento das vilosidades intestinais ao nascimento, como relatado em um estudo conduzido por Goes et al. 2020.

Uni et al. (2003) sugeriram que a inoculação de carboidratos *in ovo* prepara a estrutura para a ingestão pós-eclosão de ração exógena rica em carboidratos, uma vez que, os autores relataram mudanças importantes na expressão, localização e capacidade das enzimas da borda em escova. Ainda de acordo com estudos de Tako et al. (2004), embriões que receberam suplementação de carboidratos *in ovo* tiveram

maior atividade da maltase antes e depois da eclosão. Além disso, a alimentação *in ovo* com carboidratos pode elevar a concentração de glicogênio hepático no embrião (TAKO et al., 2004; UNI et al., 2005), evitando que esses animais utilizem a energia proveniente da depleção de proteínas e garantindo reservas suficientes de glicose para suportar a fase crítica da eclosão.

A fim de alcançar máximo desempenho das aves tem-se buscado também soluções com efeitos positivos sobre a produção de massa muscular. Assim, um estudo com nutrição *in ovo* tem mostrado o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) como uma substância em potencial para a promoção de maior desenvolvimento muscular devido aos seus efeitos poupadores de massa magra e por incrementar as reservas de glicogênio (TAKO et al., 2004).

Os efeitos do HMB, sacarose e maltose foram estudados por alguns autores (TAKO et al., 2004; UNI et al., 2005), entretanto, o uso de tais compostos associados a putrescina em uma única solução nutritiva ainda não foi avaliada.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar o potencial biológico de soluções nutritivas a base de putrescina, sacarose, maltose e β -hidroxi- β -metilbutirato inoculadas em ovos embrionados sobre o rendimento de incubação, concentração de glicogênio hepático e muscular, morfometria intestinal, e desempenho de frangos de corte durante a fase inicial de criação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA SCA) da Universidade Federal do Paraná.

2.1 SELEÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS

Para este estudo foram utilizados 640 ovos de um lote comercial de matrizes de corte da linhagem Ross® com 32 semanas de produção. Antes da entrada no incubatório, os ovos foram fumigados com formaldeído (37%) e permanganato de potássio 2:1 (14ml de formol para 7g de permanganato de potássio por metro cúbico). Em seguida, os ovos foram pesados individualmente (62.39 ± 0.28 g) e selecionados aqueles livres de trincas, deformidades ou sujidades. Na sequência, os ovos foram levados para sala de armazenamento onde permaneceram estocados por 3 dias sob a temperatura constante de 19°C. No dia da incubação, os ovos foram transferidos para a sala de pré-aquecimento, onde permaneceram por um período de 6 horas sob temperatura de 26°C e umidade de 65%. Após o pré-aquecimento, os ovos foram direcionados para uma máquina de incubação automática (Avicomave®, Iracemápolis, Brasil) e mantidos a temperatura de 37,5°C e 55% de umidade relativa até o 17º dia de incubação.

O delineamento experimental realizado foi inteiramente ao acaso, sendo 5 tratamentos com 8 repetições de 16 ovos cada. Os grupos experimentais foram constituídos por 4 soluções nutritivas e um grupo controle com inoculação de solução fisiológica a 0,9% (NaCl; 0,9%). As soluções nutritivas foram compostas por putrescina (PUT) a 0,015%, PUT 0,015% associada à maltose (M) 25 g/L e sacarose (S) 25 g/L, PUT 0,015% associada ao β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) 0,1% e todos os compostos associados (PUT 0,015%, M (25g/L), S (25g/L) e HMB (0,1%).

No 10º dia de incubação foi realizada a ovoscopia para a retirada dos ovos inférteis ou com mortalidade precoce.

2.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES NUTRITIVAS E INOCULAÇÃO

As soluções nutritivas a base de putrescina utilizadas na inoculação foram preparadas em laboratório previamente higienizado e equipado com capela de fluxo laminar horizontal. Todos os utensílios utilizados na preparação destas soluções foram previamente esterilizados a fim de evitar a contaminação microbológica. Para

a preparação das soluções foi utilizado a putrescina (> 99,0% pureza; Sigma®, SP, Brasil), maltose (>99,0% pureza, Sigma®, SP, Brasil), sacarose (>99,5% pureza; Sigma®, SP, Brasil), e HMB (>99,9% pureza; Fagron®, SP, Brasil). Após a preparação foram analisados o pH e a osmolaridade das soluções com um pHmetro (Gehaka-PG1800) e um osmômetro (Knauer-K7400S), respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8. VALORES DE pH E OSMOLARIDADE (mmol/kg) DAS SOLUÇÕES A BASE DE PUTRESCINA ASSOCIADAS A MALTOSE (M), SACAROSE (S) E BETA-HIDROXI-METIL-BUTIRATO (HMB)

Tratamento	pH	Osmolaridade
PUT	8,45	296
PUT + S + M	8,46	451
PUT + HMB	7,76	320
PUT + S + M + HMB	7,76	468

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%).

No 17º dia de incubação (408 horas), a sala de inoculação foi aquecida a 36°C e as soluções foram mantidas em banho maria a 37,5°C, a fim de evitar variações térmicas para o embrião. Em seguida, os ovos foram retirados da incubadora e levados para a sala de inoculação. Para determinar o local exato da perfuração foi realizada a ovoscopia, na qual se observou a posição do embrião, grandes vasos e do líquido amniótico. Os ovos foram desinfetados com álcool 70% e então a casca foi perfurada na região da câmara de ar com auxílio de um perfurador manual de inox (Kitchen Craft®). Para a inoculação, foram utilizadas agulhas hipodérmicas (3mm) acopladas em seringas de 1 ml. Na sequência, 0,5 ml da solução foi injetada no líquido amniótico de cada embrião conforme o tratamento correspondente. Após a inoculação os ovos foram selados com cera de abelha e 2 ovos de cada repetição foram acondicionados em sacos permeáveis para estabelecer a relação de peso do ovo e peso do pintinho. Os ovos foram transferidos para o nascedouro (Avicomave®, Iracemápolis, Brasil) e mantidos a temperatura de 36,8°C com 68% de umidade relativa até o momento do nascimento. Para assegurar que todos os ovos fossem inoculados no mesmo momento de desenvolvimento

embrionário, no início do processo de incubação as bandejas foram inseridas na incubadora com 60 minutos de intervalo.

2.3 VARIÁVEIS DE INCUBAÇÃO

O nascedouro foi aberto após 504 horas de incubação (21 dias) e todos os pintinhos foram retirados. Os pintinhos foram então pesados e a sexagem foi realizada por meio da observação do empenamento das asas das aves de acordo com o manual da linhagem (Aviagen, 2018). A relação entre o peso do ovo e o peso do pintinho foi determinada pelas médias do peso dos animais ao nascimento e o peso do ovo antes da incubação: $(\text{peso médio do pintinho (g)} * 100) / \text{peso médio do ovo (g)}$.

Logo após a abertura dos nascedouros, 6 aves de cada tratamento foram selecionadas e submetidas ao procedimento de eutanásia, onde gema, fígado, intestino e peito foram pesados com balança de precisão (Bioprecisa®-FA2104N) para calcular seu peso relativo em relação ao peso corporal do pintinho ($\text{g de tecido} / \text{g de peso corporal} \times 100$).

Após as 504 horas de incubação, foi realizado o embriodiagnóstico, onde os ovos não eclodidos foram abertos individualmente e classificados conforme a fase de desenvolvimento embrionário no momento da morte (WILSON, 2004; TULLETT, 2010). No mesmo momento, avaliou-se a presença de edemas, hemorragias e/ou malformações.

A taxa de eclodibilidade foi calculada pelo número de pintinhos eclodidos em relação ao número de ovos férteis e expressa em percentual.

2.4 ANÁLISE DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

A avaliação de glicogênio hepático e muscular foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito por Hassid e Abrahams (1957), Dal Pont et al. (2019) e expressos em mg/g de tecido úmido. Para determinar o glicogênio hepático e muscular 6 aves de cada tratamento foram eutanasiados e o peito e fígado foram coletados, pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -20°C até o momento das análises.

2.5 ANÁLISE DE MORFOMETRIA INTESTINAL

A análise das variáveis morfológica da mucosa intestinal foram realizadas ao nascimento e aos 4 dias pós-eclosão. Em cada idade foram coletados fragmentos de 4 cm do jejuno (2 cm acima do divertículo da gema) e do íleo (2 cm abaixo do divertículo da gema) de 6 aves por tratamento. Amostras dos segmentos intestinais foram seccionadas longitudinalmente, estendidas em papel firme, grampeadas pelas extremidades, lavadas cuidadosamente com solução salina 0,9%, e fixadas em formol tamponado a 10%. Para determinar a altura dos vilos, profundidade de cripta e número de células caliciformes foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura, fixado em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (HE) e alcian blue (AB). A leitura das lâminas das porções intestinais foi realizada através de um microscópio óptico (LEICA®-DM500) acoplado a uma câmera (TOUPCAM®) com captura de imagens pelo programa (TOUPVIEW®).

Foram avaliados 10 vilos e criptas por ave para determinação da altura das vilosidades (VI), da profundidade das criptas (CR) e da contagem de células caliciformes. A altura dos vilos foi mensurada a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas até o seu ápice, e as criptas, da base até a região de transição cripta:vilo. As células caliciformes foram contadas ao longo de 200 µm, na porção intermediária da vilosidade (ROCHA et al., 2014).

2.6 DESEMPENHO

Para o ensaio de desempenho, 318 pintinhos foram sexados e alojados e criados até os 21 dias de idade, de acordo com os 5 tratamentos da inoculação. Os pintinhos foram imediatamente alojados em gaiolas metálicas medindo 0,98m x 0,45m x 0,50m (comprimento x largura x altura), equipadas com comedouro e bebedouro tipo calha. O controle de temperatura da sala foi feito conforme manual da linhagem Ross®. A ração fornecida *ad libitum* foi idêntica para todos os tratamentos e formulada à base de milho e farelo de soja, de acordo com as exigências nutricionais das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (ROSTAGNO et al, 2017) para a fase inicial de criação (Tabela 9). As variáveis de desempenho foram obtidas semanalmente (1, 7, 14 e 21 dias) por meio da pesagem das aves, da ração ofertada e das sobras de ração, para cálculo do consumo de ração médio (CRM), ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA) no período acumulado, corrigidos para o peso das aves mortas.

TABELA 9. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DA DIETA EXPERIMENTAL

Ingredientes (%)	Dieta Inicial
Milho	57,063
Farelo soja	38,500
Óleo soja	1,000
Fosfato bicálcico	1,000
Calcário	1,170
Sal	0,510
DI-metionina	0,264
L-lisina	0,111
L-treonina	0,032
Cloreto colina	0,100
Premix vitamínico ¹	0,130
Premix mineral ²	0,050
Enzima fitase ³	0,015
Nutrientes	
Energia metabolizável aves kcal/kg	2.947
Proteína bruta (%)	21,994
Extrato etéreo (%)	3,758
Fibra bruta (%)	2,507
Cálcio (%)	0,893
Fósforo disponível (%)	0,448
Sódio (%)	0,218
Cloro (%)	0,379
Lisina digestível (%)	0,568
Metionina digestível (%)	0,888
Metionina + Cistina digestível (%)	0,570
Cistina digestível (%)	0,236
Arginina digestível (%)	1,199
Triptofano digestível (%)	0,779
Treonina digestível (%)	0,915
Valina digestível (%)	0,880
Isoleucina digestível (%)	0,740

¹ Suplementação por kg de produto: vitamina A, 14,43 UI; vitamina D3, 234,06 UI; vitamina E, 19,48 ppm; vitamina K3, 10,16 ppm; vitamina B1, 31,20 ppm; vitamina B2, 15,56 ppm; ácido pantotênico, 0,78 ppm; vitamina B6, 0,058; vitamina B12, 7,78 ppm; ácido nicotínico, 78,03 ppm; ácido fólico, 194,93 ppm; biotina, 1596,39 ppm.

² Suplementação por kg de produto: selênio, 0,2250 ppm; cobre, 7,50 ppm; ferro, 30,00 ppm; iodo, 0,513 ppm; manganês, 45,00 ppm; zinco, 45,00 ppm.

³ Ronozyme Hiphos (CT) 20.000 FYT/g de produto.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de incubação foram analisados de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os dados de desempenho considerou-se como bloco o sexo dos animais, e neste caso analisado de acordo com um delineamento em blocos casualizado.

Depois de verificada a distribuição normal e ausência de dados discrepantes, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e na presença de diferença estatística entre os tratamentos comparados às médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

A eclodibilidade apresentou diferença significativa ($P = 0,012$) entre os tratamentos. As maiores taxas de eclodibilidade foram observadas no tratamento controle e no tratamento com PUT 0,015%, que apresentaram (78,19% e 74,58%), respectivamente. Por outro lado, o tratamento composto por PUT + M + S + HMB teve a menor taxa de eclodibilidade 49,45% (Tabela 10).

TABELA 10. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NA TAXA DE ECLODIBILIDADE (%) AO NASCIMENTO (504 HORAS)

Tratamento	% Eclodibilidade
CN	78,19 ^a
PUT	74,58 ^a
PUT+S+M	63,22 ^{ab}
PUT+HMB	68,49 ^{ab}
PUT+S+M+HMB	49,45 ^b
EPM	2,947
P Valor	0,012

Nota: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0,9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

EPM = Erro padrão da média

A relação entre o peso do ovo/peso do pintinho ao nascimento não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,508$) (Tabela 11).

TABELA 11. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NA RELAÇÃO DO PESO DO OVO (RPO) / PESO DO PINTINHO (RPP) AO NASCIMENTO (504 HORAS)

Tratamento	RPO x RPP
CN	71,36
PUT	70,40
PUT+S+M	71,84
PUT+HMB	69,81
PUT+S+M+HMB	70,67
EPM	0,378
P Valor	0,508

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0.9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

EPM = Erro padrão da média

Ao final do período de incubação foi realizado o embriodiagnóstico dos ovos que não eclodiram e observou-se que 90,92% da mortalidade embrionária ocorreu na fase tardia do período de incubação, ou seja, dos 15 a 21 dias de incubação. Na fase média (9 a 14 dias) e precoce (1 a 8 dias) de incubação foram verificadas mortalidades de 4,16% e 4,91% respectivamente.

Ao nascimento, o peso corporal (PC) dos pintinhos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($P = 0,940$). Da mesma forma, o percentual médio de peso do fígado em relação ao PC do pintinho ($P = 0,162$), do peito ($P = 0,515$) e do intestino ($P = 0,336$) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Já o percentual de peso médio da gema em relação ao PC do pintinho diferiu significativamente entre os tratamentos ($P = 0,025$), sendo que o maior valor (15,42%) foi observado no tratamento com PUT 0,015% e o menor percentual de peso médio (10,64%) foi observado no tratamento com a inclusão de todos os nutrientes (PUT + M + S + HMB).

Aos 4 dias após o nascimento o peso corporal dos pintinhos foi diferente entre os tratamentos ($P < 0,001$), sendo que o maior valor de PC (94,26 g) foi observado no tratamento controle e menor valor (69,80 g) no tratamento PUT + M + S + HMB. O percentual médio de peso da gema ($P = 0,279$), do fígado ($P = 0,661$) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. O percentual de peso médio do peito diferiu entre os tratamentos ($P = 0,023$), com o maior valor observado

no tratamento controle (9,9%) e o menor valor (7,95%) foi observado no tratamento PUT + M + S + HMB. Para percentual de peso médio de intestino foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,006$) e o maior valor foi encontrado no tratamento PUT 0,015% (12,98%) (Tabela 12).

TABELA 12. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NO PERCENTUAL MÉDIO DO PESO DA GEMA (%), FÍGADO (%), PEITO (%) E INTESTINO (%) EM RELAÇÃO AO PESO CORPORAL (PC) DOS PINTINHOS AO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS

	CN	PUT	PUT+S+M	PUT+HMB	PUT+S+M+HMB	EPM	P Valor
Nascimento							
PC (g)	42,19	41,48	41,91	42,79	40,94	0,674	0,940
Gema (%)	12,41 ^{ab}	15,42 ^a	11,47 ^{ab}	11,70 ^{ab}	10,64 ^b	0,519	0,025
Fígado (%)	2,23	2,45	2,61	2,17	2,69	0,079	0,162
Peito (%)	2,62	2,48	2,81	2,14	2,34	0,088	0,515
Intestino (%)	4,63	4,02	5,05	4,26	4,86	0,174	0,336
4 dias							
PC (g)	94,26 ^a	90,98 ^{ab}	86,34 ^{ab}	79,13 ^{bc}	69,80 ^c	2,026	< 0,001
Gema (%)	0,96	0,64	1,12	0,94	1,40	0,104	0,279
Fígado (%)	4,48	4,56	4,47	4,75	5,04	0,107	0,661
Peito (%)	9,99 ^a	9,62 ^{ab}	9,03 ^{ab}	9,40 ^{ab}	7,95 ^b	0,221	0,023
Intestino (%)	10,89 ^b	12,98 ^a	12,28 ^{ab}	10,49 ^b	11,22 ^{ab}	0,265	0,006

Nota: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0.9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

EPM = Erro padrão da média

Não houve diferença significativa para a concentração de glicogênio hepático ($P = 0,998$) e muscular peitoral ($P = 0,839$) entre os diferentes tratamentos ao nascimento (Tabela 13).

TABELA 13. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO (Mg / g DE TECIDO ÚMIDO) NO FÍGADO E NO MÚSCULO PEITORAL DE PINTINHOS AO NASCIMENTO

Tratamento	Glicogênio Hepático	Glicogênio Muscular
CN	6,411	1,429
PUT	6,609	1,260
PUT+S+M	6,198	1,309
PUT+HMB	6,433	1,336
PUT+S+M+HMB	6,442	1,650
EPM	0,344	0,111
P Valor	0,998	0,839

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0.9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

EPM = Erro padrão da média

Os resultados da análise da morfometria do jejuno dos pintinhos no dia do nascimento mostraram que houve diferença significativa entre os tratamentos para altura de vilos (P < 0,001), profundidade de cripta (P < 0,001) e número de células caliciformes (P \leq 0,001). O maior valor de altura de vilos (348,52 μ m) e profundidade de cripta (56,70 μ m) foram observados no tratamento PUT 0,015% + M + S. Já para número de células caliciformes os maiores valores foram observados respectivamente nos tratamentos PUT + M + S + HMB e PUT + M + S (17,57 e 17,10 células em 200 μ m). Na avaliação aos 4 dias após o nascimento também se observou diferença significativa entre os tratamentos para altura de vilos (P < 0,001), profundidade de cripta (P < 0,001) e para número de células caliciformes (P < 0,001), onde os maiores valores de altura de vilos encontrados foram nos tratamentos PUT + M + S (568,07 μ m) e no controle (565,10 μ m), para profundidade de cripta o maior valor foi observado no tratamento PUT + M + S (156,80 μ m). Já o maior número de células caliciformes em 200 μ m foi no tratamento controle (20,61 células em 200 μ m) (Tabela 14).

TABELA 14. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO JEJUNO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4DIAS

Tratamento	Nascimento			4 dias após Nascimento		
	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³
CN	283,97 ^c	46,86 ^{bc}	15,79 ^{ab}	565,10 ^a	128,73 ^b	20,61 ^a
PUT	288,52 ^{bc}	44,35 ^c	14,80 ^b	486,08 ^{bc}	136,72 ^{ab}	17,43 ^b
PUT+S+M	348,52 ^a	56,70 ^a	17,10 ^a	445,67 ^c	156,80 ^a	17,83 ^b
PUT+HMB	320,17 ^{ab}	47,90 ^{abc}	15,72 ^{ab}	537,2 ^{ab}	131,73 ^b	17,30 ^b
PUT+S+M+HMB	289,73 ^{bc}	54,48 ^{ab}	17,57 ^a	568,07 ^a	106,95 ^c	17,69 ^b
EPM	3,950	1,090	0,228	7,761	2,525	0,261
P Valor	< 0,001	< 0,001	≤ 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05).

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0.9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato

EPM = Erro padrão da média

¹ Vilo = Altura da vilosidade (mensurada a partir da região basal até o seu ápice).

² Cripta = Profundidade de cripta (mensurada da base até a região de transição cripta:vilo).

³ Caliciformes = Número de células ao longo de 200 μm na porção intermediária da vilosidade.

Na análise da morfologia do íleo dos pintinhos altura de vilo, profundidade de cripta e número de células caliciformes difeririam estatisticamente ao nascimento e aos 4 dias. Ao nascimento, para altura de vilo (P < 0,001) e profundidade de cripta (P < 0,001) os maiores valores foram observados no tratamento PUT + M + S (altura de vilo 269,57 μm e profundidade de cripta (65,87 μm). O maior número de células caliciformes (P = 0,002) foi observado no tratamento PUT + M + S + HMB (16,91 células em 200 μm). Aos 4 dia após nascimento, para altura de vilo o maior valor (P < 0,001) foi observado nas aves do tratamento PUT + HMB (356,25 μm), para profundidade de cripta (P < 0,001) os maiores valores foram encontrados nas aves do tratamento PUT (101,32 μm). Já o número de células caliciformes (P < 0,001) o maior valor foi observado no tratamento PUT (26,24 células em 200 μm) (Tabela 15).

TABELA 15. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NA ALTURA DE VILO (μm), PROFUNDIDADE DE CRIPTA (μm) E NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES (Nº DE CÉLULAS/200 μm) NO ÍLEO DOS PINTINHOS NO DIA DO NASCIMENTO E AOS 4 DIAS

Tratamento	Nascimento			4 dias após Nascimento		
	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³	Vilo ¹	Cripta ²	Caliciformes ³
CN	207,53 ^c	46,92 ^c	15,07 ^{ab}	306,93 ^c	81,80 ^c	24,14 ^{ab}
PUT	226,50 ^{bc}	45,25 ^c	14,86 ^b	354,68 ^{ab}	101,32 ^a	26,24 ^a
PUT+S+M	269,57 ^a	65,87 ^a	14,70 ^b	323,65 ^{bc}	94,18 ^{ab}	23,13 ^{bc}
PUT+HMB	246,48 ^b	53,62 ^{bc}	16,39 ^{ab}	356,25 ^a	91,08 ^{abc}	21,07 ^c
PUT+S+M+HMB	237,82 ^b	57,38 ^b	16,91 ^a	304,62 ^c	87,87 ^{bc}	22,18 ^{bc}
EPM	2,911	1,066	0,221	3,921	1,455	0,300
P Valor	< 0,001	0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Nota: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05).

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0.9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato

EPM = Erro padrão da média

¹ Vilo = Altura da vilosidade (mensurada a partir da região basal até o seu ápice).

² Cripta = Profundidade de cripta (mensurada da base até a região de transição cripta:vilo).

³ Caliciformes = Número de células ao longo de 200 μm na porção intermediária da vilosidade.

Não foi observado diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis de desempenho, consumo médio de ração (CRM) e ganho de peso médio (GPM), nos períodos de 1-7 dias e 1-14 dias. Já a conversão alimentar (CA), apresentou-se diferente estatisticamente entre os tratamentos aos 7 dias (P = 0,010) e aos 14 dias (P = 0,026). Aos 7 dias a pior CA foi no tratamento PUT + M + S + HMB e a melhor no tratamento PUT + HMB e no grupo controle respectivamente. Aos 14 dias o valor de CA continuou pior no tratamento PUT + M + S + HMB e melhor nos tratamentos controle e PUT 0,015%, respectivamente. Aos 21 dias nenhuma das variáveis de desempenho avaliados (CRM, GPM e CA) apresentou-se diferente estatisticamente, (Tabela 16).

TABELA 16. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE SOLUÇÕES DE PUTRESCINA, MALTOSE, SACAROSE E HMB *IN OVO* NO CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO EM GRAMAS (CRM), GANHO DE PESO MÉDIO EM GRAMAS (GPM) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DAS AVES AOS 7,14 E 21 DIAS

Tratamento	7 Dias			14 Dias			21 Dias		
	CRM7	GPM7	CA7	CRM14	GPM14	CA14	CRM21	GPM21	CA21
CN	134,8	113,9	1,191 ^b	457,7	383,5	1,207 ^b	1077,3	827,9	1,274
PUT	135,7	113,7	1,214 ^{ab}	467,8	389,9	1,211 ^b	1086,3	843,1	1,292
PUT+S+M	145,2	110,2	1,322 ^{ab}	481,8	389,1	1,237 ^{ab}	1090,9	847,4	1,287
PUT+HMB	140,1	115,3	1,173 ^b	476,5	386,4	1,232 ^{ab}	1077,6	845,4	1,275
PUT+S+M +HMB	143,1	105,0	1,374 ^a	475,7	371,0	1,285 ^a	1099,5	836,0	1,317
EPM	2,680	1,960	0,023	6,030	4,000	0,009	11,900	10,400	0,008
P Valor	0,527	0,439	0,010	0,727	0,533	0,026	0,955	0,944	0,427

Nota: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem de acordo com o teste de Tukey (P <0.05).

CN = Controle negativo (inoculação de solução salina NaCl, 0.9%)

PUT = Putrescina 0,015%

PUT + M + S = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l)

PUT + HMB = Putrescina 0,015% + β -hidroxi- β -metilbutirato (0,1%)

PUT + M + S + HMB = Putrescina 0,015% + Maltose (25g/l) + Sacarose (25g/l) + β -hidroxi- β -metilbutirato

EPM = Erro padrão da média

4 DISCUSSÃO

A taxa de eclodibilidade foi afetada negativamente pela inoculação *in ovo* de soluções contendo PUT associada a maltose, a sacarose e ao HMB. Estes resultados corroboram com os observados por Chen et al. (2010), que ao administrarem dissacarídeos, glutamina e HMB *in ovo* a embriões de patos aos 23 dias de incubação, observaram que a taxa de eclodibilidade foi inferior no grupo que recebeu maltose (25 g/l) e sacarose (25 g/l), quando comparada com o controle. Além disso, a mortalidade em embriões de patos inoculados mostrou padrão semelhante ao da eclodibilidade e foi maior no grupo que recebeu as soluções de dissacarídeos do que o grupo controle, indicando que a sobrevivência do embrião foi afetada negativamente pela injeção de solução nutritiva exógena (CHEN et al., 2010). Por outro lado, Uni et al. (2005), encontraram resultados distintos, ou seja, não observaram diferenças na taxa de eclodibilidade ao inocularem *in ovo* uma solução contendo maltose, sacarose, dextrina e β -hidroxi- β -metilbutirato. Ainda, Leitão (2007), observou que a suplementação de maltose, associada ou não à sacarose, não interferiu na mortalidade embrionária, além de não aumentar a eclodibilidade, contrariando a hipótese de que o fornecimento de nutrientes *in ovo* beneficiaria o desenvolvimento embrionário.

No presente estudo, aves com a penugem úmida e aderida a casca foi comumente observada durante a retirada dos pintinhos dos nascedouros (504 horas de incubação), o que sugere possível atraso no tempo de eclosão. Tal hipótese pode ser considerada com base em estudos de Leitão et al. (2010), onde os autores observaram que a suplementação com maltose, sacarose ou glicose *in ovo* interferiu no período requerido para ruptura da membrana interna, da casca e de eclosão dos pintos, indicando uma tendência de que a suplementações com maltose e glicose provocam retardamento do momento da eclosão.

Com relação a suplementação com putrescina *in ovo*, Goes et al. (2020) observaram que a taxa de eclodibilidade foi reduzida de forma linear à medida que a concentração de putrescina aumentou 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2%. Os autores inferiram que tal fato pode estar relacionado à toxicidade da putrescina nas doses utilizadas e que as doses injetadas foram provavelmente maiores do que o embrião poderia metabolizar, uma vez que taxas de mortalidade mais altas foram observadas com o aumento das concentrações. Por outro lado, em um estudo com inoculação

de putrescina *in ovo*, com concentrações inferiores (0,015%, 0,030%, 0,060% e 0,090%), não foi observado diferença na taxa de eclodibilidade, conforme discutido anteriormente no capítulo 2.

A osmolaridade das soluções foi inferior a 800 mOsm em todos os tratamentos, o que descartaria a possibilidade de alteração na pressão osmótica do ovo, que de acordo com Uni e Ferket (2003), poderiam causar prejuízos ao metabolismo do embrião.

Neste estudo, o peso dos pintinhos ao nascimento não foi influenciado pela inoculação *in ovo* das soluções a base de PUT, M, S e HMB. Resultados distintos foram observados por Uni et al. (2005), que ao inocularem uma solução contendo maltose, sacarose, dextrina e β -hidroxi- β -metilbutirato *in ovo*, encontraram um maior peso ao nascimento nos pintos oriundos de ovos suplementados em relação aos pintos de ovos não inoculados. Sendo que os autores relataram que a suplementação *in ovo* provavelmente tenha fornecido ao embrião uma fonte de energia adicional que apoiou o desenvolvimento tardio do embrião, resultando em um aumento significativo no peso corporal.

Ao nascimento, o menor percentual de peso da gema em relação ao peso corporal do pintinho foi observado no tratamento PUT + M + S + HMB. Em um estudo com diferentes níveis de putrescina *in ovo*, Goes et al. (2020) observaram que os tratamentos com os maiores níveis de putrescina inoculados resultaram em maior absorção de gema residual 24 horas após a injeção. De acordo com Noy e Sklan (2001), os pintinhos alimentados logo após o nascimento usam as reservas do saco vitelino mais rapidamente do que as aves não alimentadas. A maior demanda para a utilização do saco vitelínico parece estimular o desenvolvimento do aparelho digestivo dos pintinhos de forma a contribuir para o preparo precoce das aves para o ambiente externo (VIEIRA, 2004; UNI; FERKET, 2010, GOES et al., 2020). Assim, o mesmo poderia ocorrer nas aves alimentadas *in ovo*, pois o acesso aos nutrientes antes da eclosão é um estímulo para antecipar o desenvolvimento intestinal e desta forma, os animais utilizam a energia do saco vitelino para atender à demanda de energia para apoiar o desenvolvimento intestinal inicial (GOES et al., 2020).

Na avaliação da morfometria intestinal ao nascimento, o tratamento com PUT + M + S apresentou maior altura de vilo e profundidade de cripta quando comparado aos demais tratamentos. A suplementação *in ovo* com diferentes níveis de putrescina aos 17 dias de incubação proporcionou um aumento da altura das

vilosidades intestinais e sugere que a presença de putrescina pode ter estimulado o desenvolvimento intestinal das aves (GOES et al., 2020).

Em um estudo com suplementação *in ovo* aos 17 dias de incubação, Tako et al. (2004) avaliaram soluções compostas por maltose, sacarose, dextrina e HMB. No estudo, os autores observaram que no dia da eclosão o comprimento e largura das vilosidades de todos os tratamentos da alimentação *in ovo* foram maiores do que aqueles do grupo controle. Entretanto, segundo os mesmos autores o efeito da alimentação *in ovo* no desenvolvimento morfológico do intestino delgado é máximo até 48 horas após o procedimento de inoculação. Essa hipótese poderia explicar os resultados de altura de vilo e profundidade de cripta aos 4 dias após o nascimento não serem consistentes com os observados ao nascimento e pelo fato de que aos 4 dias após o alojamento as aves alimentadas *in ovo* com PUT + M + S + HMB apresentarem peso corporal inferior aos demais tratamentos.

Para as variáveis de desempenho dos animais aos 7 e 14 dias de idade o tratamento com a associação de todos os compostos (PUT + M + S + HMB) apresentou os piores valores para CA. Os resultados observados neste estudo discordam dos resultados relatados por Tako et al. (2004) e Uni et al. (2005), que quando combinaram maltose, sacarose, dextrina e β -hidroxi- β -metilbutirato observaram melhor desempenho dos pintos oriundos de ovos suplementados. Ainda, Tako et al. (2004) observaram que a associação de β -hidroxi- β -metilbutirato com carboidratos elevou os níveis da atividade de sacarase e estimulou a proliferação de enterócitos, promovendo desta forma maior aproveitamento dos nutrientes e consequentemente melhor desempenho.

Aos 7 dias as aves suplementadas com putrescina *in ovo* apresentaram pior CA no estudo realizado por Goes et al., 2020. Já no experimento 1 deste trabalho, a putrescina inoculada *in ovo* nas concentrações 0,015%, 0,030%, 0,060% e 0,090%, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos para as variáveis de desempenho.

A concentração de putrescina utilizada neste estudo foi definida com base nos resultados do experimento 1, conforme discutido no capítulo 2. Diferentemente, a associação de putrescina com diferentes compostos (M, S e HMB) foi inédita na literatura, uma vez que não existem estudos avaliando o comportamento da putrescina com estes compostos na nutrição *in ovo*. Desta forma, deve-se considerar a hipótese de que a associação destes compostos nas concentrações

utilizadas neste estudo pode ter excedido a capacidade de metabolização do embrião, visto que a interação da putrescina com a maltose, sacarose e HMB em embriões de aves não está clara.

5 CONCLUSÃO

A inoculação da solução de putrescina associada a maltose, sacarose e ao HMB influenciou de forma negativa a taxa de eclodibilidade. A putrescina associada a maltose e a sacarose influenciou positivamente o desenvolvimento das vilosidades intestinais ao nascimento. Aos 21 dias, as variáveis de desempenho não foram afetadas pela inoculação *in ovo* das soluções nutritivas.

REFERÊNCIAS

- AVIAGEN. Ross broiler management handbook. 2018. Disponível em: <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-BroilerHandbook2018-EN.pdf> Acessado em 01 de set. de 2019.
- AVIAGEN. Ross How to... Hatchery. 2017. Disponível em: <http://eu.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Resources_Tools/Ross_How_Tos/RossHatcheryHowToSummary-1to11-EN17.pdf> Acessado em 01 de set. de 2019.
- ABOUSAAD, S.; LASSITER, K.; PIEKARSKI, A.; CHARY, P.; STRIPLIN, K.; CHRISTENSEN, K.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M.; DRIDI, S.; BOTTJE, W. G. Effects of In Ovo feeding of dextrin-iodinated casein in broilers: I. Hatch weights and early growth performance. **Poultry Science**, 2017.
- BHANJA, S. K.; GOEL, A.; PANDEY, N.; MEHRA, M.; MAJUMDAR S.; MANDAL A.B. In ovo carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 163-173, 2015.
- CALIL, T.A.C. Ferramentas para redução da janela de nascimento de pintos. In: Conferência Apínco, Santos, SP. Anais. **Conferência FACTA de Ciência e Tecnologia Avícolas**, p. 215-230, 2010.
- CHEN, W.; WANG, R. ; XIONG, X.L.; WAN, H.F; XU, J.; PENG, J. Influence of in ovo injection of disaccharides, glutamine and #-hydroxy-#-methylbutyrate on the development of small intestine in duck embryos and neonates. **British Poultry Science**, v. 51:5, p. 592-601, 2010.
- DAL PONT, G.C., GOES, E.C., DA SILVA, K.F., DE OLIVEIRA, S.G., DA ROCHA, C., MAIORKA, A. Glycerol in ovo feeding as an energy substrate improves performance of broilers from young breeders. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, p. 1453–1461, 2019.
- FOYE, O.; FERKET, P.; UNI, Z. The effects of in ovo feeding of protein and beta-methylbetahidroxy butyrate (HMB) on nutrient digestion and absorption in neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 85, p. 1185–1192, 2006.
- FOYE, O.T. FERKET, P. UNI, Z. The Effects of In Ovo Feeding Arginine, β -Hydroxy- β -Methyl-Butyrate, and Protein on Jejunal Digestive and Absorptive Activity in Embryonic and Neonatal Turkey Poults. **Poultry Science**, v. 86, p. 2343–2349, 2007.
- GOES, E.C.; CARDOSO DAL PONT, G.; OLIVEIRA, P.R.; DA ROCHA, C.; MAIORKA, A. Effects of putrescine injection in broiler breeder eggs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2020.
- HUSSAIN, T.; TAN, B.; REN, W.; RAHU, N.; KALHORO, D. H.; YIN, Y. Exploring polyamines: Functions in embryo/fetal development. **Animal Nutrition**, v. 3, p. 7–10, 2017.

HASSID, W.Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 34–50, 1957.

HEBY, O. Putrescine, Spermidine, and Spermine. **Physiology**, v. 1, p. 12–15, 1986.

JÄNNE, J.; PÖSÖ, H.; RAINA, A. Polyamines in rapid growth and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 473, p. 241-293, 1978.

KORNASIO, R.; HALEVY O.; KEDAR O.; UNI Z. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**, v. 90, p. 1467-1477, 2011.

LEITÃO, R.A. Inoculação de carboidratos em ovos de matrizes jovens de frangos de corte. Tese: Universidade Federal de Goiás. 2007. Disponível em: <https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Tese2007_Rodrigo_Leitao.pdf> Acessado em 20 de dez. 2019.

LEITÃO, R.A.; MOGYCA. L, NADJA S.; STRINGHINI, J.H.; BARCELLOS, C.M.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose, sacarose ou glicose em ovos embrionados de baixo peso. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v. 32, p. 93-100, 2010.

LIU, B.; JIANG, X.; CAI, L.; ZHAO, X.; DAI, Z.; WU, G.; LI, X. Putrescine mitigates intestinal atrophy through suppressing inflammatory response in weanling piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 2019.

MA, Y.B.; ZHANG, F.D; WANG, J.; WU, S.; QI, G.; ZHANG, H. Effect of in ovo feeding of β -hydroxy- β -methylbutyrate on hatchability, muscle growth and performance in prenatal and posthatch broilers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 755–763, 2019.

NOY, Y.; GEYRA, A.; SKLAN, D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch. **Poultry Science**, v. 80, p. 912-919, 2001.

ROCHA, C., DURAU, J.F., BARRILLI, L.N.E., DAHLKE, F., MAIORKA, P., MAIORKA, A. The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. **American Historical Review**, v. 119, p. 71–79, 2014.

ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L., GOMES, P.C., DE OLIVEIRA, R.F., LOPES, D.C., ... EUCLIDES, R. Tabelas brasileiras para suínos e aves. In: Composição de alimentos e exigências nutricionais, 2017.

SMITH, T.K., TAPIA-SALAZAR, M.; CRUZ-SUAREZ, L.E.; RICQUE-MARIE, D. Feedborne biogenic amines: natural toxicants or growth promoters? In: Simpósium Internacional De Nutrición Avícola, 5, 2000, México. Anais eletrônicos... Disponível em: <http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/tsmith.pdf> Acessado em 19 mai. 2019.

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

TULLETT, S. Como Investigar as Práticas de Incubação. **Ross Tech**. 2010. Disponível em:http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ross-Tech-SET-2010.pdf. Acessado em jun. de 2019.

UNI, Z., NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch Development of Small Intestinal Function in the Poult. **Poultry Science**, v. 78, p. 215-222, 1999.

UNI, Z.; FERKET, P. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. US Regular Patent US, US 8734837 B2, v. 6, 2003. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8734837>> Acessado em 21 de jan. de 2019.

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

UNI Z.; FERKET P. Alimentação in ovo – Impacto sobre o desenvolvimento intestinal, teor corporal de energia e desempenho. In: **Conferência FACTA de Ciência e Tecnologia Avícolas**; Santos, São Paulo. Brasil. p.109-119. 2010.

UNI, Z.; FERKET, P.; TAKO, E.; KEDAR, O.; In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, p. 764-770, 2005.

VIEIRA, S.L. Digestão e utilização de nutrientes após a eclosão de frangos de corte. In: **Simpósio Brasil Sul De Avicultura**, 5, Chapecó. Anais... p. 26-41, 2004.

ZHAI, W.; GERARD, P.D.; PULIKANTI, R.; PEEBLES. E.D.; Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings. **Poultry Science**, v. 90, p. 2134-2143. 2011.

WANG, J.Y., MCCORMACK, S.A., VIAR, M.J., JOHNSON, L.R. Stimulation of proximal small intestinal mucosal growth by luminal polyamines. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 1991.

WILSON, H.R. Hatchability Problem Analysis. Animal Science, University of Florida. 2004. Disponível em: https://www.cluckinggoodpoultry.com.au/uploads/1/1/5/6/115683901/hatchability_problem_analysis.pdf. Acessado em jun. de 2019.