

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E
RECURSOS PESQUEIROS

**INOCULAÇÃO *IN OVO* DE PROTEÍNA LIOFILIZADA DE PESCADO EM
EMBRIÕES AVÍCOLAS**

REBECA FONTENELE MODA

MANAUS – AMAZONAS

2024

REBECA FONTENELE MODA

**INOCULAÇÃO *IN OVO* DE PROTEÍNA LIOFILIZADA DE PESCADO EM
EMBRIÕES AVÍCOLAS**

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Machado Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Teixeira de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Ferreira Rufino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros - PPGCARP da Universidade Federal do Amazonas - UFAM como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros.

MANAUS – AMAZONAS

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M689i Moda, Rebeca Fontenele
Inoculação in ovo de proteína liofilizada de pescado em embriões
avícolas / Rebeca Fontenele Moda . 2024
58 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Paulo César Machado Andrade
Coorientador: Adriano Teixeira de Oliveira
Coorientador: João Paulo Ferreira Rufino
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos
Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Avicultura. 2. biotecnologia. 3. desenvolvimento embrionário. 4.
inoculação in ovo. 5. pescado liofilizado. I. Andrade, Paulo César
Machado. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

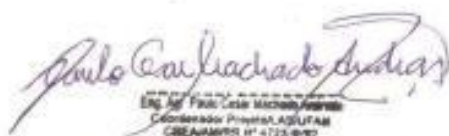
REBECA FONTENELE MODA

**INOCULAÇÃO *IN OVO* DE PROTEÍNA LIOFILIZADA DE
PESCADO EM EMBRIÕES AVÍCOLAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.


Aprovado em 03 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA

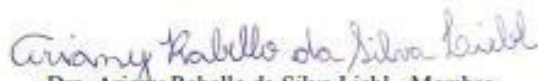


Eng.º Paulo César Machado Andrade
Coordenador Projeto AGRUTAM
CIBEA/AMT/01 Nº 4725-9/97

Dr. Paulo César Machado Andrade - Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Documento assinado digitalmente
 NOEDSON DE JESUS BELTRÃO MACHADO
Data: 03/04/2024 21:13:04-0302
Verifique em: <https://validar.br.gov.br>

Dr. Noedson de Jesus Beltrão Machado - Membro
Universidade Federal do Amazonas



Dra. Arianny Rabello da Silva Liebl - Membro
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela força que sempre me dá.

A meus pais, Maria do Socorro e Paulo César, por sempre me apoiarem e torcerem por mim. Meu amor pelos senhores é muito mais que apenas incondicional. Tenho honra de ser sua filha.

Ao querido marido, Felipe Dimas, por me fazer acreditar todos os dias no amor e me lembrar sempre que eu sou capaz de tudo. Valeu demais, meu duo!

A querida amiga, Ândrya Drummond, por ser uma das maiores parceiras dentro e fora do mundo acadêmico. Seu apoio foi essencial para que eu conseguisse me superar.

Aos queridos orientadores, Profs. Dr. Paulo Andrade, Dr. Adriano Oliveira e Dr. João Rufino pelos ensinamentos, apoio e, principalmente, por nunca terem desistido de mim.

Ao Grupo de Pesquisa NEIVA do IFAM pelo apoio durante o planejamento, execução do trabalho e das demoradas análises, em especial, aos queridos Lucas, Cristiane, Adriene e Fernanda pelo apoio durante todas as fases dos projetos.

Ao Grupo de Pesquisa em Avicultura da UFAM por todo auxílio prestado na execução deste e de outros trabalhos relacionados, em especial, ao Prof. Dr. Marco Antônio e Msc. Francisco Chaves por fazerem daquele setor um verdadeiro lar para mim durante minha estadia.

Ao Grupo de Pesquisa em Animais Silvestres – LAS da UFAM pela companhia durante a fase de Pé-de-pincha, da qual jamais esquecerei.

Ao Grupo de Pesquisa Biophar pela ajuda com a utilização do equipamento de Liofilização. Ao Grupo de Pesquisa GPMAS da UFAM e ao Laboratório temático de Histologia do INPA pela acolhida durante as análises histológicas.

A cidade de Manaus e a Universidade Federal do Amazonas, por me acolherem durante tantos anos e feito parte da minha história durante boa parte de minha vida.

A psicóloga Mayara Menezes, por me mostrar que é sim possível superar a ansiedade.

E, por fim, a mim mesma, por ter conseguido chegar até aqui.

Resumo

Dentro da indústria avícola, o incubatório possui um papel fundamental, por ser o local de produção de novos indivíduos. Neste sentido, pesquisas de inovação tecnológica cuja abrangência se dê desde a coleta dos ovos até o galpão tem se tornado fundamentais, sendo uma dessas de cunho biotecnológico, denominada de Inoculação *in ovo*. A inoculação ou nutrição *in ovo* é um campo recente e trata-se do fornecimento de nutrientes de forma exógena ao embrião via líquido amniótico ou alantóide a fim de que este possa obter melhorias significativas em seu desenvolvimento e desempenho pós-eclosão. Este trabalho visou avaliar os efeitos e o potencial biológico da utilização de proteína liofilizada de peixe (*Colossoma macropomum*) para fins de inoculação *in ovo*. Foram incubados 400 ovos provenientes de matrizes Label Rouge com 27 semanas de idade alojadas no matrizeiro experimental do Setor de Avicultura da FCA/UFAM. Após 16 dias de incubação, foi realizada a ovoscopia para seleção dos ovos férteis a serem utilizados na pesquisa. Estes ovos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos sendo constituídos por ovos íntegros, solução salina e diferentes concentrações de proteína liofilizada de peixe inoculadas (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%) com 39 repetições, sendo o ovo considerado uma repetição. Foram analisadas a composição centesimal do peixe liofilizado utilizado, rendimentos de incubação das aves, parâmetros bioquímicos séricos dos pintos ao nascer, desenvolvimento morfológico e histológico do trato gastrointestinal. A partir dos resultados obtidos, pôde-se determinar que, apesar da baixa taxa de eclodibilidade nos níveis mais elevados, houve bons resultados da inoculação para a formação do TGI e do peso ao nascer dos pintos em níveis de 0,5% e 1,0% sem prejuízos a fisiologia.

Palavras-chave: Avicultura, biotecnologia, desenvolvimento embrionário, inoculação *in ovo*, peixe liofilizado.

Abstract

In poultry industry, the hatchery plays a fundamental role in this context due to the production of new birds to supply the farms. Technological innovation research since egg collection to hatchery are fundamental to allow the development of this area, where biotechnologies as *in ovo* feeding are pointed. *In ovo* feeding, or injection, is a recent study area and involves the exogenous supply of nutrients to the poultry embryo via amniotic fluid or allantois aiming to provide significant improvements in its development and post-hatch performance. Front this, the objective of this study was to evaluate the effects and biological potential of lyophilized fish protein for *in ovo* feeding. Initially, 400 eggs from 27 weeks old Label Rouge breeders were incubated. After 16 days, egg candling was performed to select fertile eggs that were used in the research. Fertile eggs were distributed in a completely randomized design where the treatments will be constituted by two controls (intact eggs and buffered saline solution) and different *in ovo* injection concentrations of lyophilized fish protein (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5%) with 39 replicates each, being the egg considered a replication. The analyses made were according to the composition of the freeze-dried fish used, incubation yields of the birds, serum biochemical parameters of the chicks at hatching, and morphological and histological development of the gastrointestinal tract. From the results obtained, it was possible to determine that, despite the low hatchability in higher levels, the *in ovo* feeding provided good results for the intestinal development and body weight of the chicks in inclusion levels of 0,5% and 1,0% without compromising the physiology.

Keywords: Poultry science, biotechnology, embryo development, *in ovo* feeding, freeze-dried fish.

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição das soluções experimentais..... | 14 |
| Tabela 2. Composição centesimal da proteína liofilizada de pe­scado de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) utilizada para elaboração das soluções..... | 20 |
| Tabela 3. Perfil microbiológico da proteína liofilizada de pe­scado de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) utilizada para elaboração das soluções inoculantes..... | 22 |
| Tabela 4. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária..... | 23 |
| Tabela 5. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre o peso dos pintos ao nascer e a correlação pinto-ovo..... | 24 |
| Tabela 6. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário na bioquímica sanguínea dos pintos ao nascer..... | 25 |
| Tabela 7. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a morfometria do trato gastrointestinal dos pintos ao nascer..... | 27 |
| Tabela 8. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a densidade de células caliciformes do intestino delgado dos pintos nascidos..... | 29 |
| Tabela 9. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a densidade de células caliciformes do intestino grosso dos pintos nascidos..... | 30 |
| Tabela 10. Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de proteína liofilizada de pe­scado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a densidade das túnicas intestinais dos pintos nascidos..... | 32 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Setor de Avicultura da Universidade Federal do Amazonas..... | 11 |
| Figura 2. Processo de liofilização das amostras de <i>Colossoma macropomum</i> | 12 |
| Figura 3. Análises físico-químicas para determinação da composição centesimal do ingrediente..... | 12 |
| Figura 4. Análise microbiológica para verificação da qualidade do ingrediente..... | 13 |
| Figura 5. Incubadora modelo PETERSIME presente no Setor de Avicultura..... | 15 |
| Figura 6. Procedimento de ovoscopia e inoculação <i>in ovo</i> com proteína liofilizada de pescado..... | 15 |
| Figura 7. Correlação pinto/ovo: determinada pelo peso do pinto ao nascer/peso do ovo na inoculação..... | 16 |
| Figura 8. Coleta e centrifugação do sangue dos pintos ao nascer para separação e posterior análise do plasma..... | 17 |
| Figura 9. Dissecção dos pintos selecionados para avaliação do desenvolvimento morfológico do Trato Gastrointestinal (TGI) e posterior análise histológica..... | 18 |
| Figura 10. Processamento das amostras de intestino para formação de blocos de parafina (a esquerda) e posterior microtomização destes blocos para formação de lâminas histológicas (a direita)..... | 18 |
| Figura 11. Fotomicrografias representativas das células caliciformes intestinais identificadas por meio de técnicas histoquímicas. Células AB+ Sulfatadas (à esquerda - seta preta); Células AB+ Ácidas (à esquerda - seta vermelha); Células PAS+ (à direita - círculo verde)..... | 28 |
| Figura 12. Secção longitudinal do duodeno de pinto recém-eclodido. Túnica mucosa (muc), túnica submucosa (sub), túnica muscular (mus) e túnica serosa (ser). Coloração Hematoxilina-Eosina..... | 31 |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1.Introdução | 1 |
| 2.Hipóteses | 3 |
| 3.Objetivos | 4 |
| 3.1.Objetivo Geral | 4 |
| 3.2.Objetivos Específicos..... | 4 |
| 4.Revisão de literatura | 5 |
| 4.1.Incubação artificial e a cadeia produtiva de pintos..... | 5 |
| 4.2.Desenvolvimento embrionário de aves e formação do trato gastrointestinal..... | 6 |
| 4.3.Metabolismo energético do embrião..... | 7 |
| 4.4.Alimentação <i>in ovo</i> e a potencial aplicação de proteína liofilizada de pescado | 8 |
| 5.Material e Métodos | 11 |
| 5.1.Local de desenvolvimento do estudo..... | 11 |
| 5.2.Preparo das soluções experimentais..... | 11 |
| 5.3.Montagem do experimento | 14 |
| 5.4.Variáveis analisadas..... | 16 |
| 5.4.1.Composição centesimal e microbiológica do ingrediente..... | 16 |
| 5.4.2.Rendimentos de incubação | 16 |
| 5.4.3.Bioquímica sanguínea..... | 16 |
| 5.4.4.Morfometria e Histologia do trato gastrointestinal | 17 |
| 5.5.Análise estatística..... | 19 |
| 6.Resultados e Discussão | 20 |
| 6.2.Rendimentos de incubação | 22 |
| 6.3.Bioquímica sanguínea..... | 25 |
| 6.4.Morfometria e Histologia do trato gastrointestinal | 26 |
| 7.Conclusão | 33 |
| 8.Referências | 34 |

1. Introdução

A produção avícola é um dos segmentos de maior avanço da indústria de produção animal tendo sido representado pelos altos índices de produção ao longo dos anos, como bem apresentados por entidades como a FAO (2023). Tal fato comprova que por conta da crescente demanda por produtos avícolas, os avanços em tecnologia e manejo são imprescindíveis nesta indústria (TAINIKA; ŞEKEROĞLU, 2020).

Dentro da cadeia produtiva avícola, o incubatório possui papel fundamental por ser o local de geração de novos indivíduos a partir de ovos férteis (embrionados) em quantidade e qualidade (BOLELI et al., 2016; GROFF et al., 2017). Por isso, a inovação em tecnologias que possam ser utilizadas desde a coleta dos ovos até o galpão tem se tornado fundamental para atingir a precisão na produção de pintos saudáveis. Assim a biotecnologia tem se apresentado como um destaque devido a ampla gama de possibilidades que traz consigo, dentre estas, a tecnologia de inoculação *in ovo*. Esta técnica é uma das mais recentes dentro da indústria, tendo sua primeira utilização datada aproximadamente a 28 anos atrás, cujos principais objetivos são fornecer nutrientes de maneira exógena ao embrião através do líquido amniótico ou do alantoide para que este possa obter melhorias significativas em seu desempenho de forma geral (UNI et al., 2005).

Os nutrientes utilizados na inoculação *in ovo* podem estar direcionados a diferentes funções quanto à fisiologia do pintinho, podendo atuar com fontes de energia (sacarose, dextrina, maltose e glicose), ativação do sistema imunológico (vitamina E, cobre e probióticos), metabolismo e anabolismo protéico (ácido beta-hidroxi-beta- metilbutírico (HMB) e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina) e/ou agentes tróficos da mucosa intestinal (zinco e ácido butírico) (UNI et al., 2005; ALVES et al., 2020; MIRANDA et al., 2021). Algumas substâncias, apesar da limitação de informações, encontram-se em plena fase de testes, ou utilização em pequena escala, na nutrição *in ovo*, com destaque para os carboidratos, que bioquimicamente são componentes importantes no desenvolvimento embrionário, principalmente na fase final (ALVES et al., 2020; MIRANDA et al., 2021).

Frente a isso, a utilização de outros nutrientes surge como uma alternativa de aplicação em tal tecnologia visando atender a lacuna que há tanto na comunidade científica quanto na indústria avícola de produção no quesito inovação, e principalmente aos benefícios que as substâncias supracitadas podem proporcionar tanto ao embrião quanto as aves em plena produção e submetidas à diferentes aptidões (corte e/ou postura) (SAEED et al., 2019). Neste sentido, pode-se destacar o potencial daquelas oriundas de animais, como o pescado, que já vem sendo pesquisado relacionado à dietas para aves (BATALHA et al., 2017).

No Brasil, o aproveitamento de resíduos provenientes da pesca e aquicultura é considerado baixo, pois normalmente estes não recebem nenhum tipo de tratamento ou são descartados de forma inadequada, próximo ao local de processamento dos produtos, assim contribuindo para uma maior contaminação ambiental (MACHADO et al., 2020; SILVA et al., 2020). E quando ocorre o aproveitamento, normalmente este é destinado para a produção de farinhas (MACHADO et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Uma tendência nas pesquisas com processamento de pescado é a utilização da técnica de liofilização para fins de desenvolvimento de novos produtos alimentícios, tais como farinhas liofilizadas e concentrados protéicos (MACHADO et al., 2020; SILVA et al., 2020). Esta técnica se baseia em um processo de desidratação a frio utilizando temperaturas de -80°C seguido de sublimação e é conhecida por sua capacidade de preservar características como a cor, o aroma, a forma e o valor nutricional, resultando em um produto de alto valor agregado devido a qualidade (BARBOSA et al., 2021).

Sabendo-se que na Região Amazônica é detentora de vasta abundância de recursos hídricos e diversidade de espécies de peixes, o que a torna apropriada como potencial na atividade de produção aquícola e pesqueira (PANTOJA-LIMA et al., 2021), faz-se necessário refletir o que está sendo feito para gerir o potencial das grandes quantidades de resíduos produzidas nestas atividades a fim de se evitar desperdícios. Através disto, é possível pensar na obtenção de um produto concentrado próprio para utilização em técnicas como a inoculação *in ovo* na cadeia produtiva avícola, integrando assim duas cadeias produtivas de forma colaborativa gerando um ciclo de economia circular, principalmente pelas vantagens de acessibilidade para a região. Diante do exposto, este trabalho tem o objetivo de avaliar o potencial biológico da proteína liofilizada de pescado para fins de inoculação em ovos embrionados.

2. Hipóteses

- H0: a inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado não afeta o desenvolvimento dos embriões na fase final de incubação;
- H1: a inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado influencia positivamente no desenvolvimento de embriões avícolas;
- H2: a inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado influencia negativamente no desenvolvimento de embriões avícolas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial biológico da utilização de proteína liofilizada de peixe (*Colossoma macropomum*) na alimentação *in ovo* de embriões avícolas.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição centesimal e a avaliação microbiológica da proteína liofilizada de peixe;
- Mensurar os rendimentos de incubação e o peso dos pintos ao nascer de embriões inoculados com proteína liofilizada de peixe;
- Analisar os efeitos da proteína liofilizada de peixe inoculada em embriões avícolas através da avaliação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos dos pintos ao nascer;
- Analisar os efeitos da proteína liofilizada de peixe inoculada em embriões avícolas sobre o desenvolvimento morfológico e histológico do trato gastrointestinal dos pintos ao nascer;
- Indicar o nível ideal de uso da proteína liofilizada de peixe na alimentação *in ovo* de embriões avícolas.

4. Revisão de literatura

4.1. Incubação artificial e a cadeia produtiva de pintos

O mercado de produção de aves tem se apresentado como um dos setores de maior destaque na produção de alimentos, acompanhando o crescimento populacional e a crescente demanda por alimentos (ABPA, 2021; FAO, 2023). Diante de tal fato, os olhares têm se voltado para a produção sustentável de pintos saudáveis que expressam todo seu potencial genético nos diferentes ambientes de produção e, desta forma, o processo de incubação artificial apresenta-se como o alicerce da cadeia produtiva avícola (BOLELI et al., 2016; RUFINO, 2018; MELO et al., 2022).

Geralcida e Ferreira (2011) e Santana et al. (2014) descrevem que a eficácia do processo de incubação depende de fatores que vão desde o manejo empregado na postura de ovos na granja de matrizes, coleta, recepção e desinfecção dos ovos, armazenamento, pré-aquecimento e chegada aos incubatórios até o momento da eclosão. Dentre estes fatores, durante o período de 21 dias de incubação, parâmetros físico-químicos como temperatura, umidade relativa, viragem, fluxo de ar, níveis de oxigênio e dióxido de carbono devem ser cuidadosamente mensurados e rigorosamente respeitados para atender as necessidades do embrião em seu desenvolvimento (BOLELI et al., 2016; GROFF et al., 2017).

A faixa de temperatura ideal para desenvolvimento da ave depende da temperatura de incubação, produção de calor metabólico e condutância térmica entre o ovo e o ar circundante (BOLELI et al., 2016). Em estudos conduzidos por Almeida et al. (2016) e Morita et al. (2016), até o 13º dia de incubação embriões avícolas apresentaram bom desenvolvimento quando submetidos a temperatura de 39°C, porém, Leksrisompong et al. (2007) observaram que após este período, altas temperaturas prejudicam o desenvolvimento de órgãos como coração, pró-ventrículo, moela e intestino delgado.

Atualmente as incubadoras mantêm as temperaturas de incubação entre 37,5 °C e 37,8°C até o momento da transferência, no qual as temperaturas são diminuídas para menos de 36,5°C, pois a partir deste período ocorre o aumento do incremento calórico do embrião causado pela rápida e coordenada sequência de eventos de preparação para a vida fora do ovo nos últimos 4 dias de incubação (GROFF et al., 2017). Quanto a umidade relativa, há um consenso de que esta deve estar atrelada a perda de água em relação ao peso inicial do ovo que está na faixa de 12% a 14% e, para isso, é necessário que a umidade na incubadora esteja entre 65% e 68%, jamais decaindo ou ultrapassando a faixa limite de 70% (BOLELI et al., 2016).

A viragem dos ovos está associada ao sucesso de outros fatores como a ventilação e

trocas de gases e calor visto que o embrião necessita da difusão de gases entre a casca e o albúmen para obter O₂ e eliminar CO₂, principalmente na primeira semana de incubação (BOLELI et al., 2016). Robinson (2013) observou que falhas na viragem dos ovos reduzem a formação de fluidos no embrião devido a facilitarem a aderência deste à casca, comprometendo o desenvolvimento. Em criatórios comerciais, as incubadoras realizam viragem de 45° ± 5° por hora, 24 vezes ao dia até o 18° dia de incubação em movimentos circulares para evitar quebras na região do corioalantóide (ROBINSON, 2013; BOLELI et al., 2016).

4.2. Desenvolvimento embrionário de aves e formação do trato gastrointestinal

Após a fecundação, várias reações químicas acontecem e o processo de clivagem inicia durante a formação da casca no útero da galinha, ocorrendo também nesse local a formação do blastocele após sucessivas divisões de células denominadas blastômeros e os precursores dos futuros tecidos embrionários, denominados de epiblasto e hipoblasto (HYBRO, 2007). Ainda no organismo da ave, inicia-se a gastrulação na qual se forma o eixo central do embrião do qual se formará a linha primitiva e os somitos que originarão os órgãos da ave até a fase adulta (HYBRO, 2007). Durante este processo, também são formadas três camadas de células que serão responsáveis pela formação de determinados tecidos do organismo do embrião, conhecidos como: endoderma que dará origem ao sistema respiratório, órgãos secretores e contribuirá para a formação de várias partes do trato gastrointestinal, a ectoderma que será a base principal para a formação da pele, bico, cloaca, olhos e sistema nervoso e a mesoderma na qual se formará o tecido ósseo, o sistema circulatório, excretório, e os órgãos reprodutores (HYBRO, 2007).

Após tais processos ocorrem outras duas fases até o 10° dia de incubação, denominadas de organogênese (organização do sistema nervoso) e morfogênese (sistemas adquirem uma forma definitiva e passam a ocupar determinada posição no organismo), seguidas de uma fase de integração funcional na qual os órgãos formados passam a atuar de forma interligada e não independentes, e a fase final ao 14° dia de incubação, quando ocorre a maturação embrionária (HYBRO, 2007).

O desenvolvimento do trato gastrointestinal inicia nas primeiras 96 horas de incubação com a formação da boca, pró-ventrículo e moela e ao 3° dia de incubação o

intestino primitivo se divide em anterior, médio e grosso (MOORE; PERSAUD, 2008). No 4º, 5º e 6º dias de incubação, formam-se a cloaca, bursa de Fabricius e o bico da ave, respectivamente, e ao final é possível observar a presença da alça duodenal, do intestino delgado e dos cecos (MOORE; PERSAUD, 2008; ROCHA et al., 2014). Chevalier et al. (2021), através de imuno-histoquímica, detectaram que o sistema nervoso entérico já se encontra evoluído na região do duodeno ao 8º dia de incubação.

Porém, é na fase final de incubação que o trato gastrointestinal da ave realmente evolui através do desenvolvimento das células enteroendócrinas, células caliciformes, enterócitos, vilosidades e criptas a partir do 13º dia de incubação (OZAYDIN; CELIK, 2012), sendo de início as células enteroendócrinas de formato piramidal ou oval com grânulos marrons escuros localizados na posição infra-nuclear, células caliciformes correspondendo a cerca de 13% das células epiteliais contendo em sua maior parte mucinas ácidas, e as vilosidades e criptas rudimentares até o 15º dia de incubação no qual, a partir de então, a cripta passa a secretar diversas enzimas, como sucrase e maltase e fornece enterócitos para aumentar a superfície absorptiva intestinal à medida que o vilo cresce (OZAYDIN; CELIK, 2012; GIVISIEZ et al., 2020).

4.3. Metabolismo energético do embrião

O substrato gema é essencial para realização de conversões energéticas e transformação de carboidratos e gordura em energia (ATP) e por isso esta estrutura é de suma importância durante todo o período do desenvolvimento embrionário (BARBOSA, 2011; FARIAS et al., 2023). Além deste, o líquido amniótico também desempenha papel essencial no que diz respeito a manutenção nutricional do embrião (FARIAS et al., 2023).

Inicialmente, a fonte primária de energia são os carboidratos devido a facilidade de quebra destes macronutrientes através da glicólise ou de glicose prontamente acessível até que a região do corioalantóide torne-se funcional em seu papel de atividades respiratórias e garantia de acesso a oxigênio para que seja possível utilizar os ácidos graxos como fonte primária de energia (BARBOSA, 2011). Ainda que os carboidratos sejam uma via fácil para obtenção de energia, sua rentabilidade energética não é suficiente, ao contrário dos lipídios que possuem um processo de queima maior com obtenção de saldo energético final superior, incrementado com a presença de oxigênio (FARIAS et al., 2023).

Dentre as gorduras presentes na gema, os ácidos oléico, linoleico, palmítico, araquidônico entre outros são degradados através de reações beta oxidativas nas quais são transformados em Acetil-CoA, entrando a partir daí no ciclo de Krebs, resultado também em

energia, CO₂ e água (NELSON; COX, 2018). E nesse processo, fatores como a temperatura e a participação de enzimas são essenciais, visto que a temperatura se apresenta como a variável física com a função de acelerar as reações e as enzimas como a variável química na qual há a função de catálise das reações, permitindo a formação de tecidos e a ocorrência de outras reações (BARBOSA, 2011).

Entre o 10° e 12° dia de incubação, é possível evidenciar proteínas de destaque no sangue como a ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucóide que, dentre diversas funções, auxiliam no desempenho da utilização de glicose como suporte para o funcionamento do fígado e deposição de glicogênio muscular (MORAN Jr., 2007). A partir do 19° dia de incubação, o saco vitelino incorpora-se na cavidade abdominal do embrião, retraindo-se até o momento do início da eclosão apresentando-se como reserva residual suficiente para suprir a ave formada por até dois dias após o nascimento (BARBOSA, 2011). Entretanto, em estudos conduzidos por Morita et al. (2009) e Dayan et al. (2020) foi possível verificar que se tal reserva energética for limitada, o organismo do embrião necessitará direcioná-la para a atividade vital de manutenção ou para o crescimento corporal, comprometendo, desta forma, a sobrevivência e/ou desempenho do pintinho após o nascimento (BARBOSA, 2011; DAYAN et al., 2020).

4.4. Alimentação *in ovo* e a potencial aplicação de proteína liofilizada de pescado

Considerando que aves possuem apenas o conteúdo presente no ovo para sua formação e desenvolvimento de todo o organismo ao longo de 21 dias de incubação e ainda precisam garantir uma reserva energética para o período pós eclosão, o estudo de tecnologias que venham a favorecer o estado de manutenção nutricional e energético têm sido de suma importância para resolver tais problemas na produção de pintinhos de qualidade (UNI et al., 2003). Além disso, a pesquisa neste campo também busca atender uma expectativa de suprimento de elevada demanda metabólica das novas linhagens avícolas a fim de que estas possam expressar seu máximo de potencial genético em diferentes condições no campo (FARIAS et al., 2023).

Neste sentido, há cerca de 28 anos atrás a Tecnologia “*in ovo*” foi disponibilizada pela primeira vez no processo de vacinação de frangos contra a doença de Marek, sendo a máquina Inovoject®, fabricada pela Embrex, Inc., o primeiro sistema automatizado a ser introduzido nos Estados Unidos (WILLIAMS; ZEDEK, 2010). A utilização desta técnica de injeção *in ovo* atualmente está em uso em mais de 90% dos incubatórios de países como o EUA, cujas máquinas têm a capacidade de administrar vacinas de 25.000 a 62.000 ovos por hora

(WILLIAMS; ZEDEK, 2010).

Seguindo tal linha de raciocínio, diversas pesquisas têm se direcionado para aplicação de vacinas, medicamentos, hormônios, probióticos, prebióticos e outros vários nutrientes suplementares com o objetivo de aumentar potencialmente a imunidade e crescimento do pintinho e têm sido continuamente estudados em vários laboratórios nos últimos 20 anos a fim de buscar uma aplicação comercial (PEEBLES, 2018). A técnica utilizada na aplicação de nutrientes atende pelos nomes de “Nutrição *in ovo*” ou “Alimentação *in ovo*” tendo sido os primeiros trabalhos publicados por Uni e Ferket (2003) que afirmaram que a mortalidade vivenciada pelos filhotes durante o período crítico pós-eclosão, quando estão em adaptação aos novos ambientes e a alimentação exógena, pode ser aliviada pela administração *in ovo* de nutrientes no estágio final do período embrionário. A aplicação consiste em inocular substâncias no ovo durante o desenvolvimento embrionário na região do líquido amniótico através do uso de seringas descartáveis (ALVES et al., 2020; MIRANDA et al., 2021).

Entretanto, ainda é tema de discussão em toda literatura que alguns fatores como a fase de desenvolvimento do embrião, local de aplicação e composição da solução podem determinar o volume ideal a ser aplicado em diferentes locais do ovo, concentrações, osmolaridades e outros parâmetros, fatores estes que ainda carecem de mais informações detalhadas a respeito de seus efeitos sobre a fisiologia do embrião, o que têm impedido o avanço de tais pesquisas para aplicação a nível industrial (ALVES et al., 2020; MIRANDA et al., 2021).

Pesquisas conduzidas por Uni et al. (2003) e Campos et al. (2010) demonstraram que do 15º ao 19º dia de incubação o líquido amniótico é totalmente consumido oralmente e, conseqüentemente, as substâncias presentes também são ingeridas, criando a possibilidade de ingestão de nutrientes exógenos antes do nascimento, sendo esta a faixa de período ideal para aplicação da técnica. Dentre os nutrientes testados para avaliação da eficácia em melhorar o desenvolvimento embrionário, eclodibilidade e desempenho pós-eclosão quando administrados *in ovo* encontram-se os aminoácidos, peptídeos, carboidratos, nucleotídeos, eletrólitos, vitaminas e minerais, L-carnitina, creatina e extratos vegetais que desempenham diferentes funções no organismo desde a fonte de energia metabólica até o estímulo do desenvolvimento e atividade precoce da mucosa intestinal e seus agentes e do sistema imunológico (MIRANDA et al., 2021; FARIAS et al., 2023).

Os carboidratos têm sido amplamente utilizados em tais pesquisas devido a mínima quantidade natural presente dentro do ovo tendo sido testadas a inoculação de maltose, sacarose e dextrina para aumento dos níveis de glicogênio muscular suprindo o déficit energético no momento da eclosão (MIRANDA et al., 2021). Outros nutrientes como as vitaminas e minerais tem sido utilizados como forma de evitar anormalidades durante o desenvolvimento das aves que em diversos casos também podem levar a morte (CAMPOS et al., 2010; MIRANDA et al., 2021).

Por outro lado, nutrientes como os aminoácidos ainda possuem pouca utilização em tais pesquisas, principalmente no que diz respeito aos que advém de fontes animais, fato este considerado preocupante, pois apesar de a gema apresentar níveis suficientes para o desenvolvimento embrionário e eclosão, estes níveis tornam-se insuficientes para sustentar o desempenho pós-eclosão, principalmente considerando o acelerado crescimento das linhagens atuais (OHTA et al., 2004; FARIAS et al., 2023). A inoculação de aminoácidos no líquido amniótico de embriões em estágio avançado de desenvolvimento favorece o catabolismo de ácidos graxos para vias energéticas, além de direcioná-lo para o desenvolvimento muscular ao também reduzir a síntese de glicose via gliconeogênese (KORNASIO et al., 2011; COSKUN et al., 2018).

Neste sentido, uma possível proposta de aplicação de fonte de proteína de origem animal nesta técnica seria a utilização de pescado liofilizado, visto que o pescado tem sido aplicado em pesquisas voltadas para nutrição de frangos de corte e poedeiras (HOSSAIN et al., 2013; BATALHA et al., 2017; SILVA et al., 2017), sendo uma alternativa frente aos fatores antinutricionais que a grande maioria dos ingredientes de origem vegetal apresentam, ao mesmo tempo que não possui um elevado custo em comparação com a aquisição de ingredientes proteicos já preparados (HOSSAIN et al., 2013; SILVA et al., 2020). Aliando isto ao fato de que a região amazônica possui uma vasta biodiversidade aquícola com alto potencial para atividades de pesca e piscicultura e alta quantidade de resíduos produzidos em ambas as atividades (LINS, 2011; PANTOJA-LIMA et al., 2021), e pensando também nesta como uma região de certo destaque em produção avícola (CRUZ et al., 2016), este trabalho possui um viés multidisciplinar ao avaliar o potencial da utilização de pescado como ingrediente aplicado a inoculação *in ovo* e desta maneira, integrar duas cadeias produtivas.

5. Material e Métodos

5.1. Local de desenvolvimento do estudo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia Avícola do Setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal e Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) localizada na cidade de Manaus (Amazonas) (Figura 1). Todos os protocolos experimentais foram previamente submetidos a apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA) e devidamente aprovados sob o número de protocolo 01/2022.



Figura 1. Setor de Avicultura da Universidade Federal do Amazonas. Fonte: Google Maps, 2019.

5.2. Preparo das soluções experimentais

Anterior à execução do experimento, foi coletado um peixe inteiro da espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) de 3,60 kg durante o mês de janeiro (época de cheia) para retirada do filé e seus resíduos no Mercado Municipal de Manaus Adolpho Lisboa, sendo este transportado até a UFAM e armazenado em freezer convencional sob congelamento (-180°C) até ser retirado para o preparo das amostras. Amostras de filé retiradas da região acima das costelas foram selecionadas e cortadas até atingirem tamanho inferior a 5 cm, lavadas em água clorada e após com água destilada, utilizando cerca de três vezes o volume da amostra, por 5 minutos, repetindo o processo três vezes, e em seguida, liofilizadas em um liofilizador de bancada VirTis® benchtop K (estabelecido por ensaios preliminares) localizado no

Laboratório de Fitoquímica e Semissíntese na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (Figura 2). As amostras liofilizadas foram submetidas primeiramente a avaliação de parâmetros físico-químicos (Figura 3) e foram destinadas a análise de parâmetros microbiológicos (Figura 4) a fim de atestar a qualidade do produto a ser utilizado na solução inoculante seguindo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008) e Anvisa (2022), respectivamente.



Figura 2. Processo de liofilização de *Colossoma macropomum*. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.



Figura 3. Análises físico-químicas para determinação da composição centesimal do ingrediente. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

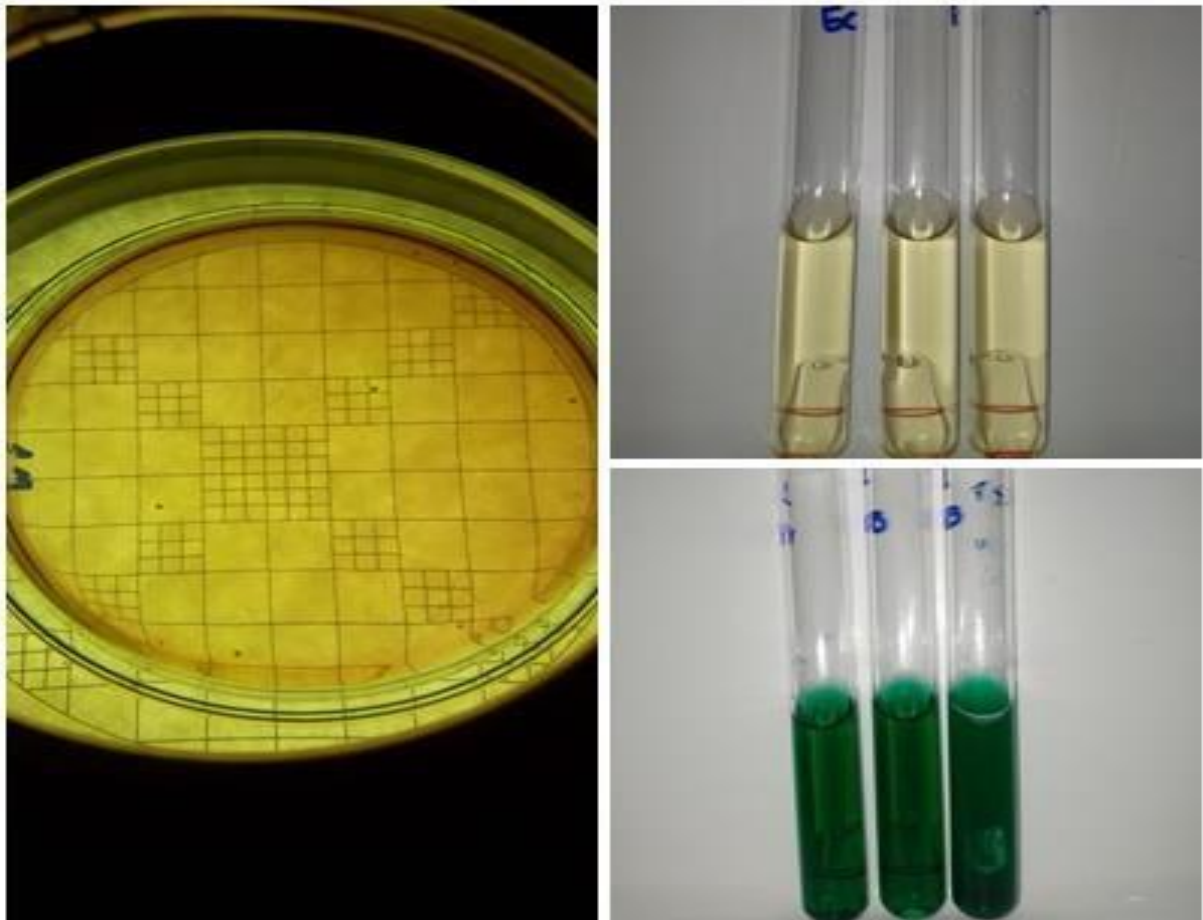


Figura 4. Análise microbiológica para verificação da qualidade do ingrediente. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

As soluções foram preparadas de acordo com a metodologia relatada por Bhanja et al. (2004). A concentração de aminoácidos para inoculação *in ovo* relatada por Murphy (1994) foi tomada como padrão, conforme apresentado na Tabela 1, para calcular a concentração de proteína liofilizada nas soluções. Em seguida, as misturas foram dissolvidas em 200 μL de solução salina estéril a 0,50% antes da inoculação. As soluções foram ajustadas para 7,0 de pH pela adição de NaOH e a contagem microbiana foi anulada através de um filtro estéril. Antes do procedimento de inoculação *in ovo*, as soluções foram aquecidas a 29 °C em banho-maria.

Tabela 1. Composição das soluções experimentais.

| Tratamentos | Soluções |
|-----------------|--|
| Ovo íntegro | - |
| Solução Salina | 0,5% de NaCl |
| Solução teste 1 | 0,5% de NaCl + 0,5% de Proteína Liofilizada de Pescado |
| Solução teste 2 | 0,5% de NaCl + 1,0% de Proteína Liofilizada de Pescado |
| Solução teste 3 | 0,5% de NaCl + 1,5% de Proteína Liofilizada de Pescado |
| Solução teste 4 | 0,5% de NaCl + 2,0% de Proteína Liofilizada de Pescado |
| Solução teste 5 | 0,5% de NaCl + 2,5% de Proteína Liofilizada de Pescado |

5.3. Montagem do experimento

Foram adquiridos ovos fertilizados (n=400) provenientes do matrizeiro do Setor de Avicultura da Universidade Federal do Amazonas (Campus Manaus). Estes foram transportados até o laboratório na UFAM onde foram identificados, pesados e incubados em máquina modelo PETERSIME que realiza viragens dos ovos a cada uma hora (Figura 5). Após 16 dias de incubação, foi realizada a ovoscopia para seleção dos ovos férteis a serem utilizados na pesquisa. Estes foram separados em delineamento inteiramente casualizado sendo o ovo considerado uma repetição, ou seja, 39 ovos para cada tratamento (Figura 6).

Em seguida, estes foram pesados, higienizados e perfurados na região da câmara de ar buscando-se evitar perfurar a membrana interna da casca do ovo. As soluções formuladas continham diferentes concentrações de proteína liofilizada e foram injetadas à 0,5 ml na região do fluido amniótico utilizando seringas com agulha 7 x 2,5 mm e, em seguida, o orifício da casca do ovo foi lacrado com parafina fundida (Figura 6). Os ovos foram transferidos para máquina de eclosão modelo PETERSIME onde permaneceram até a retirada dos pintos aos 21 dias de incubação (504±02 horas).



Figura 5. Incubadora modelo PETERSIME presente no Setor de Avicultura. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.



Figura 6. Procedimento de ovoscopia e inoculação *in ovo* com proteína liofilizada de pescado. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

5.4. Variáveis analisadas

5.4.1. Composição centesimal e microbiológica do ingrediente

As variáveis de composição centesimal analisadas foram: matéria seca, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo. As variáveis microbiológicas foram determinadas pela contagem de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e coliformes fecais.

5.4.2. Rendimentos de incubação

Os rendimentos de incubação englobam: eclodibilidade (nº de pintos nascidos/nº de ovos férteis x 100), mortalidade intermediária (percentagem de pintos e/ou embriões mortos entre 16 e 18 dias de incubação), mortalidade tardia (percentual de pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo), mortalidade pós-bicagem (percentual de pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, com bicagem da casca do ovo) e correlação pinto/ovo (peso de cada pinto ao nascer/peso de cada ovo antes da inoculação) (Figura 7).



Figura 7. Correlação pinto/ovo: determinada pelo peso do pinto ao nascer/peso do ovo na inoculação. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

5.4.3. Bioquímica sanguínea

Após aferição dos rendimentos de incubação, foram selecionados aleatoriamente 5 pintos aptos de cada tratamento para coleta de sangue individual. A amostra sanguínea foi retirada por meio de punção cardíaca e armazenada em microtubos contendo heparina. O sangue foi centrifugado (Figura 8) e o plasma foi utilizado para as análises dos

seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol total, proteínas totais, albumina e ureia através da utilização de kits comerciais da marca Labtest Diagnóstico®. Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu® UV-1280.



Figura 8. Coleta e centrifugação do sangue dos pintos ao nascer para separação e posterior análise do plasma. Fonte: Arquivo Pessoal 2023.

5.4.4. Morfometria e Histologia do trato gastrointestinal

Os mesmos pintos selecionados para análise bioquímica sanguínea foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical para avaliação do desenvolvimento do trato gastrointestinal através dos seguintes parâmetros: peso do saco vitelino (g), peso do coração (g), peso do fígado (g), peso do pâncreas (g), peso do pró-ventrículo (g), peso da moela (g), comprimento da orofaringe + esôfago (cm), comprimento da alça duodenal (cm), comprimento do jejuno + íleo (cm), comprimento dos cecos (cm) e comprimento do cólon + reto (cm) (Figura 9).

As análises histológicas foram realizadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, no laboratório de Microscopia Eletrônica do Campus II (Manaus, Amazonas). Seguindo a metodologia descrita por Bancroft et al. (2008), logo após a eutanásia dos animais, foi coletada uma amostra dos pontos inicial, médio e final do intestino delgado (entre a porção proximal descendente e a distal ascendente da alça intestinal) e uma amostra dos pontos inicial, médio e final do intestino grosso (região média do cólon), sendo estas fixadas em formaldeído 10%. Tais amostras foram submetidas aos procedimentos histológicos de rotina, sendo desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol, diafanizadas em xilol, imersas em parafina, microtomizadas a 4,0 μm , dispostas em lâminas de vidro, secas em

estufa a 37°C *overnight* (Figura 10).



Figura 9. Dissecação dos pintos selecionados para avaliação do desenvolvimento morfológico do Trato Gastrointestinal (TGI) e posterior análise histológica. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.



Figura 10. Processamento das amostras de intestino para formação de blocos de parafina (a esquerda) e posterior microtomização destes blocos para formação de lâminas histológicas (a direita). Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Para a fase de coloração das lâminas foram utilizados três tipos de corantes: Hematoxilina-Eosina, Azul de Alcian e Periodic Acid Schiff (PAS). Em seguida, foi realizado o processo de desparafinização inicialmente em todas as lâminas com dois banhos de xilol e banhos de concentrações decrescente de etanol de 100% a 50% e dois banhos em água destilada. Para a coloração (imuno-histoquímica) em hematoxilina, as lâminas foram mergulhadas em recipiente contendo o corante por 3 minutos e, posteriormente, contracoradas em eosina por 30 segundos. Para coloração (imuno-histoquímica) em Azul de Alcian e PAS, foram utilizados kits da marca EasyPath Diagnósticos®.

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram utilizadas para avaliação do volume de Delesse ou fracional das túnicas (mucosa, submucosa, muscular e serosa) que tem por objetivo quantificar o percentual de cada uma dessas estruturas. As lâminas coradas com azul de alcian foram utilizadas para quantificação de células caliciformes, diferenciando-as entre produtoras de mucinas sulfatadas e carboxiladas. E as lâminas coradas com PAS foram utilizadas para quantificar as células caliciformes produtoras de mucinas neutras.

Posteriormente, todas as lâminas foram reidratadas com banhos crescentes de etanol e dois banhos em xilol. Após a montagem, estas foram fotografadas no microscópio Zeiss® e a análise quantitativa foi realizada no sistema analisador de imagem Stepanizer® através do sistema de pontos estereológicos, após seleção de três vilos íntegros, estimando-se a densidade de células caliciformes nas criptas e nas vilosidades e quantificando o volume fracional (proporção relativa) das túnicas (submucosa, mucosa, muscular e serosa) dos intestinos.

5.5. Análise estatística

Os dados de todas as variáveis foram analisados quanto ao teste de normalidade e transformados, quando necessário. Estes foram analisados pela ANOVA unidirecional usando o software R (versão 4.2.3) com comandos executados de acordo com Logan (2010). Quando detectada significância na análise de alguma variável, foi realizado o teste de Tukey para testar as diferenças entre os valores médios. Os resultados foram apresentados como médias e o nível significativo para as diferenças foi definido como $p < 0,05$.

6. Resultados e Discussão

6.1. Composição centesimal e microbiológica do ingrediente

Os resultados médios da composição centesimal da proteína liofilizada de tambaqui (*Colossoma macropomum*) encontram-se na Tabela 2. Observa-se que após o processo de liofilização, o teor de umidade foi de 13,20%, e considerando o peso do animal do qual retirou-se o filé em questão, também estima-se que a amostra possuía cerca de 576 kcal/kg Ogawa e Maia (1999) descrevem que o músculo do pescado inteiro contém cerca de 60% a 85% de umidade variando conforme a espécie, idade, sexo e estado nutricional do animal, além da época do ano de sua região de origem. Neste caso, também se percebe que o peso do animal e a escolha do uso do filé podem ter influenciado no teor de matéria seca após a liofilização, visto que peixes maiores possuem menor teor de umidade e maior concentração desta no filé devido ao menor desenvolvimento de fibras musculares desta região (CONTRERAS- GUZMÁN, 1994; ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002).

Tabela 2. Composição centesimal da proteína liofilizada de pescado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizada para elaboração das soluções.

| Amostra | Composição Centesimal ¹ (%) | | | | |
|------------------------------|--|--------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Peso do animal (kg) | Matéria Seca | Matéria Mineral | Proteína Bruta | Extrato Etéreo |
| Filé de Tambaqui liofilizado | 3,60 | 86,80±0,15 | 4,90±0,03 | 83,60±0,02 | 9,86±0,05 |

¹Médias retiradas de três repetições ± desvio padrão;

De acordo com a média obtida para o teor de matéria mineral, observa-se que alguns fatores como o peso, idade, sexo e estado fisiológico do animal provavelmente foram determinantes para a obtenção deste valor visto que, geralmente, nesta e em outras espécies de água doce menores a faixa de variação encontra-se em torno de 0,90 a 3,39% (SIMÕES, 2007). Franco et al. (2013) e Botelho et al. (2017) comparando tambaquis com média de cerca de 1,5 kg criados em sistema de tanque escavado e recirculação, respectivamente, obtiveram um resultado de 1,45% e 2,75% de matéria mineral, indicando que, além das características morfológicas e fisiológicas do animal, o sistema de criação também pode influenciar na composição do filé.

Em relação ao fator sexo, Mesquita (2013) ao analisar tambaquis que não haviam ainda atingido a maturidade sexual, em base úmida, encontrou teor de matéria mineral de cerca de 1,14% para machos e 1,13% para fêmeas. Neste sentido, percebe-se que tal valor

encontrado para o peixe utilizado neste trabalho foi mais alto do que o que é normalmente encontrado na literatura. Valores como o teor de extrato etéreo (lipídio) estão sujeitos a variações considerando o peso e até mesmo fatores genéticos do animal, além da própria época do ano e sistema de criação, a depender do caso (OGAWA; MAIA, 1999; BOTELHO et al., 2017). Neste trabalho, o teor de lipídios foi muito próximo ao encontrado por Amaral (2013) ao analisar filés de tambaqui em base úmida, indicando que o processo de liofilização pode ter tido influência neste valor, mesmo que baixa.

De acordo com Ackman (1989), considerando que peixes com teor de gordura maior que 8% são classificados como peixes altamente gordos, pode-se dizer que o peixe utilizado para elaboração da solução concentrada pertencia a tal classe, indicando que provavelmente o peso e a idade do animal também influenciaram no teor de extrato etéreo do filé. Tal resultado assemelha-se ao encontrado por Sales e Maia (2013) e Dantas Filho et al. (2021) que ao analisarem filés de tambaquis com peso maior que 2 kg obtiveram valores de 6,8% e 10,64% de lipídios, respectivamente, e, também a Botelho et al. (2017) que, além de obterem valor determinante para classificação de um peixe altamente gordo ao analisarem o filé liofilizado de um animal com cerca de 1,5 kg, também apresentaram uma correlação positiva e alta entre as variáveis peso e extrato etéreo.

Segundo Rostagno et al. (2017), a exigência de Energia Metabolizável para pintos de corte machos e fêmeas com idade entre 1 a 7 dias é de 3,0 e 3,1 kcal/kg, respectivamente. Estimando-se tal quantidade de Energia Metabolizável para a amostra de peixe utilizada neste trabalho, notou-se que o valor desta estaria ultrapassando muito tal faixa de exigência, visto que deve-se considerar que a mesma foi dissolvida em solução salina para ser administrada para embriões, ou seja, para aves de corte em fase inicial ainda mais crítica.

O teor de umidade de 13,20% para o peixe utilizado no presente trabalho apresenta-se como um fator determinante para a determinação do valor de lipídeo, além da própria influência do processo de liofilização. Oetterer e Lima (1975) afirmam que a presença de lipídeos é inversamente proporcional a de água presente no peixe assim como, da mesma maneira, também foi encontrado em estudo conduzido por Mesquita (2013) em machos e fêmeas não-maduros de tambaqui.

Em contrapartida, em estudo conduzido por Franco et al. (2013) com tambaquis provenientes de piscicultura com cerca de 1,5 kg foi encontrado um valor de 1,82% de lipídios, porém, os autores reforçam que houve um processo de curtimento das peles, indicando que houve uma possível influência deste fato devido a pele desta espécie estar muito fixada na musculatura na região do perimísio (CONTRERÁS-GUZMÁN, 1994).

Considerando que, neste trabalho, o peso, idade e processamento do animal possivelmente tiveram influência sobre tal variável, o fato de resíduos da filetagem estarem presentes na amostra também teve possível participação na ocorrência de tal valor encontrado ter sido alto.

Considerando que o teor de proteína bruta obtido foi maior em relação ao teor de lipídios, tal resultado indica uma inversão assemelhando-se a resultados obtidos por Botelho et al. (2017) especificamente para a espécie tambaqui. Tal valor encontrado apresenta-se como um fator potencialmente positivo, pois durante o desenvolvimento embrionário, as aves se beneficiam muito deste nutriente na fase de pré-eclosão devido ao atendimento do requisito de aminoácidos essenciais e não essenciais que direciona o metabolismo de proteínas para síntese proteica, acréscimo e produção muscular, e participação no metabolismo energético (UNI et al., 2005; MORAN JR., 2007).

A respeito da análise microbiológica do ingrediente (Tabela 3), pode-se observar que os valores estão em conformidade com o exigido pela legislação brasileira (ANVISA, 2022), indicando que o processo de liofilização do filé foi eficiente, assim apresentando condições sanitárias desejáveis para aplicação como solução inoculante para consumo animal.

Tabela 3. Perfil microbiológico da proteína liofilizada de pescado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizada para elaboração das soluções inoculantes.

| Amostra | Microrganismos (UFC.g ⁻¹) | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | <i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i> | <i>Escherichia</i> <i>coli</i> | Coliformes Totais | Coliformes Termotolerantes | <i>Salmonella</i> <i>sp.</i> |
| Filé de Tambaqui liofilizado | 0,2 x 10 | - | <3,0 x 10 | <3,0 x 10 | Ausente |

¹Médias retiradas de três repetições;

6.2. Rendimentos de incubação

Nos resultados dos rendimentos de incubação (Tabelas 4 e 5), observou-se diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis, exceto para a taxa de Mortalidade Pós-bicagem (%), Peso do pinto (g) e Correlação pinto-ovo. O lote de ovos íntegros apresentou a maior taxa de eclodibilidade (82,59%), seguido dos lotes inoculados cujos níveis de inclusão de proteína liofilizada de pescado foram 0,5%, 1,0% e 1,5%, respectivamente. Notou-se também que esta taxa foi reduzida conforme houve aumento do nível de inclusão do ingrediente inoculante, juntamente com a inoculação de solução salina.

Tabela 4. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.¹

| Tratamentos ² | Variáveis | | | |
|--------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Eclodibilidade (%) | Mortalidade intermediária (%) | Mortalidade tardia (%) | Mortalidade Pós-bicagem (%) |
| Ovo íntegro | 82,59 ^a | 4,16 ^c | 8,71 ^c | 4,54 |
| Solução salina | 26,16 ^c | 56,43 ^{ab} | 12,87 ^b | 4,54 |
| 0,5% PLP | 52,28 ^b | 21,59 ^b | 12,87 ^b | 13,26 |
| 1,0% PLP | 47,73 ^b | 34,85 ^b | 4,16 ^c | 13,26 |
| 1,5% PLP | 39,02 ^b | 34,85 ^b | 17,42 ^b | 8,71 |
| 2,0% PLP | 21,98 ^c | 43,18 ^{ab} | 30,68 ^a | 4,16 |
| 2,5% PLP | 17,44 ^c | 73,86 ^a | 4,16 ^c | 4,54 |
| p-valor ³ | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,05 ^{ns} |
| CV (%) ⁴ | 5,31 | 5,74 | 7,41 | 7,90 |

¹Todos os dados representam a média de 39 repetições por tratamento.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³As médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁴CV = Coeficiente de variação.

Tal redução da eclodibilidade após um determinado nível de inoculação deve-se a fatores como: o processo manual de inoculação ser mais arriscado devido ao maior risco de erro no momento de aplicação e possível contaminação, e a perturbação do equilíbrio osmótico no ovo ocasionada após o aumento substancial dos nutrientes intermediária (LEITÃO et al., 2010; MELO et al., 2022; FARIAS et al., 2023). E no caso deste estudo, principalmente no que se refere ao teor de Extrato Etéreo da amostra (9,86%), resultando no consequente aumento da mortalidade, especialmente intermediária.

Embriões oriundos de ovos íntegros também apresentaram menores taxas de mortalidade intermediária. Por outro lado, nos tratamentos de ovos inoculados com 2,0% e 2,5% de proteína liofilizada de pescado observaram-se altos valores de taxas de mortalidade intermediária e notou-se, também, uma certa tendência de que estes foram os lotes nos quais os pintos que nasceram serem mais pesados em comparação com os de lotes anteriores.

Este comportamento das variáveis mostra que houve um efeito similar ao de “dose letal”, pois, a partir de 2,0% de adição do ingrediente, a solução inoculante torna-se o principal fator para desequilíbrio osmótico do meio de nutrientes disponíveis para o embrião (SANTOS, 2014; MELO et al., 2022; FARIAS et al., 2023). Quanto aos pintos nascidos em tais lotes, ao analisar estudos similares, explica-se que o fato de as aves utilizadas neste estudo pertencerem a uma linhagem de aves pesadas contribuiu para os valores de pesos obtidos, além de que estes tiveram maior acesso a Aminoácidos e gordura (considerando o alto valor de Extrato Etéreo da amostra de peixe da solução) ocasionando em baixo gasto de energia da reserva corporal ou acúmulo desta em triglicerídeos e colesterol (SANTOS, 2014).

Tabela 5. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre o peso dos pintos ao nascer e a correlação pinto-ovo.¹

| Tratamentos ² | Peso do pinto (g) | Correlação pinto-ovo |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| Ovo íntegro | 39,78 | 0,73 |
| 0,5% Solução Salina | 39,07 | 0,69 |
| 0,5% PLP | 37,95 | 0,69 |
| 1,0% PLP | 38,45 | 0,67 |
| 1,5% PLP | 36,92 | 0,72 |
| 2,0% PLP | 40,69 | 0,74 |
| 2,5% PLP | 40,22 | 0,77 |
| p-valor ³ | 0,37 ^{ns} | 0,17 ^{ns} |
| CV (%) ⁴ | 7,92 | 9,08 |

¹Todos os dados representam a média de 39 repetições por tratamento.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁴CV = Coeficiente de variação.

Resultado similar foi observado no lote do tratamento de ovos inoculados com solução salina 0,5%, visto que a taxa de mortalidade intermediária do lote ficou acima de 50%, porém, o peso médio de pintos nascidos aproximou-se do valor obtido para os tratamentos com maior inclusão do ingrediente. Entretanto, tal fato deve-se apenas ao desequilíbrio osmótico ocasionado pela solução salina, pois não houve aumento no nível de outros

nutrientes. Também não se observou efeito ($p>0,05$) na correlação pinto-ovo e os valores médios aproximam-se de valores obtidos em estudos similares, como os de Melo et al. (2022) e Farias et al. (2023).

6.3. Bioquímica sanguínea

Através da análise bioquímica do sangue dos pintos nascidos, foi possível observar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis (Tabela 6). Entretanto, nota-se uma tendência para que os níveis mais altos de glicose (mg/dl) e colesterol (mg/dl) fossem observados nos animais dos lotes de ovos não inoculados e inoculados com 2,0% de proteína liofilizada de pescado, respectivamente. Nos lotes inoculados com solução salina e 2,5% de ingrediente, observou-se também a tendência de que os pintos apresentassem níveis de triglicerídeos (mg/dl) e proteínas totais (mg/dl) mais elevados.

Tabela 6. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário na bioquímica sanguínea dos pintos ao nascer.¹

| Tratamentos ² | Glicose (mg/dl) | Ácido úrico (mg/dl) | Triglicerídeos (mg/dl) | Colesterol (mg/dl) | Proteínas Totais (g/L) | Albumina (g/L) | Ureia (mg/dl) |
|--------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
| Ovo íntegro | 208,62 | 5,09 | 62,83 | 274,93 | 15,40 | 12,30 | 17,85 |
| Solução Salina | 188,14 | 9,06 | 136,53 | 170,54 | 37,40 | 12,50 | 13,86 |
| 0,5% PLP | 177,12 | 5,58 | 52,32 | 201,44 | 18,70 | 12,00 | 11,28 |
| 1,0% PLP | 160,47 | 7,08 | 44,64 | 118,13 | 20,80 | 10,30 | 12,17 |
| 1,5% PLP | 167,18 | 5,13 | 56,36 | 235,55 | 15,40 | 11,70 | 16,30 |
| 2,0% PLP | 193,77 | 6,56 | 80,80 | 252,81 | 26,80 | 13,70 | 14,08 |
| 2,5% PLP | 177,48 | 6,22 | 92,32 | 244,96 | 27,80 | 11,90 | 15,80 |
| p-valor ³ | 0,5 ^{ns} | 0,31 ^{ns} | 0,08 ^{ns} | 0,25 ^{ns} | 0,26 ^{ns} | 0,99 ^{ns} | 0,05 ^{ns} |
| CV (%) ⁴ | 21,13 | 44,40 | 71,69 | 50,09 | 68,43 | 46,98 | 25,88 |

¹Todos os dados representam a média de 5 repetições por tratamento.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁴CV = Coeficiente de variação.

Considerando que níveis de glicose abaixo de 150 mg/dl caracterizam hipoglicemia da ave (DAVID, 2008), tais resultados mostram que a inoculação de proteína liofilizada de pescado não estimulou a ocorrência de gliconeogênese no fígado (CAMPBELL, 2004). Os níveis de triglicerídeos obtidos neste estudo também se encontram em conformidade com o que é apresentado na literatura. Porém, os níveis de colesterol apresentaram-se relativamente mais altos do que o observado em trabalhos similares (FARIAS et al., 2023), com os maiores valores observados nos animais provenientes de ovos inoculados com maior adição de proteína liofilizada de pescado e de ovos íntegros, respectivamente. Isto deve-se ao fato de que as aves desta linhagem apresentam desenvolvimento acelerado, menor capacidade de reabsorção de sais biliares e baixa atividade de lipase (ZELENKA, 2000; SANTOS, 2014).

Swenson e O'Reece (1996) estabelecem que o teor médio de proteínas totais em aves fora do período de postura é de cerca de 36 g/L, enquanto a faixa de normalidade para albumina é de 16-20 g/L. Considerando os resultados obtidos neste trabalho possivelmente houve um princípio de quadro de desnutrição dos pintos nascidos, pois os níveis estavam relativamente abaixo do que normalmente foi observado em estudos similares (SALEH et al., 2021; FARIAS et al., 2023), indicando que a conversão dos aminoácidos das soluções testadas em energia não foi satisfatória para os mesmos. Em relação aos níveis de ácido úrico e ureia, devido a conformidade com a faixa normal exposta pela literatura e como não houve efeito da inoculação de proteína liofilizada de pescado, tais resultados indicam que a função renal dos pintos não foi prejudicada (BENEZ, 2004; SCHMIDT et al., 2007).

6.4. Morfometria e Histologia do trato gastrointestinal

Os resultados da morfometria do trato gastrointestinal dos pintos nascidos encontram-se na Tabela 7. Observou-se que os pintos de ovos inoculados com 2,0% e 2,5% de proteína liofilizada de pescado apresentaram uma tendência de maior peso de saco vitelínico, sendo que o lote inoculado com 2,5% também apresentou esta tendência de maiores pesos médios de fígados e estômagos (pró-ventrículo e moela). O coração dos pintos apresentou tendência de maior peso no lote oriundo de ovos inoculados com 1,5% de ingrediente. Melo et al. (2022) obteve resultados similares em seu estudo utilizando a inoculação de creatina monohidratada, com a exceção de que o nível de 2,5% apresentou os menores resultados de pesos destes órgãos.

Tabela 7. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a morfometria do trato gastrointestinal dos pintos ao nascer.¹

| Tratamentos ² | Peso (g) ³ | | | | | Comprimento (cm) ⁴ | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | SV | C | F | P | E | CT | O+E | AD | J+I | Cc | C+R |
| Ovo íntegro | 6,93 | 0,32 | 1,15 | 0,01 ^c | 2,34 | 29,54 | 4,68 | 2,68 ^b | 16,10 | 3,16 | 2,92 |
| Solução Salina | 6,49 | 0,24 | 1,00 | 0,02 ^b | 2,28 | 30,48 | 3,80 | 3,00 ^b | 16,78 | 2,66 | 4,24 |
| 0,5% PLP | 6,51 | 0,34 | 1,01 | 0,03 ^a | 2,39 | 29,00 | 3,58 | 4,22 ^a | 15,92 | 2,28 | 3,00 |
| 1,0% PLP | 5,26 | 0,31 | 0,93 | 0,01 ^c | 2,47 | 30,12 | 3,88 | 2,72 ^b | 14,06 | 2,90 | 6,56 |
| 1,5% PLP | 6,46 | 0,35 | 1,06 | 0,02 ^b | 2,38 | 30,88 | 4,44 | 4,72 ^a | 15,2 | 2,96 | 3,56 |
| 2,0% PLP | 8,28 | 0,33 | 1,23 | 0,03 ^a | 2,48 | 30,32 | 4,50 | 5,04 ^a | 14,54 | 2,68 | 3,74 |
| 2,5% PLP | 7,31 | 0,33 | 1,14 | 0,03 ^a | 2,21 | 26,58 | 4,52 | 2,74 ^b | 13,10 | 2,48 | 4,24 |
| p-valor ⁵ | 0,48 ^{ns} | 0,85 ^{ns} | 0,12 ^{ns} | 0,01 | 0,87 ^{ns} | 0,79 ^{ns} | 0,05 ^{ns} | 0,03 | 0,68 ^{ns} | 0,74 ^{ns} | 0,05 ^{ns} |
| CV (%) ⁶ | 31,35 | 37,16 | 17,25 | 55,15 | 13,81 | 14,61 | 16,56 | 36,10 | 22,68 | 31,1 | 50,64 |

¹Todos os dados representam a média de 5 repetições por tratamento.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³SV = saco vitelino. C = coração. F = fígado. P = pâncreas. E = estômagos (pró-ventrículo + moela).

⁴CT = comprimento total de toda região intestinal. O+E = orofaringe + esôfago. AD = alça duodenal. J+I = jejuno + íleo. Cc = cecos. C+R = cólon + reto.

⁵As médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁶CV = Coeficiente de variação.

Não foi observada diferença significativa nas variáveis de peso, exceto para o órgão pâncreas, cujos valores foram maiores nos tratamentos com inclusão de 0,5%, 2,0% e 2,5% de proteína liofilizada de pescado, respectivamente. Sabendo que o pâncreas é o órgão responsável pela produção de insulina que regulariza o metabolismo da glicose e gorduras no sangue, observou-se que em tais tratamentos houve uma tendência de aumento de glicose, colesterol e triglicérides no sangue destes pintos ocasionando no aumento do órgão devido a sobrecarga causada, o que explica também na alta mortalidade intermediária obtida nestes lotes. E quanto ao desenvolvimento dos intestinos em questão de comprimento relativo, a inoculação influenciou ($p < 0,05$) em algumas regiões particulares, tais como: orofaringe e esôfago, alça duodenal, cólon e reto.

Para corroborar com estes resultados, através da análise histológica observou-se que células caliciformes PAS+ e azul de Alcian+ (carboxiladas e sulfatadas) estão presentes tanto nas vilosidades quanto nas criptas de Lieberkühn de ambos os intestinos delgado e grosso, sejam de pintinhos oriundos de ovos inoculados ou não (Figura 11).

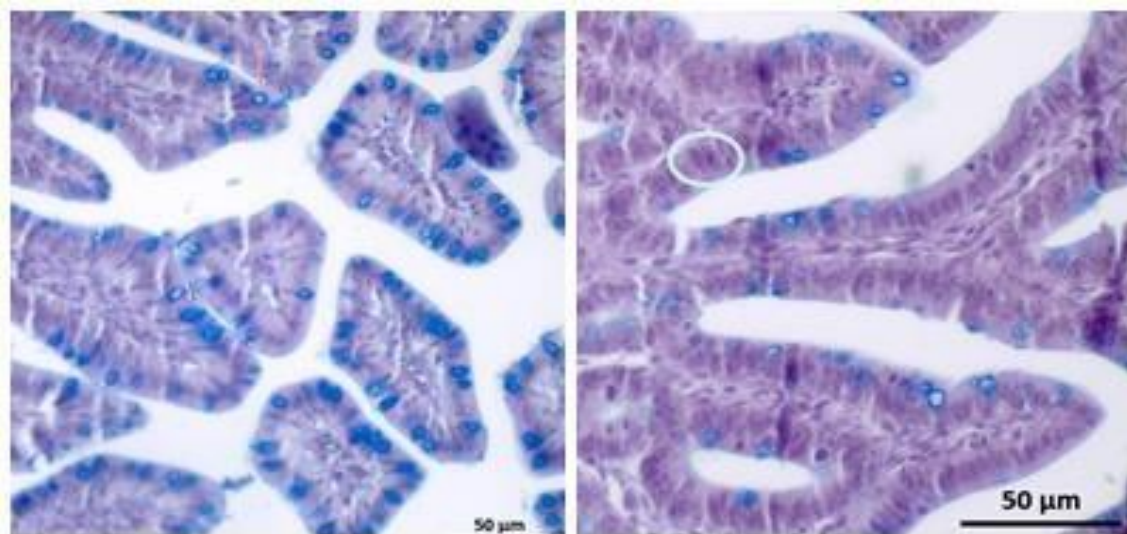


Figura 11. Fotomicrografias representativas das células caliciformes intestinais identificadas por meio de técnicas histoquímicas. Células AB+ Sulfatadas (à esquerda - seta preta); Células AB+ Carboxiladas (à esquerda - seta vermelha); Células PAS+ (à direita - círculo verde).

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Os resultados da análise de densidade de células caliciformes em vilosidades e criptas do intestino delgado (Tabela 8) indicam que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da inoculação de proteína liofilizada de pescado sobre o desenvolvimento de células caliciformes AB+(carboxiladas) e AB+ (sulfatadas) das vilosidades do intestino delgado. Enquanto nas

células PAS+ houve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a densidade, sendo que os pintos oriundos de ovos íntegros apresentaram a maior quantidade de células por milímetro.

Tabela 8. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a densidade de células caliciformes do intestino delgado dos pintos nascidos.¹

| Tratamentos ² | Vilosidades ³ | | | Criptas de Lieberkühn ³ | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | PAS+ | AB+C | AB+S | PAS+ | AB+C | AB+S |
| Ovo íntegro | 71,66 ^a | 33,95 | 2,03 | 48,52 | 37,20 | 6,75 |
| Solução Salina | 42,78 ^{bc} | 16,37 | 2,90 | 18,21 | 46,18 | 1,80 |
| 0,5% PLP | 52,96 ^b | 38,05 | 3,50 | 78,15 | 15,06 | 1,63 |
| 1,0% PLP | 38,06 ^c | 36,66 | 6,86 | 24,33 | 22,15 | 6,14 |
| 1,5% PLP | 20,02 ^c | 28,83 | 3,60 | 14,32 | 46,73 | 6,33 |
| 2,0% PLP | 49,42 ^b | 33,85 | 3,74 | 46,21 | 45,94 | 3,03 |
| 2,5% PLP | 22,12 ^c | 27,11 | 1,63 | 51,73 | 55,53 | 2,65 |
| p-valor ⁴ | 0,003 | 0,85 ^{ns} | 0,83 ^{ns} | 0,91 ^{ns} | 0,05 ^{ns} | 0,63 ^{ns} |
| CV (%) ⁵ | 5,52 | 4,70 | 6,26 | 6,04 | 5,36 | 6,89 |

¹Todos os dados representam a média de 5 repetições por tratamento.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³PAS+ = células caliciformes produtoras de mucinas ácidas. AB+C = células caliciformes produtoras de mucinas carboxiladas. AB+S = células caliciformes produtoras de mucinas sulfatadas.

⁴As médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁵CV = Coeficiente de variação.

No que se refere ao intestino grosso, os resultados encontram-se na tabela 9. Não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) da inoculação de proteína liofilizada de pescado sobre o desenvolvimento de células caliciformes das vilosidades do intestino grosso. Porém, a densidade das células PAS+ das criptas de Lieberkühn apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) tendo o maior nível de inclusão (2,5%) de proteína liofilizada de pescado aumentado a presença de células por milímetro.

Tabela 9. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a densidade de células caliciformes do intestino grosso dos pintos nascidos.

| Tratamentos ² | Vilosidades ³ | | | Criptas de Lieberkühn ³ | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | PAS+ | AB+C | AB+S | PAS+ | AB+C | AB+S |
| Ovo íntegro | 41,86 | 41,52 | 2,96 | 22,72 ^c | 16,33 | 1,58 |
| Solução Salina | 19,73 | 39,35 | 3,20 | 16,20 ^c | 16,39 | 1,88 |
| 0,5% PLP | 13,49 | 37,09 | 6,11 | 5,43 ^c | 22,29 | 4,15 |
| 1,0% PLP | 48,34 | 95,07 | 4,61 | 50,34 ^a | 34,92 | 1,87 |
| 1,5% PLP | 44,79 | 87,22 | 3,09 | 30,73 ^b | 42,62 | 1,56 |
| 2,0% PLP | 69,86 | 80,37 | 1,45 | 19,05 ^c | 21,77 | 2,27 |
| 2,5% PLP | 6,96 | 36,04 | 2,91 | 52,77 ^a | 21,66 | 1,51 |
| p-valor ⁴ | 0,56 ^{ns} | 0,11 ^{ns} | 0,08 ^{ns} | 0,001 | 0,22 ^{ns} | 0,30 ^{ns} |
| CV (%) ⁵ | 7,00 | 4,69 | 5,76 | 6,41 | 5,79 | 5,39 |

¹Todos os dados representam a média de 5 repetições por tratamento.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³PAS+ = células caliciformes produtoras de mucinas ácidas. AB+C = células caliciformes produtoras de mucinas carboxiladas. AB+S = células caliciformes produtoras de mucinas sulfatadas.

⁴As médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁵CV = Coeficiente de variação.

Segundo Gonzales et al (2013), o aumento em densidade de células caliciformes por milímetro indica que o ingrediente utilizado na inoculação tem o potencial de proporcionar a rápida maturação da área intestinal em questão, aumento a capacidade de absorção do tecido. Tal observação corrobora com os resultados obtidos neste estudo para as células caliciformes PAS+ na região das vilosidades do intestino delgado e na região das criptas de Lieberkühn, respectivamente.

Considerando estes resultados, também nota-se que os pintinhos oriundos de ovos inoculados com 1,5% e 2,0% apresentaram uma tendência de evolução notável de estágio da mucosa intestinal devido ao leve acréscimo de células produtoras de mucinas sulfatadas

(AB+S), especialmente nas vilosidades do intestino delgado. E sabendo-se que tais células são avaliadas para atestar a qualidade de dietas em relação a sua influência sobre o trato gastrointestinal, é possível sugerir que, em níveis 0,5% e 1,0%, a proteína liofilizada de pescado influenciou positivamente na melhoria da capacidade digestiva e de absorção destes animais, tal como também foi observado por Gomes (2021) e Farias et al. (2023) em pesquisas similares.

As quatro túnicas intestinais de ambos os intestinos (Figura 12) também foram analisadas quantitativamente (Tabela 10). Não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) da inoculação de proteína liofilizada de pescado sobre o desenvolvimento destas túnicas em ambos os intestinos, indicando que não houve prejuízo ocasionado pela inoculação no desenvolvimento destas estruturas. E além disso, a tendência de valores aproximados na densidade das túnicas mucosa e submucosa em ambos os intestinos entre os tratamentos de ovos íntegros e de ovos inoculados com 0,5% e 1,0% apresentam uma possível maturidade do órgão para os pintos de tais lotes, devido a sua capacidade de absorção aumentada (PEEBLES, 2018).

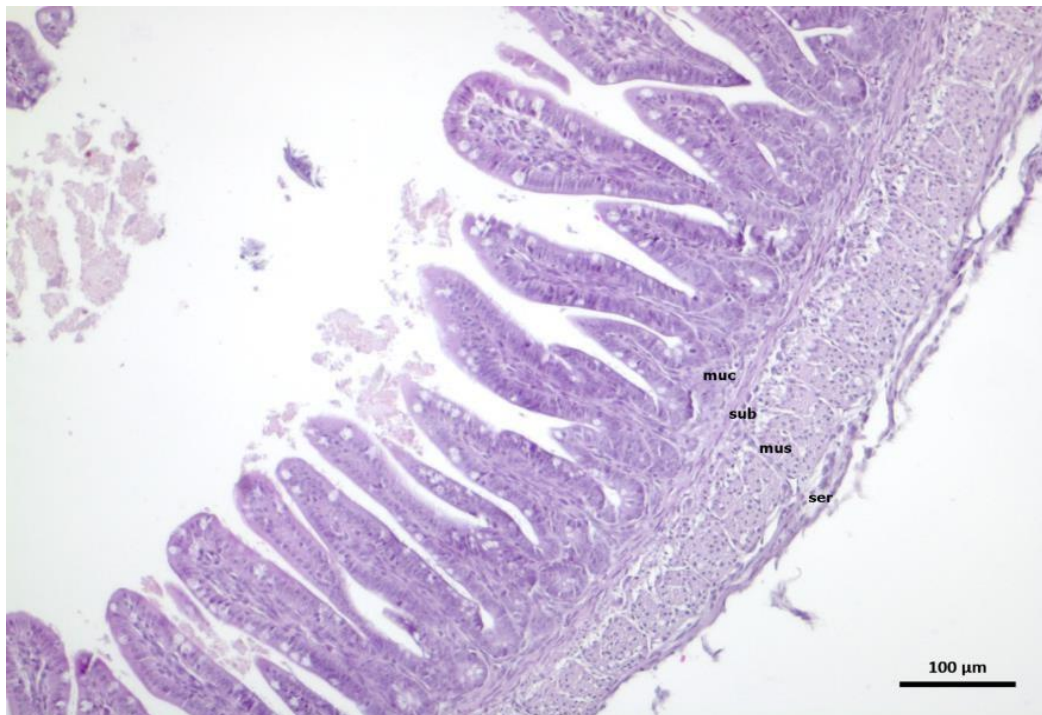


Figura 12. Secção longitudinal do duodeno de pinto recém-eclodido. Túnica mucosa (muc), túnica submucosa (sub), túnica muscular (mus) e túnica serosa (ser). Coloração Hematoxilina-Eosina. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Tabela 10. Efeitos da inoculação *in ovo* de proteína liofilizada de pescado aos 16 dias de desenvolvimento embrionário sobre a densidade das túnicas intestinais dos pintos nascidos.¹

| Tratamentos ² | Intestino delgado ¹ | | | | Intestino grosso ¹ | | | |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | MUC | SUB | MUS | SER | MUC | SUB | MUS | SER |
| Ovo íntegro | 41,60 | 12,23 | 35,01 | 11,15 | 29,71 | 9,96 | 44,66 | 15,67 |
| Solução Salina | 36,60 | 12,09 | 37,89 | 13,41 | 37,14 | 13,65 | 27,63 | 21,57 |
| 0,5% PLP | 44,75 | 9,34 | 32,19 | 13,71 | 29,39 | 10,21 | 46,60 | 13,79 |
| 1,0% PLP | 36,00 | 9,83 | 32,60 | 21,55 | 32,90 | 9,82 | 41,49 | 15,78 |
| 1,5% PLP | 27,75 | 17,61 | 42,59 | 12,03 | 28,55 | 9,70 | 39,35 | 22,39 |
| 2,0% PLP | 38,51 | 9,27 | 41,75 | 10,46 | 31,96 | 11,27 | 37,39 | 19,36 |
| 2,5% PLP | 36,75 | 12,31 | 37,42 | 13,51 | 34,43 | 19,17 | 28,16 | 18,23 |
| p-valor ³ | 0,27 ^{ns} | 0,75 ^{ns} | 0,22 ^{ns} | 0,84 ^{ns} | 0,92 ^{ns} | 0,07 ^{ns} | 0,10 ^{ns} | 0,53 ^{ns} |
| CV (%) ⁴ | 2,73 | 4,13 | 2,44 | 5,34 | 2,64 | 4,68 | 2,51 | 4,19 |

¹Todos os dados representam a média de 5 repetições por tratamento. MUC = túnica mucosa. SUB = túnica submucosa. MUS = túnica muscular. SER = túnica serosa.

²Ovo íntegro = sem inoculação. Solução salina = 0,50%. PLP = proteína liofilizada de pescado. Todos os tratamentos usando PLP foram dissolvidos em solução salina.

³ns = não significativo ($p > 0,05$).

⁴CV = Coeficiente de variação.

De forma geral, analisando-se os resultados morfométricos e histológicos obtidos e correlacionando com as demais variáveis, é possível atestar que a inoculação de proteína liofilizada de pescado tem o potencial de promover o maior desenvolvimento intestinal de embriões Label Rouge. Entretanto, alguns fatores como a particularidade do ingrediente e a própria linhagem avícola utilizada neste estudo foram determinantes para evidenciar que níveis acima de 1,0% de inclusão podem ser prejudiciais para o desenvolvimento dos embriões, impactando diretamente na taxa de eclodibilidade dos lotes e na saúde destes.

7. Conclusão

A suplementação in ovo de proteína liofilizada de pescado em embriões avícolas Label Rouge apresentou resultados satisfatórios de forma geral para aplicação, apesar da baixa taxa de eclodibilidade nos níveis mais elevados, mas com bons resultados de formação do TGI e do peso ao nascer nos níveis de 0,5% e 1,0%, e sem afetar a fisiologia dos pintos.

8. Referências

- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2021**. São Paulo: ABPA. Disponível em: <https://abpa-br.org/relatorios/>. Acesso: Fevereiro/2024.
- ACKMAN, R.G. **Nutritional composition of fats in sea foods**. 1989, p. 161-241. Progress in Food and Nutrition Science, v. 13,
- ALMEIDA, V.R., MORITA, V.S., SGAVIOLI, S., VICENTINI, T.I., CASTIBLANCO, D.M.C., BOLELI, I.C. **Incubation temperature manipulation during fetal development reduces adiposity of broiler hatchlings**. 2016, p. 316-324. Poultry Science, v. 95, n. 2.
- ALVES, L. K. S., VIANA, G. P., DOS SANTOS, T. S., DOS REIS, B. Q., GUIMARÃES, E. B. B., NACIMENTO, R. A., DA SILVA ARAÚJO, C. S. **In-ovo feeding: a review**. 2020, p. 18-18. Veterinária Notícias, v. 26, n. 1,
- AMARAL, N. S. F. **Análise centesimal de filé de tambaqui *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1816)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, Rondônia.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 161 de 01 de Julho de 2022**.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G. A., FRACALOSSO, D. M., FIM, J. D. I. **Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros**. 2002, p. 1059-1069. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31.
- BAKYARAJ, S., BHANJA, S. K., MAJUMDAR, S., DASH, B. **Modulation of post-hatch growth and immunity through *in ovo* supplemented nutrients in broiler chickens**. 2012, p. 313-320. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 92, n. 2,
- BANCROFT, J.D., GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 2008. 4ª ed. London: Els. Hea. Sci. London - Churchill Livingstone.
- BARBOSA, M. C., GUIDA, L. M., FEITOSA, A. C., ZUÑIGA, A. D. G. Avaliação da composição físico-química do concentrado proteico e farinhas liofilizadas obtidos a partir de resíduos do pirarucu (*Arapaima gigas*). 2021. **Scientia Plena**, v. 17, n. 8.
- BARBOSA, V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2011.124p.
- BATALHA, O. D. S., ALFAIA, S. S., CRUZ, F. G. G., JESUS, R. S. D., RUFINO, J. P. F., COSTA, V. R. **Digestibility and physico-chemical characteristics of acid silage meal made of pirarucu waste in diets for commercial laying hens**. 2017, p. 251-257. Acta Scientiarum.

Animal Sciences, v. 39.

BENEZ, S.M. **Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados.** 4ª ed: 2004, p.332. Tecmedd.

BHANJA, S.K., MANDAL, A.B., JOHRI, T.S. **Standardization of injection site, needle site, needle length, embryonic age and concentration of amino acids for *in ovo* injection in broiler breeder eggs.** 2004, p. 105-111. Indian Journal of Poultry Science, v. 39.

BOLELI, I. C., MORITA, V. S., MATOS, J. B., THIMOTHEO, M., Almeida, V. R. Poultry egg incubation: integrating and optimizing production efficiency. 2016, p. 1-16. Brazilian Journal of Poultry Science, v. 18.

BOTELHO, H. A., COSTA, A. C., FREITAS, R. T. F., FERNANDES, E. M. **Análise bromatológica de filé de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomum*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*).** 2017, p. 158-165. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública, v. 4, n. 2,

CAMPBELL, T.W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M.A. et al. **Veterinary hematological and clinical chemistry.** 2004, p. 479-492. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

CAMPOS, E. J. Nutrição da matriz e do embrião. In: MACARI, M., GONZALES, E. **Manejo da incubação.** 2010, p. 454-470. Campinas: FACTA.

CHEVALIER, N. R., AGBESI, R. J. A., AMMOUCHE, Y., DUFOUR, S. **How smooth muscle contractions shape the developing enteric nervous system.** 2021. Frontiers in cell and developmental biology, v. 9.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. **Bioquímica de pescados e derivados.** 1994. Jaboticabal: FUNEP.

COSKUN, I., AKKAN, A., ERENER, G. **Effects of *in ovo* injection of lysine and methionine into fertile broiler (parent stock) eggs on hatchability, growth performance, caecum microbiota, and ileum histomorphology.** 2018. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 47.

CRUZ, F. G. G., RUFINO, J. P. F., MELO, R. D., FEIJÓ, J. C., DAMASCENO, J.L., COSTA, A. P. G. C. 2016, p. 371-391. **Perfil socioeconômico da avicultura no setor primário do estado do Amazonas, Brasil.** Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 9, n. 2.

DANTAS FILHO, J. V., CAVALI, J., NUNES, C. T., NÓBREGA, B. A., DA FONSECA GASPARINI, L. R., DE SOUZA, M. L. R., PORTO, M. O., ROSA, B.R., GASPAROTTO, P. H. G., PONTUSCHKA, R. B. **Composição centesimal, valor calórico e correlação preço-**

- nutrientes de cortes comerciais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*) em diferentes classes de peso corporal (Amazônia: Brasil).** 2021, p. e23510111698-e23510111698. Research, Society and Development, v. 10, n. 1.
- DAVID, J. Hypoglycemia – Spiking mortality syndrome of broiler chickens. In: SAIF, Y., BARNES, H., GLISSON, J., FADLY, A., McDOUGALD, L., SWAYNE, D. **12th Edition of Diseases of Poultry.** 2008, p.1269-1272. Iowa: American Association of Avian Pathologist.
- DAYAN, J., REICHER, N., MELKMAN-ZEHAVI, T., Uni, Z. **Incubation temperature affects yolk utilization through changes in expression of yolk sac tissue functional genes.** 2020, p. 6128-6138. Poultry Science, v. 99, n. 11.
- FAO. **World Food and Agriculture - Statistical Yearbook.** 2023. Rome.
- FARIAS, T. M., CRUZ, F. G. G., RUFINO, J. P. F., OLIVEIRA FILHO, P. A. D., SANTOS, A. N. D. A., BEZERRA, N. D. S., CHAVES, F.A.L, MODA, R. F. **Effect of *in ovo* injection of DL-methionine on hatchability, embryo mortality, hatching weight, blood biochemical parameters and gastrointestinal tract development of breeder chicks.** 2023. 1-10. Animal Biotechnology.
- FERKET, P. R, UNI, Z. **Pre and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed.** 2003, p. 320-327. Poultry Science, v. 82.
- FRANCO, M. L. R. S., FRANCO, N. P., GASPARINO, E., DORADO, D. M., PRADO, M., VESCO, A. P. D. **Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência.** 2013, p. 21-32. Archivos de zootecnia, v. 62, n. 237.
- GERACILDA, L., FERREIRA, V. P. A. **Fatores que afetam a qualidade dos pintos de um dia, desde a incubação até recebimento na granja.** 2011, p. 1-19. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, ano IX, n. 16.
- GESER, L., TENNENBAUM, C. **Idéia Circular - Os 3 princípios do design circular cradle-to-cradle.** Realização: Idéia Circular, 2017. 18 p. Disponível em: <<https://www.ideiacircular.com/o-que-e-cradle-to-cradle/>>. Acesso em: 1 de outubro 2023.
- GIVISIEZ, P. E., MOREIRA FILHO, A. L., SANTOS, M. R., OLIVEIRA, H. B., FERKET, P.R., OLIVEIRA, C. J., MALHEIROS, R. D. **Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for *in ovo* feeding technology.** 2020, p. 6774. Poultry Science, v. 99, n. 12,
- GONZALES, E. C. P., CRUZ, N. S. M, LEANDRO, J. H. ***In ovo* supplementation of 25(OH)D3 to broiler embryos.** 2013, p. 199-202. Poultry Science, v. 15.

- GROFF, P.M., TAKAHASHI, S.E., PADILHA, J.B., BOCHIO, V., SCHADECK, M.M., MAIER, G.S., GORGES, M.H., SANTOS, I.L., MAEDA, E.M. **Importância da temperatura e umidade e os efeitos da luminosidade durante a incubação de ovos férteis de galinhas.** 2017, p. 1-10. Revista Electrónica de Veterinaria, v. 18.
- HOIBY, M., AULIE, A., BJONNES, P. O. **Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation.** 1987, p. 91-94. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 86, n. 1.
- HOSSAIN, M. A., ISLAM, A. F., IJI, P. A. **Growth responses, excreta quality, nutrient digestibility, bone development and meat yield traits of broiler chickens fed vegetable or animal protein diets.** 2013, p. 208-218. South African Journal of Animal Science, v. 43, n. 2.
- HYBRO, B.V. **From Egg to Chicken.** 2007, p. 764-770. Poultry Science, v. 84, n. 5.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 2008. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- KIM, Y. S., BOBBILI, N. K., PAEK, K. S., JIN, H. J. **Production of a monoclonal anti-myostatin antibody and the effects of *in ovo* administration of the antibody on posthatch broiler growth and muscle mass.** 2006, p. 1062-1071. Poultry Science, v. 85, n. 6.
- 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.** 2011, p. 1467-1477. Poultry Science, v. 90.
- LEITÃO, R.A, LEANDRO, N.S.M, STRINGHINI, J.H., CAFÉ, M.B., ANDRADE, M.A. **Effect of maltose, sucrose and glucose supplementation in embryonated low-weight eggs.** 2010, p. 93-100. Acta Scientiarum. Animal Science, v. 32, n. 1.
- LEKSRISOMPONG, N., ROMERO-SANCHEZ, H., PLUMSTEAD, P.W., BRANNAN, K.E., BRAKE, J. **Broiler incubation: Effect of temperature during late incubation on body weight and organs of chicks.** 2007, p. 2685-2691. Poultry Science, v. 86.
- LINS, P. M. **O beneficiamento do pescado.** 2011. Belém, PA: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia.
- LOGAN, M. **Biostatistical Design and Analysis Using R: A Practical Guide.** Hoboken. 2010. NJ: John Wiley & Sons Ltd.
- MACHADO, T. M., DE CÁSSIA CATAPRETA, L., FURLAN, É. F., NEIVA, C.R.P. **Economia circular e resíduo de pescado.** 2020, p. 525-535. Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online), v. 55, n. 4.
- MELO, L.D., CRUZ, F.G.G., RUFINO, J.P.F., MELO, R.D., FEIJO, J.C., ANDRADE, P.G.C., SILVA, F.M.F., OLIVEIRA FILHO, P.A. ***In ovo* feeding of creatine monohydrate**

- increases performances of hatching and development in breeder chicks. 2022, p.2979-2989. *Animal Biotechnology*.
- MESQUITA, R. C. T. **Características corporais e composição centesimal entre machos e fêmeas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- MIRANDA, H. A. F., LOPES, I. M. G., DE LIMA, M. D., FERREIRA, F., PEREIRA, E. B., DA SILVA, L. F., COSTA, L. F. **Efeitos da nutrição *in ovo* no desempenho de frangos de corte: uma revisão**. 2021. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2.
- MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N. **Embriologia básica**. 2008. 365p. Rio de Janeiro: Elsevier do Brasil.
- MORAN Jr., E.T. **Nutrition of the developing embryo and hatchling**. 2007. p. 1043-1049. *Poultry Science*, v. 86, n. 5.
- MORITA, V.S., ALMEIDA V.R., MATOS JUNIOR, J.B., VICENTINI, T.I., VAN DEN BRAND, H., BOLELI, I.C. **Incubation temperature during fetal development influences morphophysiological characteristics and preferred ambient temperature of chicken hatchlings**. 2016. *Plos One*, v. 11, n. 5.
- MORITA, V.S., BOLELI, I.C., CARGNELUTTI FILHO, A. **Hematological values and body, heart and liver weights of male and female broiler embryos of young and old breeder eggs**. 2009, p.7-15. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.11, n.1,
- MURPHY, M.E. **Amino acid compositions of avian eggs and tissues: Nutritional implications**. 1994, p. 27-38. *Journal of Avian Biology*, v. 25.
- MYERS B.M. Carbohydrates, p.161-187. In: BANCROFT, J.D, GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 2008. 4° ed. London: Els. Hea. Sci. London - Churchill Livingstone.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7° ed. 2018. Artmed Editora.
- OETTERER, M., LIMA, U. A. **Variação estacional da composição centesimal do peixe rei de água doce *Pimelodus darias Bloch* (mandi)**. 1975. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, v. 32.
- OGAWA, M., MAIA, E. L. **Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado**. 1999. 453 p. São Paulo, Varela, v. 1.
- 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**.

1999. p. 1493-1498. Poultry Science, v. 78, n. 11.
- OHTA, Y., YOSHIDA, T., TSUSHIMA, N. **Comparison between broilers and layers for growth and protein use by embryos.** 2004, p. 783-787. Poultry Science, v. 83, n. 5.
- OZAYDIN, T., CELIK, I. **Histological, histochemical and immunohistochemical investigations on the developing small intestines of broilers embryos.** 2012, p. 2936-2944. Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 11, n. 16.
- PANTOJA-LIMA, J., ROCHA, M. J. S., CASTRO, L. A., AMARAL, A. C., SCHERER FILHO, C., PAIXÃO, R. V., FEIJÓ, J. C., ARAÚJO, H. S., ARIDE, P. H. R., OLIVEIRA, A. T., MATTOS, B. O. O estado da piscicultura na Amazônia brasileira. p. 86-102. In: MATTOS, B. O., PANTOJA-LIMA, J., OLIVEIRA, A. T., ARIDE, P. H. R. **Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias.** 2021. Atena, Ponta Grossa.
- PEEBLES, E. D. ***In ovo* applications in poultry: a review.** 2018, p. 2322-2338. Poultry Science, v. 97, n. 7.
- PINTO, S. V. **Caracterizações centesimal e dos perfis de ácidos graxos, aminoácidos e minerais dos materiais cárneos de dez pescados amazônicos liofilizados.** 2006. 63 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém.
- RIBEIRO, P. F. F. A. **Processo de liofilização de produtos alimentares perecíveis.** 2012. 117 p. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa.
- ROBISON, F.E., FASENKO, G.M., RENEMA, R.A. **Optimizing chick production in broiler breeders.** 2013. Alberta: Poultry Research Centre, v. 1.
- ROCHA, T. M., ANDRADE, M. A., SANTANA, E. S., FAYAD, A. R., MATIAS, T. D. Aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos de doenças imunossupressoras em aves. 2014.
- ROLIM, R. D. M. E. **Obtenção de concentrado solúvel de sub-produtos do pescado.** 1976. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.
- RUFINO, J. P. F. **Bioeficácia da inoculação de L-glutamina em ovos embrionados de matrizes avícolas.** 2018. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- RUFINO, J. P. F., CRUZ, F. G. G., COSTA, V. R., SILVA, A. F., MELO, L. D., BEZERRA, N. S. **Effect of *In ovo* Feeding of L-Glutamine to Chick Embryos.** 2019, p. 1-8. Brazilian Journal of Poultry Science, v. 21.
- RUFINO, J. P. F., CRUZ, F. G. G., FARIAS, T. M., MELO, L. D. **Uso de**

- aminoácidos na alimentação *in ovo***. 2018, p. 23-39. Revista Científica de Avicultura e Suinocultura, v. 4.
- SAEED, M., BABAZADEH, D., NAVEED, M., ALAGAWANY, M., ABD EL- HACK, M. E., ARAIN, M. A., CHAO, S. ***In ovo* delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge**. 2019, p. 3727- 3739. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 99, n. 8.
- SALES, R. O., MAIA, E. L. **Composição química e classes de lipídios em peixe de água doce tambaqui, *Colossoma macropomum***. 2013, p. 31-44. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 7, n. 2.
- SANTANA, M.H.M., GIVISIEZ, P.E.N., FIGUEIREDO JUNIOR, J.P., SANTOS, E.G. **Incubação: principais parâmetros que interferem no desenvolvimento embrionário de aves**. 2014, p. 3387-3398. Revista Eletrônica Nutritime, v. 11, n. 2.
- SANTOS, I. L. **Influência do peso dos ovos de reprodutoras pesadas com diferentes idades sobre as características dos ovos incubáveis e pintos de um dia**. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- SCHMIDT, E., LOCATELLI-DITTRICH, R., SANTIN, E., PAULILLO, A. **Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão**. 2007, p. 9-20. Archives of Veterinary Science, v. 12, n.3.
- SILVA, A. F., CRUZ, F. G. G., RUFINO, J. P. F., MILLER, W. M. P., FLOR, N. S., ASSANTE, R. T. **Fish by-product meal in diets for commercial laying hens**. 2017, p. 273-279. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v. 39.
- SILVA, J. C., DOS SANTOS FERREIRA, J. V., BARBOSA, N. F., COSTA, B. D. M., DA SILVA, Q. J., DA SILVA, S. R. S., PORTO, A. L. F. **Do lixo para a indústria: recuperação de enzimas colagenolíticas obtidas a partir de resíduos intestinais de peixes para aplicação industrial**. 2020, p. 190-195. Brazilian Journal of Technology, v. 3, n. 4.
- SIMÕES, M.R., RIBEIRO, C.F.A., RIBEIRO, S.C.A., PARK, K.J., MURR, F.E.X. **Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*)**. 2007, p.608-613. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.27, n.3.
- SWENSON, M.J., REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 855 p.
- TAINIKA, B., ŞEKEROĞLU, A. ***In ovo* Feeding Technology for Optimization of Incubation and Hatching in Broiler Chickens**. 2020, p. 183-186. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, v. 8.

- TULLETT, S.G. **Science and the art of incubation.** 1990, p. 1-15. Poultry Science, v. 69, n. 1.
- UNI, Z., FERKET, P. R., TAKO, E., KEDAR, O. ***In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos.** 2005, p. 764-770. Poultry Science, v. 84, n. 5.
- UNI, Z., TAKO, E., GAL-GARBER, O., SKLAN, D. **Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo.** 2003, p. 1747-1754. Poultry Science, v. 82, n. 11.
- WILLIAMS, C.J., ZEDEK, A.S. **Comparative field evaluations of *in ovo* applied technology.** 2010, p. 189-93. Poultry Science, v. 89, n. 1.
- ZELENKA, J., FAJMONOVÁ, E., BLAŽKOV, E. **Apparent digestibility of fat and nitrogen retention in young chicks.** 2000, p. 457-462. Czech Journal of Animal Science, v. 45, n. 10.