



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



**BIOEFICÁCIA DA INOCULAÇÃO DE L-GLUTAMINA EM OVOS EMBRIONADOS
DE MATRIZES AVÍCOLAS**

JOÃO PAULO FERREIRA RUFINO

MANAUS-AMAZONAS

Fevereiro, 2018

JOÃO PAULO FERREIRA RUFINO

**BIOEFICÁCIA DA INOCULAÇÃO DE L-GLUTAMINA EM OVOS EMBRIONADOS
DE MATRIZES AVÍCOLAS**

Orientador: Frank George Guimarães Cruz, Dr.

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

MANAUS-AMAZONAS

Fevereiro, 2018

Ficha Catalográfica

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

R926b Rufino, João Paulo Ferreira
Bioeficácia da inoculação de l-glutamina em ovos embrionados de matrizes avícolas / João Paulo Ferreira Rufino. 2018
55 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Frank George Guimarães Cruz, Dr.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas.

1. alimentação in ovo. 2. aminoácido. 3. biotecnologia. 4. desenvolvimento embrionário. I. Dr., Frank George Guimarães Cruz, II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JOÃO PAULO FERREIRA RUFINO

**BIOEFICÁCIA DA INOCULAÇÃO DE L-GLUTAMINA EM OVOS EMBRIONADOS
DE MATRIZES AVÍCOLAS**

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

Resultado: _____

Banca examinadora:

Frank George Guimarães Cruz, Dr. – UFAM
(Presidente)

Felipe Faccini dos Santos, Dr. – IFAM
(Membro)

Walter de Jesús García Parra, Dr. – UNINILTON LINS
(Membro)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir todos os dias ao dom da vida, por escutar minhas preces, meus lamentos e nunca me desamparar. Tua sabedoria é justa, e só o teu caminho é a verdade e a vida.

Aos meus pais (João Rufino Filho e Joana D'arc Ferreira Rufino), que abriram mão de viver seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Que apesar de todas as dificuldades, pesadelos e tormentos que passamos nesta vida, jamais deixaram de acreditar em mim, que eu deixasse de viver meus sonhos, a vocês serei para eternamente grato.

À minha irmã (Rita de Cássia Ferreira Rufino) pelo apoio e paciência, pelo orgulho que tens de mim e por ter sido à pessoa mais divertida e agradável nos momentos difíceis.

Ao meu avô (João do Nascimento Rufino) que foi a maior inspiração que tive ao escolher minha profissão e seguir o dom da produção animal, e a minha avó (Florência Meireles Rufino) por sempre me apoiar com seu carinho incondicional.

À minha querida Universidade Federal do Amazonas, que desde a graduação me proporcionou uma boa formação acadêmica, uma infraestrutura de qualidade e toda uma condição para que eu pudesse desenvolver meu potencial, além dos amigos que pude conhecer ao longo destes anos.

Aos meus mestres e professores que me proporcionaram o dom do conhecimento teórico, técnico e científico, e me mostraram o caminho para que eu pudesse trilhar esta jornada corretamente.

Ao meu eterno mestre e mentor, Prof. Dr. Frank George Guimarães Cruz, que com meros dois dias de graduação acreditou no meu potencial, e ao longo de todos os anos de universidade e trabalho em conjunto me proporcionou todas as oportunidades que eu poderia ter e sonhar. Foi um formidável orientador, um professor sempre disposto a ensinar, além de uma pessoa e um amigo espetacular.

Aos amigos técnicos Francisco Chaves e Jadilson Barroncas, que ao longo de todos estes anos sempre tiveram a paciência de me ensinar e chamar a atenção quando necessário, de estar comigo nas dificuldades do dia-a-dia, de compartilhar os momentos bons e ruins. Não são apenas colegas de trabalho, mas sim, amigos que levarei para toda a vida.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que compartilharam estes anos de estudo e a amizade que foi construída a partir destes. Faço aqui um agradecimento especial à André Ferreira, Valcely Rocha e Cristiane Cunha, amigos que auxiliaram em todas as etapas, principalmente durante a execução do experimento.

Aos amigos do Setor de Avicultura (Ramon, Julmar, Lucas, Ana Paula, Natalia, Fernanda, André, Val, Cris, Pedro, Adriene, Thaysa, Eduardo, Gilberto dentre outros). Todos foram importantes na construção desta caminhada, seja no dia-a-dia, nas viagens, nos Encontros de Avicultura, nos abates de madrugada, nos experimentos, nas atividades de campo, a todos eu sou muito grato.

Aos amigos Zoobrothers (Uriel, Ramon, Tanaka, Lucas, Marialva, Julmar, Pedro, Eduardo e Adriano) por toda ajuda, amizade, companheirismo, experiências, comemorações e conselhos em todos estes anos. Sei que nossa amizade será para a vida toda.

A Biatrix Lima Rocha, a pessoa mais especial que conheci durante esses anos de mestrado. Foi graças a você e ao seu companheirismo incondicional que tive forças nos momentos mais difíceis e pude superar os obstáculos. Você foi o melhor presente que a vida me proporcionou.

A todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para que eu chegasse até aqui nesta jornada, por todo o apoio, auxílio, conselhos, amizade e companheirismo.

MEUS SINCEROS E ETERNOS AGRADECIMENTOS.

"O dado mais importante que separa o ser humano de todos os seus irmãos e primos da escala filogenética é o conhecimento. Só o conhecimento liberta o homem. Só através do conhecimento o homem é livre, e em sendo livre, ele pode aspirar uma condição melhor de vida para ele e todos os seus semelhantes. Eu só consigo entender uma sociedade na qual o conhecimento seja a razão de ser precípua que o governo dá para a formação do cidadão. A minha mensagem é positiva, é de que o homem tem de saber, conhecer. Em conhecendo, ele é livre."

Professor Enéas Ferreira Carneiro

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos e o potencial biológico da L-glutamina para fins de inoculação em ovos embrionados. O estudo 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, Manaus, Amazonas, Brasil. Foram realizados dois experimentos para avaliação da bioeficácia da L-Glutamina para fins de inoculação in ovo. No primeiro experimento, foram utilizados 315 ovos férteis oriundos de matrizes Rhode Island Red (32 semanas de idade). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado onde os tratamentos foram constituídos por duas soluções controle e cinco soluções experimentais contendo níveis crescentes de L-glutamina, com 45 repetições (ovos) por tratamento. No primeiro experimento foram avaliados os rendimentos de incubação, a relação pinto/ovo, os parâmetros bioquímicos séricos e o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos diretamente relacionados e regiões) dos pintos ao nascer. No segundo experimento, foram utilizados 300 ovos férteis oriundos de matrizes Rhode Island Red (42 semanas de idade). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram constituídos por duas soluções controle e três soluções experimentais contendo L-glutamina e L-glutamina + Proteína Isolada de Soja (PIS), com 60 repetições (ovos) por tratamento. No segundo experimento foram avaliados os rendimentos de incubação, a relação pinto/ovo e o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos diretamente relacionados e regiões) dos pintos ao nascer. A análise estatística foi realizada através do programa computacional SAS (2008), onde os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as estimativas dos tratamentos do Experimento 1 serão analisados por regressão polinomial à 0,01 e 0,05 de significância, enquanto as médias dos tratamentos do Experimento 2 foram avaliadas pelo teste de Tukey a 0,01 e 0,05 de significância. Os resultados deste estudo indicaram que até 0,5% de L-glutamina pode ser utilizada para fins de alimentação in ovo em embriões avícolas, proporcionando melhor eclodibilidade maior peso do pintinho ao nascer, maior desenvolvimento do trato gastrointestinal e atuando como regulador do metabolismo bioquímico sérico. Quando consorciada com a Proteína Isolada de Soja (1,0%), a L-glutamina obteve resultados satisfatórios de eclodibilidade, não afetando negativamente a mortalidade emrionária intermediária e apresentando bom desenvolvimento do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: alimentação in ovo, aminoácido, biotecnologia, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects and biological potential of L-glutamine for in ovo feeding (IOF) at fertile eggs. This study was conducted at the Laboratory of Poultry Technology, Poultry Sector, Department of Animal and Vegetable Production (DPAV), College of Agrarian Sciences (FCA), Federal University of Amazonas (UFAM), South Sector at the University Campus, Manaus, State of Amazonas, Brazil. Two trials were developed to evaluate the bioefficacy of L-glutamine for IOF. In the first trial, 315 fertile eggs Rhode Island Red (breeders with 32-weeks) were used. The experimental design was completely randomized with the treatments constituted by two controls and five solutions containing L-glutamine levels with 45 replicates (eggs) each. The variables evaluated were incubation yields (hatchability, embryo mortality and chick/egg correlation), serum biochemical parameters and gastrointestinal tract development (directly related organs and regions) of hatched chicks. In the second trial, 300 fertile eggs Rhode Island Red (breeders with 42-weeks) were used. The experimental design was completely randomized with the treatments constituted by two controls and three solutions containing L-glutamine and L-glutamine + ISP (Isolated Soy Protein), with 60 replicates (eggs) each. The variables evaluated were incubation yields (hatchability, embryo mortality and chick/egg correlation) and gastrointestinal tract development (directly related organs and regions) of hatched chicks. Statistical analysis was performed from software SAS 9.8 developed by SAS Institute Inc. The data were subjected to variance analysis, with the estimates of treatments of the first trial were submitted to polynomial regression at 0.01 and 0.05 of significance, and estimates of treatments of the second trial were evaluated by Tukey test at 0.01 and 0.05 of significance. The results of this study indicate that until 0.5% L-glutamine may be supplemented in ovo to chick embryos without negative influence on chick weight and gastrointestinal tract development, acting as serum biochemical metabolism regulator and obtaining better hatchability. The L-glutamine together with 1.0% ISP obtained medium hatchability, don't affected the intermediary embryo mortality and showed good gastrointestinal tract development.

Keywords: amino acid, biotechnology, embryo development, in egg feeding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica do procedimento de inoculação de substâncias in ovo utilizando variações na metodologia de aplicação	5
Figura 2. Escalas da mortalidade embrionária	5
Figura 3. Estrutura química da glutamina	9
Figura 4. Representação esquematizando o fluxo de circulação cardiovascular e o metabolismo respiratório do embrião avícola	12
Figura 5. Representação esquematizando o embrião e suas estruturas anexas aos 7 dias de incubação	13
Figura 6. Embrião aos 12 dias de incubação. Neste estágio, o corioalantóide envolve todo o conteúdo do ovo e ocorre plena embebição do líquido amniótico	13
Figura 7. Embrião de galinha iniciando a bicagem interna da casca (A) e finalizando a bicagem externa (B).....	14
Figura 8. Foto aérea do Setor de Avicultura de FCA/UFAM	16
Figura 9. Perfuração da casca do ovo para inoculação das soluções.....	17
Figura 10. Inoculação in ovo das soluções	18
Figura 11. Ovos com os orifícios utilizando parafina fundida	18
Figura 12. Análise de mortalidade embrionária (embriodiagnóstico)	19
Figura 13. Análise do trato gastrointestinal.....	20
Figura 14. Comportamento da inoculação de L-glutamina sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária intermediária	24
Figura 15. Comportamento da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária intermediária	29
Figura 16. Certificado emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo n. 016/2016) da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, aprovando a execução do estudo.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Disposição dos tratamentos no primeiro experimento.....	17
Tabela 2. Disposição dos tratamentos no segundo experimento	20
Tabela 3. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.....	23
Tabela 4. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos)	24
Tabela 5. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (regiões).....	25
Tabela 6. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre os parâmetros bioquímicos séricos dos pintainhos	25
Tabela 7. Efeitos da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.....	28
Tabela 8. Efeitos da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos).....	29
Tabela 9. Efeitos da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (regiões).....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. INCUBAÇÃO ARTIFICIAL E A CADEIA PRODUTIVA DE PINTOS	2
2.2. DESENVOLVIMENTO DO TRATO GASTRINTESTINAL DE PINTOS NO PERÍODO FINAL DE INCUBAÇÃO E PÓS-ECLOSÃO	3
2.3. ALIMENTAÇÃO IN OVO	4
2.4. PRINCIPAIS NUTRIENTES UTILIZADOS NA ALIMENTAÇÃO IN OVO	7
2.5. GLUTAMINA NA NUTRIÇÃO DE AVES	8
2.6. PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA	11
2.7. CONTEÚDO ENERGÉTICO E SUA UTILIZAÇÃO PELO EMBRIÃO	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	16
3.2. PRIMEIRO EXPERIMENTO	16
3.2.1. MONTAGEM EXPERIMENTAL	16
3.2.2. VARIÁVEIS ANALISADAS	19
3.3. SEGUNDO EXPERIMENTO	20
3.3.1. MONTAGEM EXPERIMENTAL	20
3.3.2. VARIÁVEIS ANALISADAS	21
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. PRIMEIRO EXPERIMENTO	23
4.1.1. RESULTADOS	23
4.1.2. DISCUSSÃO	26
4.2. SEGUNDO EXPERIMENTO	28
4.2.1. RESULTADOS	28
4.2.2. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS	34
7. ANEXOS	43

1. INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais, minerais e/ou orgânicos como componentes de substâncias para os mais diversos segmentos da produção animal tem sido uma tecnologia amplamente difundida nos últimos anos, principalmente devido ao encorajamento na utilização de substâncias orgânicas pelo fato destas não deixarem resíduos prejudiciais ao meio ambiente.

E integrada a este contexto, a inoculação, que também é uma tecnologia recente dentro da avicultura moderna, ainda segue na contrapartida deste conceito devido utilizar em larga escala substâncias oriundas da produção laboratorial refinada como vacinas, promotores de crescimento modificados e mais recentemente substâncias nutritivas produzidas e/ou isoladas por enzimas e microrganismos como carboidratos, glicídios, ácidos orgânicos dentro outras.

As pesquisas com inoculação in ovo precisam ser desenvolvidas com o objetivo de avaliar o seu impacto sobre o desenvolvimento fisiológico do pintainho, buscando sempre incremento na viabilidade econômica e otimização do manejo de incubatório nas suas mais variadas fases.

Neste sentido, os nutrientes utilizados durante o processo 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 (β -hidroxi-metil-butilato e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina) e/ou agentes tróficos da mucosa intestinal (zinco e ácido butírico).

Outrora, 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. Esses são utilizados como fonte para produção de glicose, crucial para o desenvolvimento embrionário, além de elevar as atividades enzimáticas, aumentando a capacidade de digestão e absorção dos nutrientes, com destaque para a crescente utilização da glicose, da sacarose, da maltose e da dextrina.

A utilização de aminoácidos, como a L-glutamina, para fins de inoculação in ovo surge como uma alternativa visando atender esta lacuna existente na comunidade científica e na indústria avícola, relacionada ao desenvolvimento desta biotecnologia.

Diante do exposto, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos e o potencial biológico da L-glutamina para fins de inoculação em ovos embrionados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INCUBAÇÃO ARTIFICIAL E A CADEIA PRODUTIVA DE PINTOS

A incubação artificial pode ser considerada uma prática antiga na produção agropecuária, tendo em vista que há evidências datadas do século IV A.C onde os egípcios incubavam ovos em larga escala. Tanto o Egito, quanto a China, foram sociedades que utilizaram e aperfeiçoaram à técnica de incubação artificial de ovos (SALES, 2000) para a produção em escala de pintos.

No Brasil, as primeiras incubadoras disponibilizadas no mercado eram importadas, com a fabricação nacional se iniciando apenas na década de 60, com quase todos os modelos baseados nos importados. Somente na década 80 uma empresa americana se estabeleceu no Brasil, fabricando incubadoras mais modernas, com tecnologia de fácil operação, atendendo a uma forte exigência do mercado consumidor (CAMPOS, 2000).

Por muitos anos a incubação não recebeu a devida atenção dos pesquisadores e se caracterizava por uma área não estratégica dos complexos avícolas. Porém, atualmente, a avicultura moderna se volta cada vez mais para o tema incubação, com inovação nas pesquisas nos diversos parâmetros que envolvem esse segmento (CALIL, 2007). A tecnologia impulsiona esse avanço a partir do aprimoramento de equipamentos cada vez mais precisos que regulam todos os fatores que podem influenciar no sucesso da incubação dos ovos (SANTANA et al., 2014).

A incubação de ovos férteis alicerça a cadeia produtiva de aves, pois gera o produto a ser explorado em campo e seus resultados podem comprometer toda a rentabilidade do segmento. Por sua vez, o manejo empregado desde a postura dos ovos na granja de matrizes até o momento da eclosão no incubatório, interfere nos resultados de eclodibilidade e qualidade do pintainho produzido (SANTANA et al., 2014).

O conteúdo presente no vitelo e em outras estruturas do ovo dão suporte nutricional e fisiológico ao embrião durante todo o período de incubação, pois possuem todos os nutrientes necessários, fontes de energia e água que serão utilizados durante o desenvolvimento embrionário. Além desses nutrientes, os ovos necessitam de temperatura adequada e de movimentação periódica de rotação, evitando a aderência do embrião à parede interna do ovo, onde se situam as membranas internas. É fundamental o transporte de taxas adequadas de oxigênio do ar e de vapor d'água, dióxido de carbono e também calor, originados do metabolismo das células embrionárias durante a execução das complexas etapas do desenvolvimento (SCALA JÚNIOR, 2003; SANTANA et al., 2014).

O sucesso do processo de incubação depende, em primeira instância da qualidade da matéria-prima (ovos férteis) fornecida pelas granjas de matrizes, que deve garantir a qualidade física e química dos ovos a serem incubados. A prática de manejo como seleção, classificação e desinfecção de ovos devem ser realizadas de forma rigorosa pelo incubatório, pois estes métodos melhoram os índices de eclosão e o desempenho pós-nascimento (GERACILDA & FERREIRA, 2011).

2.2.DESENVOLVIMENTO DO TRATO GASTRINTESTINAL DE PINTOS NO PERÍODO FINAL DE INCUBAÇÃO E PÓS-ECLOSÃO

Considera-se que as funções do sistema gastrointestinal dos frangos começam a se desenvolver quando o fluido amniótico é oralmente consumido por volta do 16º ao 17º dia de incubação (FERKET & UNI, 2006). A inoculação de nutrientes no líquido amniótico permite, portanto, a introdução de nutrientes específicos em contato com o enterócito antes da eclosão, direcionando sua diferenciação e melhorando a capacidade de digerir alimentos pelos embriões (VIEIRA, 2005). A inoculação de nutrientes in ovo também eleva o nível de nutrientes disponível ao embrião, principalmente glicose, evitando assim a gliconeogênese de proteínas endógenas. Por outro lado, quando em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar desequilíbrio osmótico, resultando na morte imediata do embrião (CAMPOS et al., 2011).

Outrora, durante os últimos dias de incubação, o trato gastrointestinal é uma das regiões que mais se desenvolve, passando de 1% do peso do embrião aos 18 dias de incubação para 3,5% no momento da eclosão. Segundo Uni et al. (2003), esse aumento do peso pode ser atribuído ao rápido desenvolvimento dos vilos na fase final de incubação, estando diretamente relacionado com a ingestão do líquido amniótico nos últimos dias de incubação.

Após a eclosão, o trato gastrointestinal continua a se desenvolver rapidamente, e de acordo com Dror et al. (1977), os órgãos do aparelho digestivo de pintos de corte atingem o peso relativo máximo entre 3 e 8 dias de idade. Todavia, conforme Akiba e Murakami (1995), e Noy e Sklan (1999), logo após a eclosão, o peso do intestino delgado aumenta mais rapidamente do que o peso corporal.

Quanto ao desenvolvimento intestinal, especificamente, este não apresenta um padrão de crescimento uniforme em seus diferentes segmentos, sendo que o duodeno apresenta desenvolvimento mais precoce que o jejuno e o íleo (UNI et al., 1999). A mucosa intestinal apresenta desenvolvimento mais lento que o aumento do diâmetro intestinal até, aproximadamente, 14 dias de idade (NOY & SKLAN, 1997). Ao nascimento, os enterócitos e

as vilosidades encontram-se pouco desenvolvidos e reduzidas criptas são observadas. Estas criptas aumentam em número e tamanho e se proliferam rapidamente nos primeiros dias após o nascimento (GEYRA et al., 2001).

E apesar de no momento da eclosão, os pintos estarem aptos a consumir dietas exógenas, seu trato gastrointestinal ainda não encontra-se plenamente desenvolvido. E a adaptação à ingestão de alimentos depende do rápido desenvolvimento dos mecanismos de digestão e absorção de nutrientes, que por sua vez dependem diretamente do estímulo dado pela passagem de alimento no trato digestivo (VIEIRA & POPAL, 2000).

A maturidade da mucosa intestinal é representada pelo aumento na produção e atividade das enzimas digestivas, dos transportadores de membrana e pelo desenvolvimento dos enterócitos das criptas (NISTAN et al., 1991). Estudos demonstraram que a maturidade intestinal pode ser influenciada por agentes tróficos, que estimulam o processo mitótico das células intestinais, e estão relacionados com a ingestão e digestão dos alimentos, bem como com as propriedades químicas dos nutrientes presentes no lúmen intestinal. O atraso no fornecimento de ração resultou em retardo no desenvolvimento da mucosa (UNI et al., 1998).

Estudos prévios demonstraram que a alimentação imediatamente a pós-eclosão aumenta o desenvolvimento morfológico do intestino delgado (NOY & SKLAN, 1998), enquanto que o fornecimento tardio prejudica o desenvolvimento da mucosa intestinal (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 1998; UNI et al., 2003). Nesse contexto, já verificou-se que pintos não alimentados nas primeiras 48 horas após a eclosão apresentam menor comprimento de vilos (YAMAUCHI et al., 1996) e menor tamanho de cripta (GEYRA et al., 2001).

2.3.ALIMENTAÇÃO IN OVO

A tecnologia de alimentação in ovo, ou “nutrição in ovo”, ou mesmo “inoculação in ovo”, deriva da tradução da terminologia em inglês “in egg feeding”, e é considerada uma prática recente na ciência avícola e na indústria avícola.

Esta tecnologia de suplementação de nutrientes, com patente registrada nos EUA (registro n. 6.592.878) em nome de Uni e Ferket (2003), consiste na administração de nutrientes exógenos através do líquido amniótico ou da cavidade alantoide (Figura 1) para galináceos ou perus com idade de incubação aproximada entre 17 e 23 dias, respectivamente (FOYE et al., 2006), com a finalidade de aumentar o estado nutricional ou disponibilizar nutrientes ao embrião, objetivando maior eficiência digestiva; redução da mortalidade e da morbidez pós-eclosão, além de melhor desenvolvimento do sistema imunológico (UNI & FERKET, 2004; LEITÃO et al., 2005).

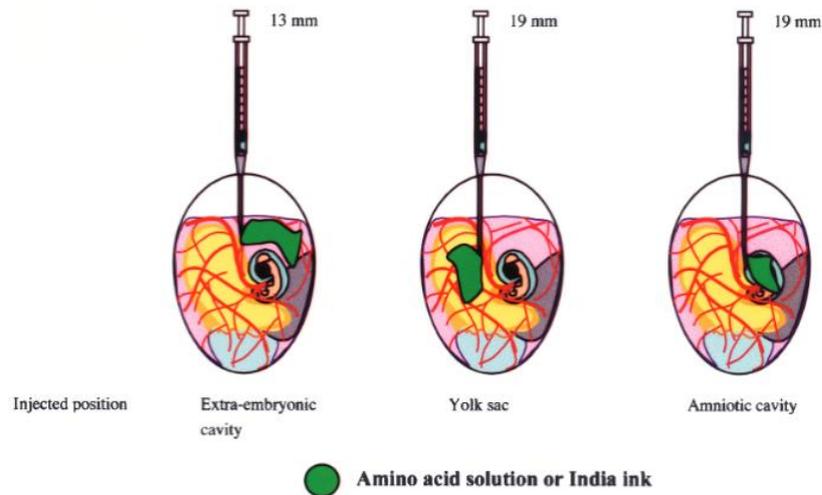


Figura 1. Representação gráfica do procedimento de inoculação de substâncias in ovo utilizando variações na metodologia de aplicação (OHTA & KIDD, 2001).

Todavia, estas respostas positivas não só dependem da composição da solução, mas também do volume e osmolaridade da solução injetada no âmnio (FERKET et al, 2005). Em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar um desequilíbrio osmótico resultando no óbito do embrião (DAMASCENO et al., 2017) em fase intermediária (pintos e/ou embriões mortos entre 16 e 18 dias de incubação), tardia (pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo) ou pós-bicagem (pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, com bicagem da casca do ovo) (Figura 2).

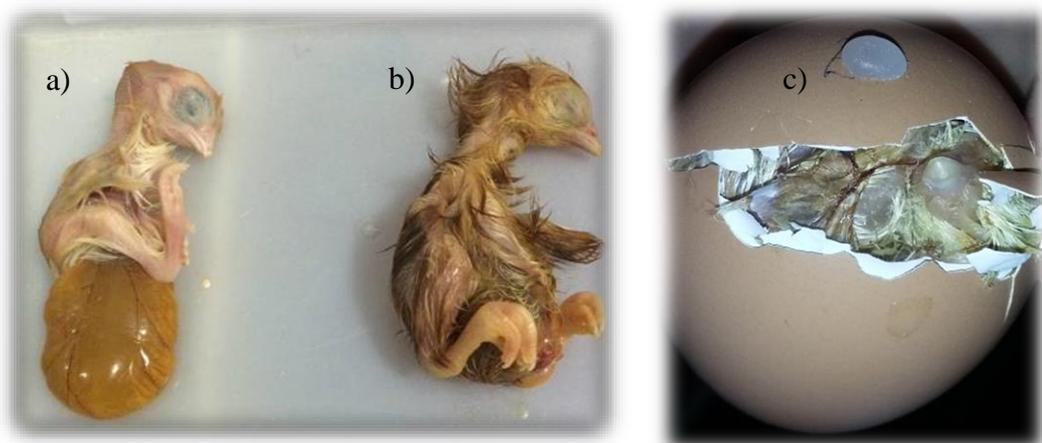


Figura 2. Escalas da mortalidade embrionária: a) embrião morto em período intermediário; b) embrião morto em período tardio; e c) embrião morto pós-bicagem da casca do ovo. Arquivo pessoal de João Paulo Ferreira Rufino.

A disponibilização destas substâncias como suplementos nutricionais na fase de pré-incubação visa melhorar o desenvolvimento inicial do trato digestivo, a fim de impulsionar as enzimas digestivas e um maior crescimento das vilosidades intestinais (GEYRA et al., 2001). Além disso, o acesso rápido do pintainho aos alimentos pode auxiliar na melhora do seu desempenho, do desenvolvimento intestinal e, conseqüentemente, do crescimento de outros órgãos do corpo (LEITÃO et al., 2005).

Durante o período de incubação e nas primeiras horas após a eclosão, as aves possuem limitadas funções digestivas, o que, conseqüentemente, reduz a disponibilidade de nutrientes para o seu metabolismo de crescimento, e restringe sua capacidade digestiva, que começa a se desenvolver quando o líquido amniótico é consumido por via oral à cerca de 17 dias de incubação (UNI et al., 2005).

Do 15° ao 19° 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 (UNI, 2003; CAMPOS et al., 2010). Além disso, tem-se demonstrado que o embrião possui enzimas digestivas (SKLAN et al., 2003) que tornam possível a nutrição na fase pré-eclosão. Assim, o embrião pode consumir naturalmente nutrientes pela via oral antes de nascer (FERKET & UNI, 2006).

Já comprovou-se que os embriões avícolas apresentam em suas reservas fisiológicas uma quantidade limitada de nutrientes disponíveis para seu desenvolvimento. E o fornecimento de nutrientes exógenos intra ovo durante o desenvolvimento embrionário pode funcionar como uma fonte extra de nutrientes para esse desenvolvimento, resultando em um maior peso ao nascimento, maior viabilidade, maior vigor, entre outros. Para tanto, é necessário definir quais nutrientes utilizar, o período e local da administração, a forma de fazer esta administração entre outros fatores.

De acordo com Kidd (2004), as pesquisas com alimentação in ovo precisam ser desenvolvidas com o objetivo de avaliar o seu impacto sobre o crescimento do pintainho, buscando sempre um aumento da viabilidade econômica. Para isso, é necessária a disponibilidade dessa tecnologia de forma prática para as empresas em uma base comercial. Atualmente, a alimentação in ovo já é uma realidade em centros de incubação de alguns países como Estados Unidos, Japão, França, Holanda e outros, sendo utilizada principalmente para a vacinação de embriões no ovo (JOCHEMSEN & JEURISSEN, 2002), e mais recentemente, para disponibilização de nutrientes exógenos in ovo.

No manejo técnico, os pesquisadores afirmam que, dependendo de vários fatores como a fase de desenvolvimento do embrião e a composição da solução, pode ser determinado o

volume ideal a ser aplicada em diferentes locais de ovo, em diferentes concentrações, em diferentes osmolaridades e outros parâmetros. No entanto, a falta de informação sobre os efeitos da inoculação de diversas substâncias sobre a fisiologia do embrião, continua impedindo o pleno desenvolvimento de tecnologias voltadas para a industrialização do processo de inoculação (GEYRA et al., 2001; JOCHEMSEN e JEURISSEN, 2002; LEITÃO et al., 2014).

2.4.PRINCIPAIS NUTRIENTES UTILIZADOS NA ALIMENTAÇÃO IN OVO

Ainda que o ovo seja considerado completo em termos nutricionais, os percentuais de aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e lipídeos, são suficientes no terço inicial da incubação, estando aquém dos níveis desejáveis no terço final e durante a eclosão (GONÇALVES et al., 2013). Conforme Abed et al. (2011), o acesso imediato ao alimento logo após a eclosão, asseguram um ótimo desempenho de frangos de corte na idade de abate, visto que estas aves não possuem potencial compensatório para crescimento retardado devido a um longo período de privação nutricional durante o período neonatal. Contudo, o acesso a nutrientes poderá ocorrer já na fase embrionária, antecipando este período de privação.

Os nutrientes utilizados podem estar envolvidos com diferentes funções: fontes de energia (sacarose, dextrina, maltose e glicose), ativação do sistema imunológico (vitamina E, cobre e probióticos), metabolismo e anabolismo protéico (HMB e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina) e/ou agentes tróficos da mucosa intestinal (glutamina, zinco e ácido butírico) (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2005; CAMPOS et al., 2010; LEITÃO et al., 2014).

Neste contexto, pouco se sabe também acerca dos tipos de nutrientes que podem ser utilizados na nutrição do embrião. Muitas vezes, são omitidos os níveis e a composição dos nutrientes inoculados in ovo (UNI, 2003). Uma linha que pode nortear a busca de nutrientes a serem utilizados é o estudo específico da composição e suplementação do saco vitelino. O saco vitelino, naturalmente, é a fonte primária de nutrição do pinto (BURNHAM et al., 2001) e contém, aproximadamente, 51,7% de PB, 32,6% de EE, 4,8% de cinzas e pequena quantidade de carboidratos (VIEIRA & MORAN, 1998). E embora os aminoácidos presentes na gema possam ser suficientes durante o processo de eclosão, após o nascimento, as reservas do saco vitelino da ave são insuficientes para o processo de crescimento (OHTA et al., 2004).

Os carboidratos estão sendo amplamente testados na nutrição embrionária, por serem componentes importantes do ovo e de grande importância para a fase final do desenvolvimento embrionário (UNI et al., 2005). Esses são utilizados como fonte para

produção de glicose, que é crucial para o desenvolvimento embrionário (MORAN, 1985), além de elevar as atividades das enzimas produzidas no intestino aumentando a capacidade de digestão e absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, o desempenho do animal. Entre os carboidratos mais utilizados estão a glicose, sacarose, maltose e dextrina.

Pesquisas com a utilização de aminoácidos na alimentação *in ovo* são escassas na literatura. Entretanto, alguns ensaios e trabalhos de pesquisa já realizados verificaram que os aminoácidos podem ser administrados tanto sozinhos como conjuntamente em soluções, com destaque para a glutamina e a β -hidroxi-metil-butilato (metabólico da leucina), podendo ainda ser utilizada a arginina. O objetivo principal de se fornecer estes aminoácidos seria o papel importante desses no metabolismo da proteína muscular e sua relação positiva com a síntese protéica e com o hormônio do crescimento (glutamina) (OHTA et al., 1999; CAMPOS et al., 2010).

Nestes trabalhos, a utilização de aminoácidos já mostrou-se viável para uso na alimentação *in ovo* (OHTA et al., 1999), proporcionando melhora no peso ao nascer do pintainho por meio do aumento no conteúdo de aminoácidos do embrião (OHTA et al., 2001) e da gema para consumo pelo mesmo (AL-MURRANI, 1982).

Outros nutrientes que podem ser destacados para uso na alimentação *in ovo* são as vitaminas e os minerais devido às suas importâncias no desenvolvimento embrionário. A deficiência de vitaminas durante a incubação, por exemplo, pode causar anormalidades como bicos pequeno ou alto, protrusões desorganizadas no cérebro, vísceras expostas, membros encurtados e torcidos, corpo curto e degeneração (CAMPOS et al., 2010).

Já as deficiências de minerais específicos também podem ser rapidamente induzidas em embriões em desenvolvimento quando as reprodutoras recebem quantidades insuficientes destes, levando a reduzido crescimento, desenvolvimento anormal de todos os órgãos e em casos extremos à morte do embrião (SAVAGE, 1968).

2.5. GLUTAMINA NA NUTRIÇÃO DE AVES

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no fluído extracelular (aproximadamente 25% do total dos aminoácidos) e no pool de aminoácidos livres no corpo (mais de 60% do total de aminoácidos livres no músculo esquelético) (PIVA et al., 2001). Tem grande importância nos processos metabólicos, sendo indispensável para o crescimento da maioria das células e tecidos (PIERZYNOWSKI et al., 2001).

Os principais tecidos corporais produtores de glutamina são os músculos esqueléticos, responsáveis pela manutenção dos níveis plasmáticos e por prover outros tecidos com esse

aminoácido. Pode ser sintetizada por vários outros tecidos corporais e é classificada como dieteticamente não essencial (LACEY & WILLMORE, 1990). Em condições basais, o músculo esquelético libera glutamina continuamente para o plasma.

A glutamina ou L-glutamina é tradicionalmente classificado como aminoácido dieteticamente não essencial, devido à capacidade de ser sintetizada a partir de outros aminoácidos ou nutrientes da ração (BERTECHINI, 2006). Tem sido tema de diversos estudos em humanos e animais por sua participação em funções metabólicas relevantes, como o transporte e a doação de nitrogênio, o controle do equilíbrio ácido-básico e a integridade tecidual.

Sob condições de elevada degradação protéica, a glutamina pode atuar como regulador metabólico para aumentar a síntese e reduzir o catabolismo protéico. Tais circunstâncias incluem períodos de estresse, períodos de crescimento rápido dos tecidos e doenças, no qual a síntese endógena pode não ser suficiente (LOBLEY et al., 2001).

A sua estrutura apresenta dois grupos nitrogenados facilmente mobilizáveis, um grupo alfa-amino e uma amida (Figura 3), sendo esses grupos nitrogenados o que a diferencia dos outros aminoácidos, pois funciona como veículo para intercâmbio tissular de nitrogênio e amônia da periferia para os órgãos viscerais (DARMAUN & HUMBERT, 2000). Há duas enzimas responsáveis diretas pela síntese e degradação da glutamina: glutamina sintetase e glutaminase.

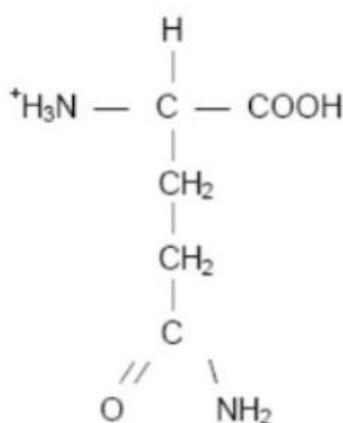


Figura 3. Estrutura química da glutamina. Adaptado de Murray et al. (2002).

A glutamina é responsável por regular os níveis de amônia nos tecidos, a qual pode ser tóxica para as células corporais. A amônia é usada para produzir glutamina, que então é transferida para outros tecidos para ser usada como combustível, especialmente para células

do sistema imune e enterócitos (PIVA et al., 2001). Atua ainda como sinalizador ou regulador de demandas metabólicas, aumentando a síntese de proteína, diminuindo a degradação de proteína no músculo esquelético e estimulando a síntese de glicogênio no fígado (SMITH, 1990; HAUSSINGER et al., 1994).

Além de participar na estrutura de proteínas e peptídeos, a glutamina é precursora da gliconeogênese, da aminogênese renal e de neurotransmissores como o ácido α -aminobutírico e o glutamato. Além disso, é doadora de nitrogênio para síntese de purinas e pirimidinas, que são elementos básicos dos nucleotídeos, sendo essenciais para o reparo da mucosa intestinal (STRYER, 1992). Está envolvida na neurotransmissão, diferenciação celular, manutenção do pH e também é considerada como principal substrato energético de células de proliferação rápida, como por exemplo enterócitos e linfócitos ativos (CYNOBER, 1999), além de aumentar a resposta imunológica frente a adversidades (TAUDOU et al., 1983) e aliviar a toxemia (presença de toxinas de bactérias no sangue) (O'DWYER et al., 1987).

O trato gastrointestinal é o principal órgão de consumo e de utilização da glutamina. A capacidade da mucosa intestinal em metabolizar glutamina pode ser ainda mais importante durante estados de doenças catabólicas ou estresse, quando a depleção de glutamina pode ser mais grave e o consumo de ração pode estar interrompido por causa da gravidade da doença (SOUBA et al., 1990).

E entre os aminoácidos utilizados na alimentação in ovo, a glutamina pode exercer efeitos positivos (MAIORKA, 2002), pois apresenta relação positiva entre a síntese protéica, (JEPSON et al., 1988; WELBORNE, 1995), além de afinidade com o hormônio do crescimento (RAY et al., 2003), cuja síntese se inicia na fase embrionária da ave (HARVEY et al., 2001). Além disso, o saco da gema de um pinto recém-eclodido oriundo de uma ave jovem pode conter aproximadamente 150 mg de glutamina (VIEIRA & MORAN, 1998).

O efeito da glutamina sobre a reconstituição da mucosa intestinal tem sido investigado, devido ao fato desse aminoácido ser o principal metabólito que nutre os enterócitos (VASCONCELOS & TIRAPEGUI, 1998; PADOVESE, 2000; FISCHER DA SILVA, 2001) e, em altas concentrações, ser precursor para a formação dos ácidos nucléicos, permitindo resposta imediata para a proliferação das células sem entrar em outras rotas do metabolismo (SZONDY & NEWSHOLME, 1989).

Estudos demonstraram ainda que as células das criptas e das vilosidades sintetizam simultaneamente glutamina, sugerindo que esta pode não ter um papel estritamente metabólico no intestino (REEDS & BURRIN, 2001). A glutamina pode ainda apresentar função regulatória, uma vez que ativa uma série de genes associados com o ciclo de

progressão das células na mucosa; inibir a síntese deste aminoácido significa diminuir a proliferação e a diferenciação de células da mucosa (RHOADS et al., 1997; BLIKSLAGER et al., 1999; REEDS & BURRIN, 2001).

Chow e Zhang (1998) observaram que a suplementação de glutamina diminui a morte celular e sugeriram que este mecanismo é tão importante quanto o do estímulo da proliferação celular em condições de estresse para manter a estrutura e função intestinais.

2.6.PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

A soja é um alimento que apresenta composição química praticamente completa, fornecendo essencialmente proteínas, ácidos graxos saturados e insaturados e vitaminas, além compostos polifenólicos, como as isoflavonas (AVILA et al., 2007). Estas isoflavonas são compostos químicos pertencentes à classe dos fitoestrógenos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo a concentração destes compostos relativamente maiores em leguminosas e, em particular, na soja (SETCHELL & CASSIDY, 1998).

A proteína isolada de soja é a forma mais elaborada entre os derivados protéicos do grão de soja. Produzida a partir da farinha desengordurada de soja, esta fração protéica é separada dos demais componentes do grão por processos de precipitação, lavagem, neutralização e secagem. Após esse processamento, transforma-se em um produto de alto teor protéico (mais de 90% em base seca) e apresenta alta funcionalidade (poder de emulsificação e gelificação) (PREDIGER, 2009).

Esta proteína oriunda da soja é fonte de cálcio, fósforo e minerais, possuem baixo teor de gordura e contam com a vantagem adicional de ser de origem vegetal e não conter colesterol. Ela é utilizada como incremento funcional aos alimentos ou participa como principal nutriente de alimentos comerciais. Nesse caso, a indústria atua incorporando sabores e formações comerciais (MAGNONI, 2001).

O consumo da proteína de soja, devido sua riqueza em isoflavinas, pode apresentar diversos efeitos benéficos através de sua ação antioxidante, diminuindo radicais livres. Devido estas atribuições, a proteína de soja pode ser considerada um alimento funcional, pois possui a capacidade de afetar benéficamente uma ou mais funções específicas no metabolismo, além de possuir efeitos nutricionais relevantes e de aplicação biológica viável (CLAPAUCH et al., 2002).

2.7. CONTEÚDO ENERGÉTICO E SUA UTILIZAÇÃO PELO EMBRIÃO

Na fase inicial do desenvolvimento embrionário das aves, o acesso ao oxigênio é limitado à difusão simples, auxiliada por ação, ainda primitiva, de hemoglobina. E a energia gasta neste momento decorre, em grande parte, por glicólise através de glicose prontamente acessível, ou por um aumento transitório de lactato que ocorre até a corioalantóide se tornar funcional (CIROTTO & ARANGI, 1989).

E à medida que o corioalantóide inicia suas funções respiratórias (Figura 4), o acesso ao oxigênio, via os poros presentes na casca do ovo sustenta plenamente a oxidação de ácidos graxos da gema, utilizados como fonte primária de energia e como base para o desenvolvimento embrionário (BARBOSA, 2011).

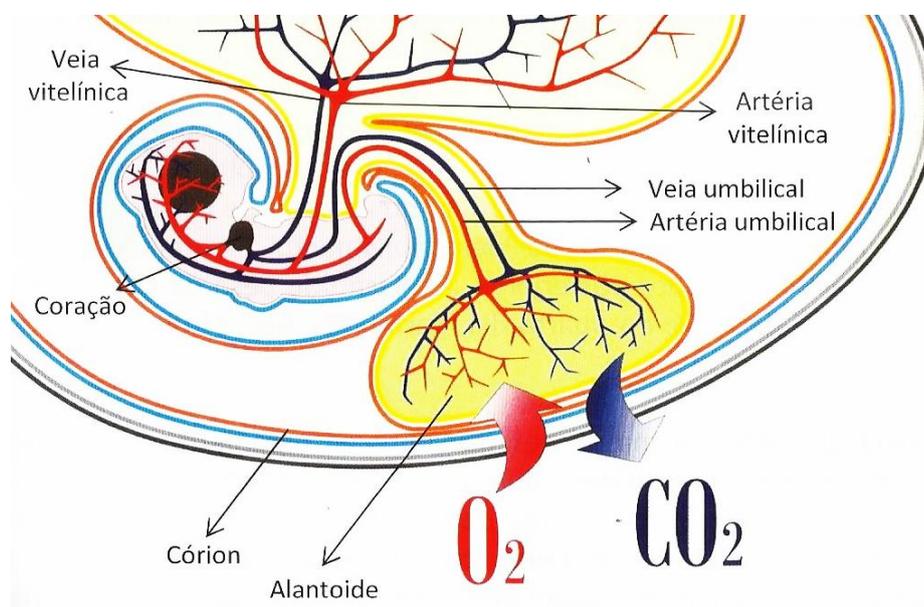


Figura 4. Representação esquematizando o fluxo de circulação cardiovascular e o metabolismo respiratório do embrião avícola (BARBOSA, 2011).

Neste contexto, o principal componente empregado na produção de energia são os triglicerídeos, correspondendo cerca de 67% dos lipídios da gema. Com a membrana vitelínica, uma estrutura vascularizada que reveste o vitelo externamente, assumindo papel de grande relevância no que diz respeito ao metabolismo lipídico, sendo responsável pela absorção de lipídios da gema e, posteriormente, transferência destes para o organismo do embrião (Figura 5) (NOBLE & COCCHI, 1990; SPEAK et al., 1998; SATO et al., 2006).

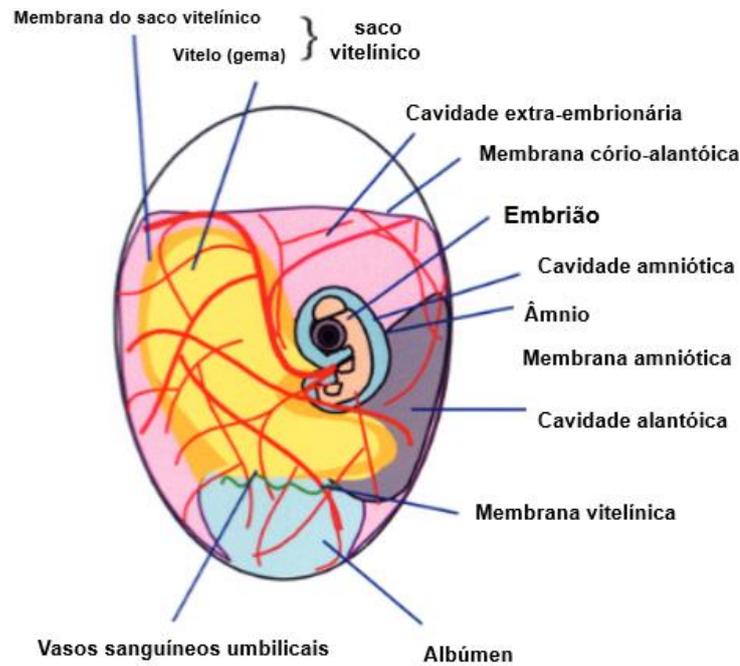


Figura 5. Representação esquematizando o embrião e suas estruturas anexas aos 7 dias de incubação. Adaptado de Ohta e Kidd, (2001).

Entre o 10° e 12° dia de incubação, a expansão do embrião dentro da cavidade amniótica associada ao aumento de seus movimentos, faz com que o albúmen, anteriormente compartimentalizado, na parte mais fina do ovo tenha ruptura na conexão seroamniótica (BARBOSA, 2011). Desta forma acontece um consumo oral desta mistura de albúmen e fluido amniótico, que é absorvida através do sistema gastrointestinal. Este consumo e absorção se tornam contínuos até que o fluido albúmen-amniótico desapareça e a bicagem interna se inicie (BARBOSA et al., 2011) (Figura 6).



Figura 6. Embrião aos 12 dias de incubação. Neste estágio, o corioalantóide envolve todo o conteúdo do ovo e ocorre plena embebição do líquido amniótico (BARBOSA, 2011).

Ainda nesta etapa, a ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucóide são proteínas de destaque evidenciadas no sangue e continuam a ser detectáveis após a eclosão. A ovomucóide, inclusive, é uma das proteínas do albúmen que tem grande quantidade de carboidratos. O embrião utiliza estes carboidratos com o objetivo de preservar os aminoácidos para a síntese proteica. Como resultado, a glicose no sangue aumenta progressivamente para dar suporte ao fígado e a deposição de glicogênio muscular (MORAN Jr., 2007).

Outrora, no momento que há a bicagem interna da casca, a estratégia metabólica do organismo é modificada. Nesta etapa, a demanda de oxigênio do embrião excede o suprimento disponível pela difusão através da casca do ovo, e o embrião até então utilizando os lipídios provenientes do saco vitelínico para manutenção do organismo, começa a metabolizar carboidratos através de mecanismos anaeróbicos até o momento da bicagem externa, fazendo com que os músculos mais ativos no momento da eclosão usem glicose proveniente das reservas de glicogênio (Figura 7) (FREEMAN, 1969; MENNA & MORTOLA, 2002).

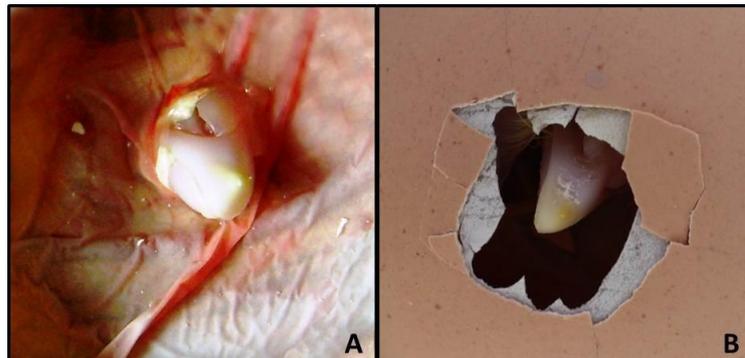


Figura 7. Embrião de galinha iniciando a bicagem interna da casca (A); e finalizando a bicagem externa (B) (BARBOSA, 2011).

Hoiby et al. (1987) afirmaram em seus estudos que o aumento transitório de lactato (produto da glicólise anaeróbia) que ocorre após a bicagem interna, desaparece quando a função pulmonar provê concentração de oxigênio adequada para o catabolismo de ácidos graxos continuar como fonte de energia. A demanda energética derivada do metabolismo lipídico da gema se eleva com o crescimento do embrião e reflete em concomitante acréscimo do consumo de oxigênio, sendo que este consumo diminui antes da bicagem interna e externa da casca e aumenta novamente após a eclosão (FREEMAN, 1969; MORAN Jr., 2007).

Morita et al. (2009) afirmaram ainda que a energia derivada do metabolismo anaeróbico durante os períodos anteriores à eclosão é necessária para sustentar tanto a

manutenção fisiológica do embrião quanto o seu crescimento. Entretanto, se esta energia é limitada, o embrião terá que escolher entre crescimento corporal e atividade vital de manutenção (BARBOSA et al., 2011).

A incorporação do saco vitelino na cavidade abdominal se inicia a partir dos 19 dias de incubação e a retração se completa antes que aconteça a eclosão (Figura 8). O pintainho permanece com esta reserva de saco vitelínico residual, suficiente para manter um suprimento adequado de nutrientes como fonte de energia, por pelo menos dois dias após o nascimento (NOY & SKLAN, 1998; SPEAKE et al., 1998; BARBOSA et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O estudo 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, Manaus, Amazonas, Brasil.



Figura 8. Foto aérea do Setor de Avicultura de FCA/UFAM. Arquivo pessoal de Kely Cristina Bastos Teixeira Ramos Brelaz.

Foram realizados dois experimentos para avaliação da bioeficácia da L-Glutamina para fins de inoculação in ovo, onde todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme os princípios éticos de experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo n. 016/2016) da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

3.2.PRIMEIRO EXPERIMENTO

3.2.1. MONTAGEM EXPERIMENTAL

No primeiro experimento, foram incubados 400 ovos, sendo utilizados 315 ovos férteis para inoculação. Estes ovos foram oriundos de matrizes da linhagem semipesada Rhode Island Red com 32 semanas de idade, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, onde os tratamentos (Tabela 1) foram constituídos por duas

soluções controle e cinco soluções experimentais contendo níveis crescentes de L-glutamina, com 45 repetições (ovos) por tratamento, sendo cada ovo considerado uma repetição. A L-glutamina utilizada foi fabricada pela Midway International Labs Ltda., sendo denominada como pura e micronizada.

Tabela 1. Disposição dos tratamentos no primeiro experimento.

Tratamentos	Soluções
Ovo íntegro	-
Inoculação Controle	0,5% de NaCl
Solução experimental 1	0,5% de NaCl + 2,5 mg de L-glutamina
Solução experimental 2	0,5% de NaCl + 5,0 mg de L-glutamina
Solução experimental 3	0,5% de NaCl + 7,5 mg de L-glutamina
Solução experimental 4	0,5% de NaCl + 10,0 mg de L-glutamina
Solução experimental 5	0,5% de NaCl + 12,5 mg de L-glutamina

Os ovos foram identificados, pesados e distribuídos em máquina incubadora modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 37,6 °C de temperatura e 66% de umidade relativa do ar, onde estas realizavam viragem dos ovos em intervalos de uma hora.

Aos 17 dias de incubação, os ovos foram submetidos à ovoscopia para seleção dos ovos férteis a serem utilizados. Estes foram higienizados e perfurados na região da câmara de ar (Figura 9) evitando-se perfurar a membrana interna da casca do ovo, sendo as soluções formuladas com diferentes concentrações de L-glutamina injetadas à 0,5 ml na região do fluido amniótico utilizando-se seringas com agulha 7 x 2,5 mm (Figura 10). Em seguida, o orifício da casca do ovo foi lacrado com parafina fundida (Figura 11).

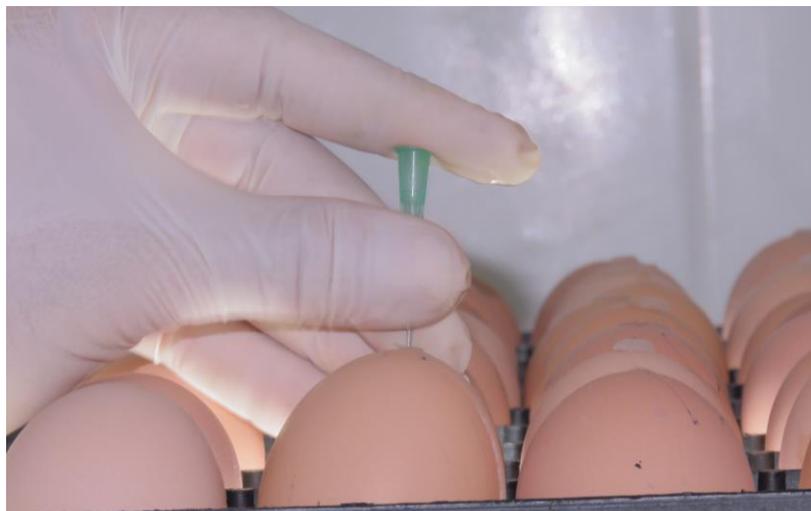


Figura 9. Perfuração da casca do ovo com agulhas de 7 x 2,5 mm para inoculação das soluções. Arquivo pessoal de João Paulo Ferreira Rufino.



Figura 10. Inoculação in ovo de soluções com níveis crescentes de L-glutamina. Arquivo pessoal de João Paulo Ferreira Rufino.



Figura 11. Ovos com os orifícios vedados por parafina fundida. Arquivo pessoal de João Paulo Ferreira Rufino.

Os ovos foram transferidos para máquina de eclosão modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 36,6 °C de temperatura, e 76% de umidade relativa do ar, onde permaneceram até a retirada dos pintos aos 21 dias de incubação (504±02 horas).

3.2.2. VARIÁVEIS ANALISADAS

No primeiro experimento foram avaliados os rendimentos de incubação, a relação pinto/ovo, o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos diretamente relacionados e regiões) e os parâmetros bioquímicos séricos dos pintos ao nascer.

Os rendimentos de incubação foram: eclodibilidade (n° de pintos nascidos/ n° de ovos férteis $\times 100$), 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) e 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).



Figura 12. Análise de mortalidade embrionária (embriodiagnóstico). Em sequência: a) mortalidade intermediária, b) mortalidade tardia, e c) mortalidade pós-bicagem. Arquivo pessoal de João Paulo Ferreira Rufino.

As variáveis da relação pinto/ovo foram: peso do ovo (g), perda de peso do ovo (%), peso do pinto (g) e correlação pinto/ovo (peso do pinto/peso do ovo).

Com base nos resultados de eclodibilidade, foram selecionados cinco pintos aptos de cada tratamento (onde houve nascimento) para coleta de sangue individual. O sangue foi coletado diretamente do coração e as amostras imediatamente submetidas a um analisador bioquímico portátil (Accucheck Trend, ROCHE©) com o auxílio de tiras reagentes específicas (ROCHE©). Os parâmetros avaliados foram: glicose (mg/dl), triglicerídeos (mg/dl), colesterol (mg/dl), lactato (mg/dl) e pH sanguíneo.

Os mesmos pintos foram em seguida abatidos por 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).

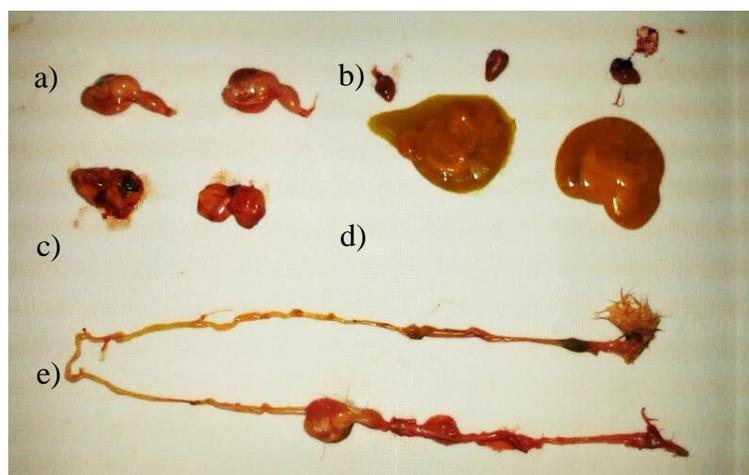


Figura 13. Análise do trato gastrointestinal. a) Pró-ventrículo + moela; b) Coração; c) Fígado; d) Saco vitelino; e) Trato gastrointestinal completo. Arquivo pessoal de João Paulo Ferreira Rufino.

3.3.SEGUNDO EXPERIMENTO

3.3.1. MONTAGEM EXPERIMENTAL

No segundo experimento, foram utilizados 300 ovos férteis oriundos de matrizes da linhagem semipesada Rhode Island Red com 42 semanas de idade, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, onde os tratamentos (Tabela 2) foram constituídos por duas soluções controle e três soluções experimentais contendo L-glutamina e L-glutamina + Proteína Isolada de Soja (PIS), com 60 repetições (ovos) por tratamento, sendo cada ovo considerado uma repetição.

Tabela 2. Disposição dos tratamentos no segundo experimento.

Tratamentos	Soluções
Ovo íntegro	-
Inoculação Controle	0,5% de NaCl
Solução experimental 1	0,5% de NaCl + 2,5 mg de L-glutamina
Solução experimental 2	0,5% de NaCl + 2,5 mg de L-glutamina + 5,0 mg de PIS
Solução experimental 3	0,5% de NaCl + 2,5 mg de L-glutamina + 10,0 mg de PIS

Os ovos foram identificados, pesados e distribuídos em máquina incubadora modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 37,6 °C de temperatura e 66% de umidade relativa do ar, onde estas realizavam viragem dos ovos em intervalos de uma hora.

Aos 17 dias de incubação, os ovos foram submetidos à ovoscopia para seleção dos ovos férteis utilizados. Estes foram higienizados e perfurados na região da câmara de ar evitando-se perfurar a membrana interna da casca do ovo, sendo as soluções formuladas com diferentes concentrações de L-glutamina injetadas à 0,5 ml na região do fluido amniótico utilizando-se seringas com agulha 7 x 2,5 mm. Em seguida, o orifício da casca do ovo foi lacrado com parafina fundida.

Após esta etapa, os ovos foram transferidos para máquina de eclosão modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 36,6 °C de temperatura, e 76% de umidade relativa do ar, onde permaneceram até a retirada dos pintos aos 21 dias de incubação (504±02 horas).

3.3.2. VARIÁVEIS ANALISADAS

No segundo experimento foram avaliados os rendimentos de incubação, a relação pinto/ovo e o comprimento dos compartimentos do trato gastrointestinal.

Os rendimentos de incubação foram: 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) e 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).

As variáveis da relação pinto/ovo foram: peso do ovo (g), perda de peso do ovo (%), peso do pinto (g) e correlação pinto/ovo (peso do pinto/peso do ovo).

Com base nos resultados de eclodibilidade, foram selecionados cinco pintos aptos de cada tratamento (onde houve nascimento), sendo estes abatidos por meio 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).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa computacional SAS (2008), onde os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as estimativas dos tratamentos do Experimento 1 foram analisados por regressão polinomial à 0,01 e 0,05 de significância, enquanto as médias dos tratamentos do Experimento 2 foram avaliadas pelo teste de Tukey a 0,01 e 0,05 de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PRIMEIRO EXPERIMENTO

4.1.1. RESULTADOS

Diferenças ($p < 0,05$) foram observadas nos resultados de eclodibilidade ($y = 106,60 + 1,566x - 2,0631x^2$; $R^2 = 0,86$) e na mortalidade embrionária intermediária ($y = 33,717 + 17,267x$; $R^2 = 0,86$), com uma gradual redução da eclodibilidade a partir da inoculação crescente de L-glutamina, e conseqüentemente, aumento na mortalidade embrionária, principalmente intermediária (horas após os procedimentos de inoculação) (Tabela 3).

Outrora, embriões oriundos de ovos inoculados (Inoculação controle e inoculação de 0,5% de L-glutamina) apresentaram melhores resultados de eclodibilidade em relação ao grupo controle (ovo íntegro/sem inoculação), com baixa ($p < 0,05$) mortalidade tardia ($y = 1,5343 + 1,9496x$; $R^2 = 0,70$) e melhor ($p < 0,05$) correlação pinto-ovo ($y = 0,6929 + 0,0055x - 0,0038x^2$; $R^2 = 0,79$).

Tabela 3. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.

Tratamentos	Eclodibilidade (%)	Mortalidade intermediária (%)	Mortalidade tardia (%)	Ovos bicados (%)	Peso do pinto (g)	Correlação pinto/ovo
Ovo íntegro	93,28	0,00	4,45	2,27	32,11	0,59
Inoculação controle	100,00	0,00	0,00	0,00	33,35	0,62
0,5 NaCl + 0,5 Glut.	97,82	2,18	0,00	0,00	33,07	0,66
0,5 NaCl + 1,0 Glut.	79,94	13,44	6,62	0,00	32,70	0,62
0,5 NaCl + 1,5 Glut.	19,86	69,22	9,80	1,12	31,88	0,62
0,5 NaCl + 2,0 Glut.	15,98	71,42	10,80	1,80	33,46	0,61
0,5 NaCl + 2,5 Glut.	6,62	81,20	12,18	0,00	33,60	0,61
p-valor	0,01	0,01	0,01	0,57	0,70	0,01
Efeito	Q	LP	LP	ns	ns	Q
CV (%)	7,02	11,68	14,75	16,64	5,77	5,95

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. LP - Linear Positivo. ns - não significativo.

A partir destes resultados, foi possível ainda determinar o ponto de limite fisiológico do embrião conforme a adição crescente de L-glutamina nas soluções inoculadas (Figura 14).

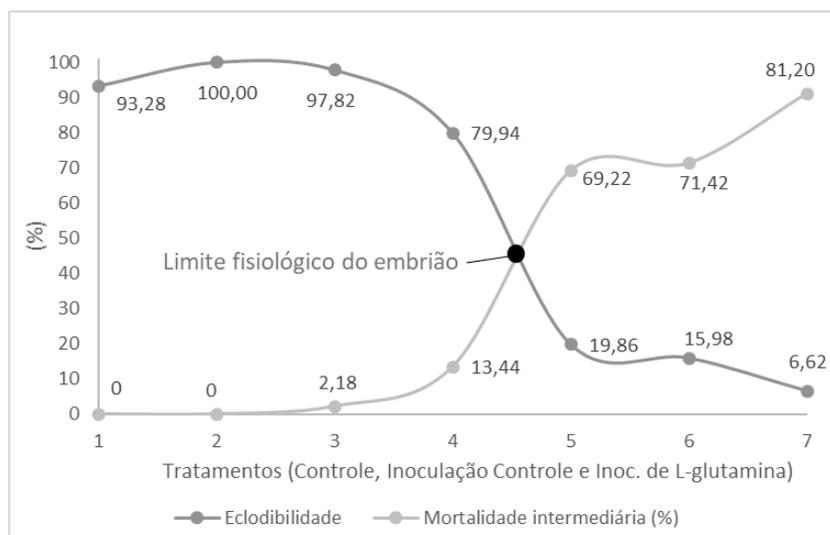


Figura 14. Comportamento da inoculação de L-glutamina sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária intermediária. Todos os dados representam à média por tratamento. O encontro das curvas entre 1,0 e 1,5% de inoculação de L-glutamina determina o ponto de limite fisiológico do embrião.

O saco vitelino ($y = 7,235 + 0,5113x - 0,3616x^2$; $R^2 = 0,85$) apresentou-se mais pesado ($p < 0,05$) após a inoculação (controle e com L-glutamina), principalmente em embriões submetidos a soluções com 1,0% de L-glutamina. Todos os embriões submetidos a inoculação com L-glutamina também apresentaram melhor ($p < 0,05$) desenvolvimento do coração ($y = 0,2487 + 0,0209x$; $R^2 = 0,89$) em comparação aos grupos controle (Tabela 4).

Tabela 4. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos).

Tratamentos	Saco vitelínico (g)	Coração (g)	Fígado (g)	Pâncreas (g)	Pró-ventrículo (g)	Moela (g)
Ovo íntegro	4,10	0,25	0,73	0,03	0,32	1,84
Inoculação controle	4,99	0,31	0,77	0,01	0,30	1,76
0,5 NaCl + 0,5 Glut.	7,16	0,32	0,76	0,02	0,28	1,83
0,5 NaCl + 1,0 Glut.	5,33	0,33	0,71	0,01	0,26	1,60
0,5 NaCl + 1,5 Glut.	3,85	0,35	0,97	0,01	0,32	1,93
0,5 NaCl + 2,0 Glut.	3,61	0,37	0,90	0,03	0,31	1,67
p-valor	0,05	0,05	0,29	0,23	0,77	0,76
Efeito	Q	PL	ns	ns	ns	ns
CV (%)	18,45	18,80	14,59	13,26	15,06	11,62

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. LP - Linear Positivo. ns - não significativo.

Não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) da inoculação sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal. Todavia, houve um aumento métrico em vários

órgãos e compartimentos do trato gastrointestinal de embriões submetidos a alimentação in ovo (Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente).

Tabela 5. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (regiões).

Tratamentos	Trato Gastrointestinal (cm)	Orofaringe + esôfago (cm)	Alça duodenal (cm)	Jejuno + íleo (cm)	Cecos (cm)	Cólon + reto (cm)
Ovo íntegro	47,00	6,80	7,00	22,52	6,96	5,28
Inoculação controle	47,40	6,80	7,20	27,90	7,38	3,96
0,5 NaCl + 0,5 Glut.	42,30	6,40	6,42	17,84	6,40	3,78
0,5 NaCl + 1,0 Glut.	43,40	6,10	6,00	25,20	6,20	5,14
0,5 NaCl + 1,5 Glut.	43,10	5,80	5,60	22,60	6,28	4,14
0,5 NaCl + 2,0 Glut.	44,80	6,30	6,50	23,50	7,66	4,92
p-valor	0,61	0,35	0,29	0,07	0,29	0,11
Efeito	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	12,53	19,84	18,18	11,07	17,72	17,58

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. ns – não significativo.

Os pintos oriundos de embriões suplementados com L-glutamina in ovo apresentaram maior ($p < 0,05$) pH sanguíneo ($y = 7,159 + 0,02987x - 0,0202x^2$; $R^2 = 0,83$), sendo que todos estes apresentaram menor ($p < 0,05$) concentração de triglicerídeos ($y = 283,63 - 18,371x$; $R^2 = 0,82$), e diferenças significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de glicose ($y = 225,80 + 3,846x - 3,125x^2$; $R^2 = 0,83$) e colesterol ($y = 173,05 + 7,898x - 2,4732x^2$; $R^2 = 0,85$).

Em resumo, a partir da inoculação in ovo de L-glutamina houve aumento do pH sanguíneo e redução dos demais parâmetros (Tabela 6), além de ter influenciado o desenvolvimento embrionário, principalmente órgãos vitais como coração, fígado e pâncreas.

Tabela 6. Efeitos da inoculação de L-glutamina sobre os parâmetros bioquímicos séricos.

Tratamentos	Glicose (mg/dl)	Triglicerídeos (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Ph
Ovo íntegro	194,50	292,00	163,50	6,91
Inoculação controle	185,50	242,50	169,00	6,94
0,5 NaCl + 0,5 Glut.	221,00	199,50	178,00	7,12
0,5 NaCl + 1,0 Glut.	209,50	194,50	178,00	7,08
0,5 NaCl + 1,5 Glut.	197,50	194,00	163,00	6,99
0,5 NaCl + 2,0 Glut.	191,50	193,50	160,00	7,01
p-valor	0,05	0,01	0,01	0,01
Efeito	Q	LN	Q	Q
CV (%)	8,34	8,40	2,04	0,47

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. LP – Linear Negativo.

4.1.2. DISCUSSÃO

O uso da alimentação in ovo neste experimento (administração de nutrientes exógenos no âmnio) incrementou a eclodibilidade (inoculação controle e inoculação de 0,5% de L-glutamina) e o desenvolvimento gastrointestinal a partir do aumento da concentração de nutrientes disponíveis para o embrião.

Com base em estudos preliminares utilizando aminoácidos para à mesma finalidade, a formulação de soluções visando a alimentação in ovo foi desenvolvida justamente com o objetivo de aumentar a concentração de nutrientes disponíveis ao embrião, e consequentemente, desenvolvimento dos pintinhos ao nascer (FOYE et al., 2007).

A alimentação in ovo, que essencialmente é uma tecnologia que visa a alimentação do embrião aviário, pode resolver restrições de crescimento impostas pela função intestinal limitada do neonato a partir do consumo oral de moduladores entéricos (compostos que estimulam o desenvolvimento e o metabolismo das células do sistema digestivo) no líquido amniótico do embrião, o que pode aumentar a capacidade intestinal de digerir e absorver nutrientes dietéticos durante o desenvolvimento embrionário tardio (UNI & FERKET, 2003; TAKO et al., 2004; FOYE et al., 2007).

E, dependendo do perfil dos nutrientes exógenos fornecidos ao embrião, pode haver diferentes respostas dos embriões refletida neste desenvolvimento pós-inoculação. Além disso, vários estudos desenvolvidos com o uso de carboidratos na alimentação in ovo, observou-se que estes podem estimular o desenvolvimento intestinal e sua maturidade funcional, atuando como ferramenta para superar as referidas restrições de crescimento impostas pela capacidade digestiva limitada nos embriões, aumentando a função intestinal e a maturação antes da eclosão (TAKO et al., 2004; FOYE et al., 2006; LEITÃO et al., 2010; LEITÃO et al., 2014).

Neste sentido, é possível afirmar que o uso de aminoácidos na alimentação in ovo pode estimular o desenvolvimento estrutural dos pintainhos, produzindo indivíduos mais pesados e com maior desenvolvimento do trato gastrointestinal, principalmente na área intestinal visando o aumento da área para absorção de nutrientes. Assim, o pintainho oriundo de embrião submetido a alimentação in ovo pode apresentar uma maior capacidade de digerir e absorver nutrientes de uma fonte exógena em relação ao controle (TAKO et al., 2004).

Por meio de sua rota metabólica natural, estes aminoácidos podem ter sido absorvidos pelos músculos, devido à ação da insulina, e incorporados à proteína muscular (FOYE et al., 2006). Estudos demonstraram que os aminoácidos são mediadores de sinalização importantes nas β -células pancreáticas secretoras de insulina in vitro e na liberação de fatores de

crescimento semelhantes a insulina *in vivo* (XU et al., 1998), e que as reservas de aminoácidos no saco vitelino são insuficientes para atender os requerimentos para o processo de crescimento do embrião aviário, principalmente no período final de desenvolvimento embrionário e nas primeiras 72 horas pós-eclosão (OHTA et al., 2004).

Verificou-se ainda efeitos positivos a partir da utilização de glutamina na alimentação *in ovo*, podendo esta apresentar uma sutil relação entre a síntese protéica e a concentração de aminoácidos (JEPSON et al., 1988; WELBORNE, 1995; MAIORKA et al., 2000; SILVA et al., 2007) e afinidade com os hormônios de crescimento (RAY et al., 2003) que iniciam a síntese no estágio embrionário (HARVEY et al., 2001). Vieira e Moran (1998) afirmaram ainda que o saco vitelino contém aproximadamente 150 mg de glutamina. Porém, quando pensando em um desenvolvimento acima da média esperada, como em linhagens de maior grau de melhoramento genético, este montante pode não ser suficiente para o atendimento dos requisitos do embrião visando este desenvolvimento.

Os resultados obtidos neste experimento indicam ainda que a L-glutamina na alimentação *in ovo* pode atuar como um regulador do metabolismo sérico, devido ao desenvolvimento significativo do coração e alterações sutis nos parâmetros bioquímicos séricos. Nesta perspectiva, alguns estudos afirmaram que a atividade dos aminoácidos intestinais (KARASOV et al., 1987; TORRAS-LLORT et al., 1998) e dos transportadores de glicose (DIAMOND & KARASOV, 1987; KARASOV et al., 1987; SOLBERG & DIAMOND, 1987; BUDDINGTON & DIAMOND, 1989; FERRARIS & DIAMOND, 1989; FERRARIS et al., 1992) são regulados pela presença de concentrações crescentes de seus precursores específicos ou substrato(s).

Outra importante questão relacionada a alimentação *in ovo* é o chamado limite fisiológico do embrião, que corresponde ao encontro das curvas gráficas de eclodibilidade e de mortalidade embrionária intermediária. Este ponto representa o limite do organismo do embrião em aceitar o nutriente, substância ou solução exógena, devido, principalmente, ao choque entre as osmolaridades (organismo x material exógeno).

Uni e Ferket (2003) afirmam ainda que as soluções em altas concentrações de nutrientes exógenos podem afetar o equilíbrio osmótico do ovo e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário, sugerindo que a eclodibilidade inferior e a alta mortalidade intermediária em ovos inoculados com níveis elevados de aminoácidos, como foi verificado nos resultados obtidos neste experimento, pode ser causada por estas alterações no equilíbrio osmótico.

4.2.SEGUNDO EXPERIMENTO

4.2.1. RESULTADOS

No segundo experimento, diferenças significativas ($p < 0.01$) foram observadas nos resultados de eclodibilidade e mortalidade embrionária em período intermediário, com significativa queda nos índices de eclodibilidade a partir da inoculação de L-glutamina + PIS concomitante aumento na mortalidade embrionária, principalmente intermediária (horas após os procedimentos de inoculação) (Tabela 7).

Entretanto, embriões oriundos de ovos inoculados (inoculação controle e Solução 1 (inoculação de 0,5% de L-glutamina)) apresentaram melhores resultados de eclodibilidade em relação ao grupo controle (ovo íntegro/sem inoculação), com baixa ($p < 0,05$) mortalidade tardia e melhor ($p < 0,05$) correlação pinto-ovo.

É importante destacar que o comportamento dos resultados obtidos neste experimento assemelha-se em diversos pontos aos resultados obtidos no experimento anterior, modificando-se a partir da inclusão de PIS nas soluções.

Tabela 7. Efeitos da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.

Tratamentos	Eclodibilidade (%)	Mortalidade intermediária (%)	Mortalidade tardia (%)	Ovos bicados (%)	Peso do pinto (g)	Correlação pinto/ovo
Ovo íntegro	81,66 ^b	11,66 ^b	3,35 ^b	3,33	33,13 ^b	0,61 ^b
Inoculação controle	88,33 ^{ab}	8,33 ^{ab}	1,66 ^{ab}	1,68	34,37 ^{ab}	0,64 ^{ab}
Solução 1	95,00 ^a	4,00 ^a	0,00 ^a	1,00	35,47 ^a	0,65 ^a
Solução 2	76,66 ^b	11,67 ^b	6,67 ^c	5,00	32,63 ^{bc}	0,60 ^{bc}
Solução 3	61,66 ^c	30,00 ^c	6,68 ^c	1,66	31,49 ^c	0,58 ^c
p-valor	0,01	0,01	0,04	0,57	0,01	0,01
Efeito	*	*	**	ns	*	*
CV (%)	3,70	12,35	14,75	18,29	3,87	3,84

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. * Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem à 1% pelo teste de Tukey ($p < 0,01$); ** Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem à 5% pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ns – não significativo.

Assim como no experimento anterior, a partir dos resultados obtidos, foi possível determinar o ponto de limite fisiológico do embrião conforme a adição de L-glutamina e L-glutamina + PIS nas soluções inoculadas (Figura 15).

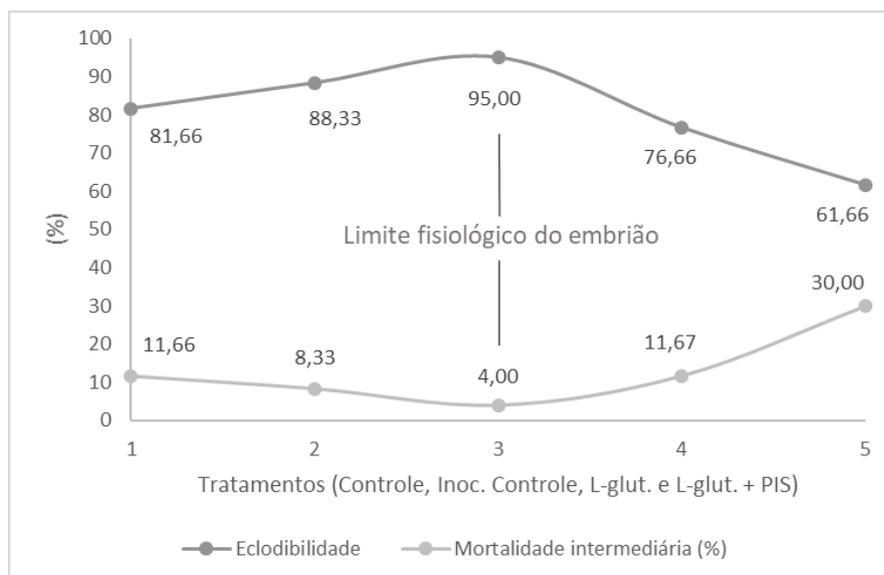


Figura 15. Comportamento da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária intermediária. Todos os dados representam o valor médio por tratamento. A maior distância entre as curvas determina o ponto de limite fisiológico do embrião.

O saco vitelino apresentou-se maior ($p < 0,01$) após a inoculação (controle, L-glutamina e L-glutamina + PIS) em embriões alimentados in ovo com 0,5% de L-glutamina e 0,5% de L-glutamina + 1,0% PIS. Vale ressaltar que todos os embriões submetidos a inoculação apresentaram coração e pâncreas mais desenvolvidos ($p < 0,05$) em comparação aos grupos controle (Tabela 8).

Tabela 8. Efeitos da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos).

Tratamentos	Saco vitelínico (g)	Coração (g)	Fígado (g)	Pâncreas (g)	Pró-ventrículo (g)	Moela (g)
Ovo íntegro	4,45 ^b	0,28 ^b	0,89	0,02 ^b	0,37	2,36
Inoculação controle	4,78 ^b	0,29 ^{ab}	0,91	0,03 ^{ab}	0,38	1,93
Solução 1	6,03 ^a	0,30 ^a	0,90	0,04 ^a	0,32	2,24
Solução 2	5,05 ^{ab}	0,290 ^{ab}	1,02	0,03 ^{ab}	0,33	1,89
Solução 3	3,14 ^c	0,26 ^c	0,90	0,02 ^b	0,32	2,02
p-valor	0,04	0,03	0,78	0,02	0,39	0,10
Efeito	*	**	ns	**	ns	ns
CV (%)	19,05	13,97	18,11	14,76	18,12	14,65

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. * Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem à 1% pelo teste de Tukey ($p < 0,01$); ** Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem à 5% pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ns – não significativo.

Já o desenvolvimento gastrointestinal dos embriões foi maior ($p < 0,05$) após a inoculação das substâncias (controle, L-glutamina e L-glutamina + PIS), principalmente nos embriões alimentados in ovo com soluções contendo 0,5% de L-glutamina e 0,5% de L-glutamina + 1,0% de PIS. Estes embriões apresentaram maior desenvolvimento de orofaringe + esôfago ($p < 0,05$), alça duodenal ($p < 0,01$) e cólon + reto ($p < 0,05$) em comparação aos grupos controle (Tabela 9).

Nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) dos tratamentos com inoculação foi observado nas demais regiões do trato gastrointestinal. No entanto, observou-se aumento numérico de vários órgãos e compartimentos do trato gastrointestinal dos embriões alimentados in ovo (Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 9. Efeitos da inoculação de L-glutamina e L-glutamina + PIS sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal (regiões).

Tratamentos	Trato Gastrointestinal (cm)	Orofaringe + esôfago (cm)	Alça duodenal (cm)	Jejuno + íleo (cm)	Cecos (cm)	Cólon + reto (cm)
Ovo íntegro	43,20 ^{bc}	6,80 ^b	6,30 ^b	26,60	7,40	4,00 ^a
Inoculação controle	47,60 ^{ab}	7,20 ^{ab}	6,70 ^{ab}	32,30	7,70	3,60 ^{ab}
Solução 1	47,70 ^a	7,40 ^a	7,50 ^a	28,00	7,80	2,90 ^b
Solução 2	43,60 ^b	6,60 ^b	6,10 ^{bc}	26,50	7,10	2,70 ^b
Solução 3	42,80 ^c	6,10 ^{bc}	5,90 ^c	24,60	7,20	2,64 ^b
p-valor	0,05	0,05	0,01	0,09	0,24	0,05
Efeito	**	**	*	ns	ns	**
CV (%)	8,54	9,62	15,00	15,57	10,32	11,72

CV - Coeficiente de variação. p-valor - Coeficiente de probabilidade. * Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem à 1% pelo teste de Tukey ($p < 0,01$); ** Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem à 5% pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ns – não significativo.

4.2.2. DISCUSSÃO

Neste experimento, a alimentação in ovo também proporcionou incrementos na eclodibilidade (inoculação controle e 0,5% de L-glutamina) e no desenvolvimento gastrointestinal a partir da maior disponibilização de nutrientes ao embrião.

Neste contexto, outros autores que também desenvolveram trabalhos utilizando aminoácidos e proteínas em soluções visando a alimentação in ovo, afirmaram que estas são desenvolvidas com o objetivo primário de aumentar a concentração de nutrientes disponíveis ao embrião, atendendo ao verdadeiro requerimento nutricional destes no período embrionário, possibilitando maior desenvolvimento corporal, principalmente do trato gastrointestinal (PEDROSO et al., 2006; FOYE et al., 2007; DAMASCENO et al., 2017) .

Damasceno et al. (2017), entretando, afirmaram em seu estudo que, a partir da inoculação de níveis elevados destas substâncias, pode haver uma redução gradual da eclosão e, posteriormente, o aumento da mortalidade embrionária, principalmente no período intermediário (pouco após a inoculação).

De acordo com Ohta e Kidd (2001), e Jochemsen e Jeurissen (2002), diversos fatores podem ser responsáveis por altas taxas de mortalidade embrionária após o aumento gradual da concentração de nutrientes nas soluções para alimentação in ovo, tais como idade, peso e tempo de armazenamento de ovos, lugar do ovo para inoculação, idade das matrizes dentre outros. E, dependendo do perfil dos nutrientes exógenos fornecidos ao embrião, pode haver diferentes respostas fisiológicas destes após a inoculação.

A partir dos resultados de estudos desenvolvidos com alimentação in ovo, principalmente carboidratos, observou-se que esta biotecnologia pode acelerar o desenvolvimento intestinal e a maturidade funcional desta região, superando as restrições de crescimento impostas pela capacidade digestiva limitada dos embriões nas fases finais do desenvolvimento embrionário (TAKO et al., 2004; FOYE et al., 2006; LEITÃO et al., 2010; LEITÃO et al., 2014).

E conforme foi constatado nos resultados obtidos neste experimento, o uso de aminoácidos e proteínas isoladas para fins de inoculação comprovadamente pode estimular o desenvolvimento estrutural, obtendo-se pintos mais pesados e com maior desenvolvimento das regiões do trato gastrointestinal, principalmente na área de vilosidades e criptas (jejuno e íleo) para aumentar a área de absorção de nutrientes.

Assim, o pintainho submetido a alimentado in ovo pode apresentar uma maior capacidade de digerir e absorver nutrientes de uma fonte exógena em relação a pintos oriundos de ovos não inoculados (TAKO et al., 2004; CAMPOS et al., 2010; DAMASCENO et al., 2017). E os aminoácidos destinados a esta finalidade podem apresentar efeitos positivos, mostrando uma relação entre a síntese protéica, a concentração de aminoácidos e a produção de hormônios do crescimento (JEPSON et al., 1988; WELBORNE, 1995; MAIORKA et al., 2000; RAY et al., 2003; SILVA et al., 2007).

Neste estudo, especificamente, observou-se que a inoculação de L-glutamina (0,5%) sozinha e consorciada com PIS (1,0%) pode atuar como um modulador entérico que melhora a absorção intestinal devido ao desenvolvimento significativo dos órgãos e regiões do trato gastrointestinal. Outros estudos confirmam esta relação entre a atividade de absorção de aminoácidos na região intestinal (KARASOV et al., 1987; TORRAS-LLORT et al., 1998)

com o estímulo ao desenvolvimento das regiões do trato gastrointestinal (DIAMOND & KARASOV, 1987; BUDDINGTON & DIAMOND, 1989; FERRARIS et al., 1992).

Além disso, outra questão interessante a ser levada em consideração é o denominado limite fisiológico do embrião, que corresponde ao encontro de curvas gráficas de incubabilidade e mortalidade intermediária embrionária. Este ponto representa o limite do organismo embrionário na aceitação do nutriente, substância ou solução exógena, devido principalmente ao choque entre as suas osmolaridades.

No entanto, os resultados obtidos neste experimento demonstram que o encontro entre as curvas não precisa ser necessariamente uma interseção. A simples mudança paralela de comportamento destas a partir de um determinado ponto pode determinar este limite máximo da relação entre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária intermediária, conforme foi verificado na figura 17, onde a partir da solução 3, o comportamento de ambas as curvas, paralelamente, seguiu um comportamento oposto (curvas que antes estavam em crescente, decresceram, e vice-versa).

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicaram que até 0,5% de L-glutamina pode ser utilizada para fins de alimentação in ovo em embriões avícolas, proporcionado melhor eclodibilidade maior peso do pintinho ao nascer, maior desenvolvimento do trato gastrointestinal e atuando como regulador do metabolismo bioquímico sérico.

Quando consorciada com a L-glutamina, a Proteína Isolada de Soja (1,0%) não afetou ou melhorou os resultados de eclodibilidade, mortalidade embrionária intermediária ou desenvolvimento do trato gastrointestinal.

A partir da utilização de níveis elevados de L-glutamina e Proteína Isolada de Soja para fins de alimentação in ovo, houve redução abrupta da eclodibilidade e demais índices avaliados.

6. REFERÊNCIAS

1. ABED, F.; KARIMI, A.; SADEGHI, G.; SHIVAZAD, M.; DASHTI, S.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A. Do broiler chicks possess enough growth potential to compensate long-term feed and water deprivation during the neonatal period?. **South African Journal of Animal Science**, v. 41, p. 33-39, 2011.
2. AKIBA, Y.; MURAKAMI, H. **Partitioning of energy and protein during early growth of broiler chicks and contribution of vitelline residue**. In: Proceedings of the World Poultry Science Conference; Antalya, Turkey, p. 42-52, 1995.
3. AL-MURRANI, W.K. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 23, n. 2, p. 171-174, 1982.
4. ÁVILA, M.R.; LUCCA E BRACCINI, A.; SCAPIM, C.A.; MANDARINO, J.M.G.; ALBRECHT, L.P.; VIDIGAL FILHO, P.S. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n.3, 111-127, 2007.
5. BARBOSA, V.M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2011. 124p.
6. BERTECHINI, A.G. Metabolismo de proteínas. In: **Nutrição de monogástricos**. 1ª Edição. Lavras: UFLA, 101-127, 2006.
7. BLIKSLAGER, A.T; RHOADS, J.M.; BRISTOL, D.G.; ROBERTS, M.C.; ARGENZIO, R.A. Glutamine and transforming growth factor-alpha stimulate extracellular regulated protein kinase and enhance recovery of villous surface area in porcine ischemic-injured intestine. **Surgery**, v. 125, p. 186-194, 1999.
8. BUDDINGTON, R.K.; DIAMOND, J.M. Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 601-619, 1989.
9. BURNHAM, M.R.; PEEBLES, E.D.; GARDNER, C.W.; BRAKE, J.; BRUZUAL, J.J.; GERARD, P.D. Effects of incubator humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p. 1444-1450, 2001.
10. CALIL, T.A.C. **Princípios básicos de incubação**. In: CONFERÊNCIA APINCO 2007, SIMPÓSIO SOBRE INCUBAÇÃO, Anais, Santos, São Paulo, Brasil, 2007.
11. CAMPOS, J.E. **Avicultura razões, fatos e divergências - Incubação Industrial**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, p. 203-303, 2000.

12. CAMPOS, A.M.A.; GOMES, P.C.; ROSTAGNO, H.S. Nutrição *in ovo* de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 7, n. 4, p. 1304-1313, 2010.
13. CAMPOS, A.M.A.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; SILVA, E.A.; ALBINO, L.F.T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito de inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1712-1717, 2011.
14. CHOW, A.; ZHANG, R. Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 8, p. 1296-1301, 1998.
15. CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R.M.R.; JULIÃO, M.A.S.G.; LOUREIRO, C.K.C.; GIARODOLI, P.B.; PINHEIRO, S.A.; HARRIGAN, A.R.; SPRITZER, P.M.; PARDINI, D.P.; WEISS, R.V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L.A.; PÓVOA, L.C. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.
16. CIROTTO, C.; ARANGI, I. How do avian embryos breath? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94, n., p. 607-613, 1989.
17. CYNOBER, L.A. **Glutamine metabolism in stressed patients**. In: International Congress on Amino Acids, Germany, Anais... 1999.
18. DAMASCENO, J.L.; CRUZ, F.G.G.; MELO, R.D.; FEIJO, J.C.; RUFINO, J.P.F.; VALENTIM, F.M.; OLIVEIRA, J.P.C. Inoculação de proteína isolada de soja em ovos embrionados oriundos de matrizes semipesadas com diferentes idades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1259-1266, 2017.
19. DARMAUN, D.; HUMBERT, B. Does the fate of enterally administered glutamine depend on its molecular form? Bound versus free amino acid. **Nutrition**, v. 16, n. 11-12, p. 1101-1102, 2000.
20. DIAMOND, J.M.; KARASOV, W.H. Adaptive regulation of intestinal nutrient transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 84, n. 8, p. 2242-2245, 1987.
21. DROR, Y.; NIR, I.; NITSAN, Z. The relative growth of internal organs in light and heavy breeds. **British Poultry Science**, v. 18, p. 493-496, 1977.
22. FERRARIS, R.P.; DIAMOND, J.M. Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 125-141, 1989.

23. FERRARIS, R.P.; VILLENAS, S.A.; HIRAYAMA, B.A.; DIAMOND, J.M. Effect of diet on glucose transporter site density along the intestinal crypt-villus axis. **American Journal of Physiology**, v. 262, n. 6, p. 1060-1068, 1992.
24. FERKET, P, DE OLIVEIRA, J., GHANE, A., UNI, Z. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 118, 2005.
25. FERKET, P., UNI, Z. Early feeding – in ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: 12th Conference European Poultry; Verona, Italy, 2006.
26. FISCHER DA SILVA, A.V. **Efeitos da restrição alimentar precoce e da glutamina no desempenho e na mucosa intestinal em frangos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2001. 77p.
27. FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-1192, 2006.
28. FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P.R. The effects of in ovo feeding arginine, β -hydroxy- β -methyl-butyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 86, n. 12, p. 2343–2349, 2007.
29. FREEMAN, B. M. The mobilization of hepatic pycogen in *Gallus domesticus* at the end of incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 28, n. 3, p. 1169-1176, 1969.
30. GERACILDA, L.; FERREIRA, V.P.A. Fatores que afetam a qualidade dos pintos de um dia, desde a incubação até recebimento na granja. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n. 16, 1-19, 2011.
31. GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 776-782, 2001.
32. GONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L.; FARINA, G.; KREUZ, B.S.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, 45-55, 2013.
33. HARVEY, S.; JOHNSON, C.D.M.; SANDERS, E.J. Growth hormone in neural tissue of the chick embryo. **Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 3, p. 487-496, 2001.

34. HAUSSINGER, D.; LANG, F.; GEROK, W. Regulation of cell function by cellular hydration state. **American Journal of Physiology**, v. 267, n. 3, p. 343-355, 1994.
35. HOIBY, M.; AULIE, A.; BJONNES, P. O. Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 1, p. 91-94, 1987.
36. JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; BROADBENT, P.; PELL, J.M.; MILLWARD, D.J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 255, n. 2, p. 166-172, 1988.
37. JOCHEMSEN, P.; JEURISSEN, S.H.M. The location and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. **Poultry Science**, v. 81, p. 1811-1817, 2002.
38. KARASOV, W.H.; SOLBERG, D.H.; DIAMOND, J.M. Dependence of intestinal amino acid uptake on dietary protein or amino acid levels. **American Journal of Physiology**, v. 252, n. 5, p. 614-625, 1987.
39. KIDD, M.T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v. 83, p. 650-657, 2004.
40. LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Review**, v. 48, n. 8, p. 297-309, 1990.
41. LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; PEDROSO, A.A.; STRINGHINI, J.H.; OLIVEIRA NETO, G.R.; CAFÉ, M.B. Efeito da suplementação de glicose in ovo sobre o desempenho inicial de pintos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. suppl., p. 69, 2005.
42. LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose, sacarose ou glicose em ovos embrionados de baixo peso. **Acta Scientiarum. Animal Sciences.**, v. 32, n. 1, p. 93-100, 2010.
43. LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; MATOS, M.S.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2014.
44. LOBLEY, G.E.; HOSKIN, S.O.; MCNEIL, C.J. Glutamine in animal science and production. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2525-2531, 2001.
45. MAGNONI, D. A importância socioeconômica da soja. **Revista Qualidade em Alimentação e Nutrição**, n. 9, 2001.
46. MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E.; BORGES, S.A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o

- desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 487-490, 2000.
47. MAIORKA, A. **Efeitos da idade a matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2002. 103p.
48. MENNA, T.M.; MORTOLA, J.P. Metabolic control of pulmonary ventilation in the developing chick embryo. **Respiration Physiology and Neurobiology**, v. 130, n. 1, p. 43-55, 2002.
49. MORAN, E. T. Digestion and absorption in fowl and events through prenatal development. **Journal Nutritional**, v. 115, p. 665-674, 1985.
50. MORAN Jr., E.T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1043-1049, 2007.
51. 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. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 1, p. 7-15, 2009.
52. MURRAY, R.K.; GRANNE, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. Harper: Bioquímica. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 860p.
53. NISTAN, Z.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. **Poultry Science**, v. 70, n. 10, p. 2040-2048, 1991.
54. NOBLE, R.C.; COCCHI, M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. **Progress in Lipid Research**, v. 29, n. 2, p. 107-140, 1990.
55. NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development in poultry. **Journal Applied Poultry Research**, v. 6, p. 344-354, 1997.
56. NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilisation in the newly hatched poult. **British Poultry Science**, v. 39, p. 446-451, 1998.
57. NOY, Y.; SKLAN, D. Energy utilisation in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v. 78, p. 1750-1756, 1999.
58. O'DWYER, S.T.; SCOTT, T.; SMITH, R.J. 5-Fluorouracil toxicity on small intestine mucosa but not while blood cells is decreased by glutamine. **Clinical Research**, v. 38, p. 10-16, 1987.

59. OHTA, Y.; TSUSHIMA, N.; KOIDE, K.; KIDD, M.T.; ISHIBASHI, T. Effects of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. **Poultry Science**, v. 78, n. 11, p. 1493-1498, 1999.
60. OHTA, Y.; KIDD, M.T. Optimum site for in ovo amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p. 1425-142, 2001.
61. OHTA, Y.; KIDD, M.T.; ISHIBASHI, T. Embryos growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos and chicks after *in ovo* administration of amino acids. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p. 1430-1436, 2001.
62. OHTA, Y.; YOSHIDA, T.; TSUSHIMA, N. Comparison between broilers and layers for growth and protein use by embryos. **Poultry Science**, v. 83, n. 5, p. 783-787, 2004.
63. PADOVESE, R. Aplicações clínicas da glutamina. **Revista Brasileira de Ciência Farmacológica**, v. 36, n. 1, p. 23-25, 2000.
64. PEDROSO, A.A.; CHAVES, L.S.; LOPES, K.L.A.M.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H. Inoculação de nutrientes em ovos de matrizes pesadas. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 35, n. 5, p. 2018-2026, 2006.
65. PIERZYNOWSKI, S.G.; PIRDRA, V.J.L.; HOMMEL-HANSEN, T.; STUDZINSKI, T. Glutamine in gut metabolism. In: PIVA, A.; KNUDSEN, K.E.B.; LINDBERG, J.E. **Gut Environment of Pigs**. Nottingham: University Press, p. 43-62, 2001.
66. PIVA, A.; KNUDSEN, K.E.B.; LINDBERG, J.E. Glutamine in gut metabolism. In: **Gut Environment of Pigs**. Nottingham: University Press, 2001. 260p.
67. PREDIGER, C.C.C. **Efeitos do consumo de proteína de soja isolada sobre os níveis de lipídios séricos em mulheres**. Tese (Doutorado em Medicina), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2009. 132p.
68. RAY, E.C.; AVISSAR, N.E.; VUKCEVIC, D.; TOIA, L.; RYAN, C.K.; BERLANGA-ACOSTA, J.; SAX, H.C. Growth hormone and epidermal growth factor together enhance amino acid transport systems B and A in Remnant small intestine after massive enterectomy. **Journal of Surgical Research**, v. 115, n. 1, p. 164-170, 2003.
69. REEDS, P.J.; BURRIN, D.G. Glutamine and the bowel. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2505-2508, 2001.
70. RHOADS, J.M.; ARGENZIO, R.A.; CHEN, W.; RIPPE, R.A.; WESTWICK, J.K.; COX, A.D.; BERSCHNEIDE, H.M.; BRENNER, D.A. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinase. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 943- 953, 1997.

71. SALES, M.N.G. **Criação de galinhas em sistemas agroecológicos**. Vitória: Incaper, 2005. 284P.
72. 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. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 2, p. 3387-3398, 2014.
73. SAS. **Statistical Analysis System** [CD-ROM]. SAS/STAT Software Version 9.2. Cary: SAS Institute Inc, 2008.
74. SATO, M.; TACHIBANA, T.; FURUSE, M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular**, v. 143, n. 3, p. 382-388, 2006.
75. SAVAGE, J.E. Trace minerals and avian reproduction. **Federation Proceedings**, v. 27, p. 927-931, 1968.
76. SCALA JÚNIOR, N.L., Aspectos Físicos da Incubação. In: MACARI, M., GONZALES, E. **Manejo da Incubação**. 2ª ed. Editora Facta. Jaboticabal-SP, p. 98-124, 2003.
77. SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, p. 758-767, 1999.
78. SILVA, A.V.F.; BORGES, S.A.; MAIORKA, A.; GIVIZIEZ, P.E.N.; ROCHA, C.; MACARI, M. Ornithine Decarboxylase expression in the small intestine of broilers submitted to feed restriction and glutamine supplementation. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 111-116, 2007.
79. SKLAN, D.; GEYRA, A.; TAKO, E.; GAL-GERBER, O.; UNI, Z. Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 747-753, 2003.
80. SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, p. 40-44, 1990.
81. SOLBERG, D.H.; DIAMOND, J.M. Comparison of different dietary sugars as inducers of intestinal sugar transporters. **American Journal of Physiology**, v. 252, n. 4, p. 574-584, 1987.
82. SOUBA, W.W.; HERSKOWITZ, K.; SALLOUM, R.M.; CHEN, K.; AUSTGEN, T.R. Gut glutamine metabolism. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n. 4 (suppl.), p. 45 -50, 1990.

83. SPEAKE, B.K.; NOBLE, R.C.; MURRAY, A.M.B. The utilization of yolk lipids by the chick embryo. **World's Poultry Science Journal**, v. 54, n. 4, p. 319-334, 1998.
84. STRYER, L. (1992). **Bioquímica**. Tradução de João Paulo de Campos. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 881.
85. SZONDY, Z.; NEWSHOLME, E.A. The effect of glutamine concentration on the activity of carbomoyl-phosphate synthetase II and on the incorporation of [³H]thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. **Biochemical Journal**, v. 261, n 3, p. 970-983, 1989.
86. TAUDOU, G.; WIART, J.; PIAIJEL, J. Influence of amino acid deficiency and tRNA aminoacylation on DNA synthesis and DNA polymerase activity during secondary immune response in vitro. **Molecular Immunology**, v. 20, n. 3, p. 255-261, 1983.
87. TAKO, E.; FERKET, P.R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and β -hydroxy- β -methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 2023-2028, 2004.
88. TORRAS-LLORT, M.; SORIANO-GARCIA, J.F.; FERRER, R.; MORETO, M. Effect of a lysine-enriched diet on L-lysine transport by the brush-border membrane of the chicken jejunum. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 1, p. 69-75, 1998.
89. UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1998.
90. UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Post-hatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, v. 78, p. 215-222, 1999.
91. UNI, Z. **Methods for early nutrition and their potential**. In: European Symposium of Poultry Nutrition: World Poultry Science Association; Lillehammer, Norway, p. 254-260, 2003.
92. UNI, Z.; FERKET, P.R. **Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding**. US Regular Patent US 6,592,878 B2. 2003. North Carolina State Univ., Raleigh and Yissum Res. Dev. Co., Hebrew Univ. Jerusalem, Israel.
93. UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 11, p. 101-111, 2004.
94. UNI, Z.; FERKET, R.P.; TAKO, E.; KEDAR, O. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, p. 764-770, 2005.
95. VASCONCELOS, M.I.L.; TIRAPEGUI, J. Importância nutricional da glutamina. **Arquivo Gastroenterologia**, v. 35, n. 3, p. 207-215, 1998.

96. VIEIRA, S.L.; MORAN JR, E.T. Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 2, p. 372-376, 1998.
97. VIEIRA, S.L.; POPHAL, S. Nutrição pós-eclosão de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 3, p. 189-199, 2000.
98. VIEIRA, S.L. Nutrição do embrião. **Ave World**, v. 18, n. 3, p. 66-71, 2005.
99. WELBORNE, T.C. Increased plasma bicarbonate and growth hormone after an oral glutamine load. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 1058-1061, 1995.
100. XU, G.; KWON, G.; MARSHALL, C.A.; LIN, T.A.; LAWRENCE, J.C.; McDANIEL, M.L. Branched-chain amino acids are essential in the regulation of PHAS-I and p70 S6 kinase by pancreatic β -cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 43, p. 28178–28184, 1998.
101. YAMAUCHI, K.E.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structure of the intestinal villi and epithelial cells in white leghorn hens. **British Poultry Science**, v. 37, p. 909-921, 1996.

7. ANEXOS



Figura 16. Certificado emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo n. 016/2016) da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, aprovando a execução do estudo.