



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



USO DA CREATINA NA ALIMENTAÇÃO *IN OVO*

LUCAS DUQUE MELO

MANAUS - AMAZONAS

Dezembro, 2019

LUCAS DUQUE MELO

USO DA CREATINA NA ALIMENTAÇÃO *IN OVO*

Orientador: Frank George Guimarães Cruz, Dr.

Coorientadores: Pedro de Queiroz Costa Neto, Dr.

José de Ribamar da Silva Nunes, Dr.

Dissertação apresentado 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

Dezembro, 2019

Ficha Catalográfica

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

M528u Melo, Lucas Duque
 Uso da creatina na alimentação in ovo / Lucas Duque Melo. 2019
 53 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Frank George Guimarães Cruz
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Coorientador: José de Ribamar da Silva Nunes
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Aminoácido. 2. Biotecnologia. 3. Desenvolvimento embrionário.
4. Eclodibilidade. I. Cruz, Frank George Guimarães II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 11 de dezembro de 2019, às 09:00 horas, na Sala de Aula do Setor de Avicultura, Setor Sul do Campus Universitário da UFAM, Manaus/AM, **Lucas Duque Melo**, realizou a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Uso da creatina na alimentação in ovo".

Banca Examinadora:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Frank George Guimarães Cruz (UFAM) – Presidente	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	
Dra. Roseane Pinto Martins de Oliveira (UFAM) – Membro	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	
Dr. Francisco Martins de Castro (ESBAM) – Membro	Aprovado (<input checked="" type="checkbox"/>) Reprovado ()	

Manaus, 11 de dezembro de 2019

Resultado Final: Aprovado ()
Reprovado ()



Universidade Federal do Amazonas- Faculdade de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal- PPGCAN
Secretaria dos PPG's FCA- Bloco FCA/ICB- 2º Andar-Setor Sul- Campus Universitário
Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200 Coroado I - CEP: 69.077-000 Manaus- AM
Fone: (092) 99128-7971/www.ppgcan.ufam.edu.br/e-mail: ppgcan.ufam@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Queria começar agradecendo à Deus, Pai criador, que me trouxe até aqui, me amparando nos momentos de dificuldade, me dando forças para vencer os desafios e me tornando um homem melhor a cada dia.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de um ensino de qualidade desde a graduação, além de uma infraestrutura primordial para que eu pudesse evoluir cada vez mais durante todo esse tempo.

Ao Prof. Dr. Frank George Guimarães Cruz, que me acolheu no setor de avicultura, me proporcionou aprendizado e experiência prática, pela paciência, apoio e por ser um orientador presente e de grande importância na minha formação acadêmica e profissional. Pelos projetos aqui feitos e por toda a confiança em minha pessoa durante todos esses anos. Serei sempre grato por tudo.

Aos meus Coorientadores Prof. Dr. Pedro de Queiroz da Costa Neto e Prof. Dr. José de Ribamar da Silva Nunes, que me ajudaram muito na elaboração e correção da Dissertação, além de me incentivarem a melhorar a cada dia e buscar sempre a perfeição.

Aos docentes, que dividiram comigo seus conhecimentos desde a graduação, sempre visando transmitir o melhor possível e muitas vezes até compartilhando suas próprias experiências.

À minha família pelo apoio e sempre acreditarem em meu potencial, em especial à minha mãe Maria Lucinete Duque Melo, minha tia Maria Olímpia Duque Farias, minha avó Carmen Ruth Duque, meu pai Pedro Carlos Brito Melo e meus irmãos Ramon Duque Melo e Thalia Duque Melo.

Aos meus amigos do setor de avicultura: João, Julmar, Ramon, Pedro Gabriel, Fernanda, Natalia, Ana Paula, Eduardo, Pedrão, Gilberto, Ronner, Thaysa, Juliana, Luana e todos os outros que estagiaram de outros lugares como IFAM e UFAM Campus Parintins. Por todos esses anos de convivência e muita irmandade, por toda a ajuda nos experimentos, nas organizações dos encontros anuais de avicultura, nos congressos, na parte prática de manejo de aves, a todos vocês, sou muito grato.

Aos técnicos do setor de avicultura, Jadilson Barroncas e Francisco Chaves, pela paciência para me ensinar, apoio em tudo que precisei e chamar a atenção quando necessário, que se esforçaram para nos tornar profissionais capacitados no mercado de trabalho.

Aos meus amigos de toda a faculdade e mestrado, Ramon Duque Melo e Julmar da Costa Feijó, que desde 2013 vindos de uma cidadezinha chamada Nhamundá compartilharam comigo a amizade, parceria, perseverança, estudos e todos os momentos importantes durante essa fase de nossas vidas.

Aos amigos Zoobrothers (Eduardo Monteiro, Ramon Duque, Julmar Feijó, Ewerton Tanaka, Uriel Curcio, João Paulo, David Marialva, Pedro Oliveira e Adriano Serrão) por toda ajuda, amizade, comemorações, companheirismo, bons conselhos e pelos momentos singulares vividos em todos esses anos.

À CAPES por conceder a bolsa durante todo o mestrado e financiar as pesquisas durante todo esse tempo.

Aos colegas e amigos da Zootecnia e do PPGCAN por todos esses momentos incríveis e enriquecedores durante a graduação e o mestrado.

MEUS SINCEROS E ETERNOS AGRADECIMENTOS A TODOS VOCÊS.

“Os mais corajosos são certamente aqueles que têm a visão mais clara do que está diante deles, tanto a glória quanto o perigo, e, mesmo assim, vão ao seu encontro.”

Tucídides

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação *in ovo* de creatina sobre a eclodibilidade, peso à eclosão, mortalidade embrionária, rendimento termodinâmico e desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal de pintos Rhode Island Red. Um total de 427 ovos férteis foram distribuídos aleatoriamente em sete tratamentos de 61 ovos cada. Os grupos experimentais foram compostos por ovo íntegro, solução salina a 0,5% e cinco soluções contendo níveis crescentes de creatina (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%). No dia 16 de incubação, os ovos foram inoculados na região do âmnio com soluções contendo creatina dissolvida em 500 µL de 0,5% de solução salina estéril. Após a inoculação, os orifícios foram selados com parafina fundida e os ovos transferidos para a máquina de eclosão. Imediatamente após a eclosão, foram avaliados o peso do pinto ao nascer, o rendimento termodinâmico, a eclodibilidade e a mortalidade embrionária. Cinco pintos aptos de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados via deslocamento cervical para avaliação do peso do coração e desenvolvimento de órgãos e regiões gastrointestinais. A inoculação *in ovo* de creatina afetou diretamente as características de eclosão dos ovos inoculados. A inoculação *in ovo* de creatina em embriões aos 16 dias influenciou diretamente a eclodibilidade e a mortalidade embrionária, especialmente nas primeiras horas após a inoculação. O uso de níveis crescentes de creatina na alimentação *in ovo* proporcionou um aumento linear no peso do pinto, desenvolvimento do trato gastrointestinal e rendimentos termodinâmicos.

Palavras-chave: Aminoácido, Biotecnologia, Desenvolvimento Embrionário, Eclodibilidade.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of *in ovo* feeding of creatine on hatchability, hatching weight, embryo mortality, thermodynamic yields, and organ developments in Rhode Island Red chicks. A total of 427 fertile eggs with viable embryos was randomly distributed to 7 treatments of 61 replicate eggs. The experimental groups were composed of untreated control (control), a sterile buffered solution (0.5% saline), and solutions containing increased levels of creatine (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5%). On d 16 of incubation, eggs were injected with solutions containing creatine dissolved in 500 μ L of 0.5% sterile saline. After injection, the pinholes in the eggs were sealed with molten paraffin and moved to a hatching machine. Immediately post hatch, were evaluated the chicks' weight, hatchability, thermodynamic yields, and embryo mortality. Five able chicks of each treatment were randomly selected and slaughtered by cervical dislocation to evaluation the heart, and gastrointestinal organ and region developments. *In ovo* feeding of creatine directly affect the hatching characteristics of injected eggs. The *in ovo* feeding of creatine to 16-d-old embryos directly influence hatchability and embryo mortality, especially in the first hours post-injection. Increased levels of creatine provide a linear increase in chick weight, development of gastrointestinal tract, and thermodynamic yields.

Keywords: Amino Acid, Biotechnology, Embryo Development, Hatchability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos contendo os grupos controle e soluções com creatina (Cr) ¹	15
Tabela 2 - Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre a eclodibilidade e mortalidade embrionária de pintos Rhode Island Red.....	18
Tabela 3 - Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre o peso de eclosão de pintos Rhode Island Red.....	19
Tabela 4 - Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre o peso dos órgãos de pintos Rhode Island Red.....	21
Tabela 5 - Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre o comprimento das regiões do trato gastrointestinal de pintos Rhode Island Red.....	23
Tabela 6 - Efeitos da inoculação <i>in ovo</i> de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre os rendimentos termodinâmicos de pintos Rhode Island Red.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem aérea do local de realização da pesquisa, Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas.....	11
Figura 2 - Ovos dispostos na máquina de incubação.....	12
Figura 3 - Máquina de incubação realizando a viragem dos ovos.....	12
Figura 4 - Ovoscopia para observação dos ovos férteis.....	13
Figura 5 - Perfuração do ovo e inoculação <i>in ovo</i> das soluções.....	13
Figura 6 - Retirada dos pintos da máquina de eclosão.....	14
Figura 7 - Pesagem dos pintos de um dia de idade.....	14
Figura 8 - Tratamentos contendo os grupos controle e as soluções com creatina.....	15
Figura 9 - Mortalidade intermediária, tardia e pós-bicagem (esquerda para a direita).....	16
Figura 10 - Órgãos do sistema digestivo de um pinto de um dia de idade.....	16
Figura 11 - Medição das temperaturas corporais dos pintos.....	17

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Eclodibilidade vs mortalidade intermediária.....	19
Gráfico 2 - Peso do pinto à eclosão, g.....	20
Gráfico 3 - Proporção do peso do pinto em relação ao peso do seu respectivo ovo.....	20
Gráfico 4 - Saco vitelino, g.....	21
Gráfico 5 - Moela, g.....	21
Gráfico 6 - Coração, g.....	22
Gráfico 7 - Proventrículo, g.....	22
Gráfico 8 - Comprimento total, cm.....	23
Gráfico 9 - Orofaringe + esôfago, cm.....	23
Gráfico 10 - Alça duodenal, cm.....	24
Gráfico 11 - Jejun + íleo, cm.....	24
Gráfico 12 - Cecos, cm.....	24
Gráfico 13 - Cólon + reto, cm.....	25
Gráfico 14 - Rendimento termodinâmico.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Incubação artificial e a cadeia produtiva de pintos.....	3
3.2 Desenvolvimento do trato gastrointestinal e nutrição embrionária do pinto durante a incubação e pós eclosão	4
3.3 Metodologia e otimização da nutrição através da aplicação de substâncias <i>in ovo</i>	5
3.4 Principais nutrientes utilizados na inoculação <i>in ovo</i>	7
3.5 Creatina.....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Local de desenvolvimento do estudo.....	11
4.2 Montagem do experimento	11
4.3 Variáveis analisadas.....	15
4.4 Análise estatística	17
5 RESULTADOS	18
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÕES.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango do mundo e, para manter esta produção elevada faz-se necessário reduzir custos e melhorar a produtividade. Na cadeia produtiva avícola, as granjas de matrizes (matrizeiros), produtoras de ovos férteis, darão origem ao frango que é comercializado no Brasil e no mundo. O incubatório apresenta papel fundamental nessa cadeia avícola, pois a partir de um ovo embrionado obtém-se o pinto de corte de um dia de vida, que deve apresentar qualidade física, sanitária e imunológica.

A incubação de ovos férteis é uma das mais importantes etapas da cadeia produtiva de aves, pois através desta irá gerar, com quantidade e qualidade adequadas, o pinto de um dia. Assim, o manejo utilizado desde a coleta dos ovos nos matrizeiros até o momento do nascimento dos pintos no incubatório é de suma importância.

Dentre as diversas ferramentas que auxiliam no desenvolvimento avícola de maneira geral, a biotecnologia destaca-se pelo seu poder de ampliação de possibilidades e de manipulação de recursos genéticos e biológicos com resposta em curto prazo. Através disso, os custos são reduzidos, aumentando a qualidade e a produtividade, colocando os produtos ao alcance do gosto e do bolso do consumidor de dentro e de fora do país.

Uma das técnicas biotecnológicas mais recentes na ciência e na indústria avícola é a inoculação de nutrientes *in ovo*, que consiste na administração de nutrientes exógenos através do líquido amniótico ou da cavidade alantoide, visando melhorar o desenvolvimento inicial do trato gastrointestinal, a fim de impulsionar as enzimas digestivas e um maior crescimento das vilosidades intestinais. Além disso, o acesso rápido do pinto aos alimentos pode auxiliar na melhora do seu desempenho, do desenvolvimento intestinal e, conseqüentemente, do crescimento de outros órgãos do corpo.

Inúmeras substâncias podem ser utilizadas na alimentação *in ovo*, dentre elas a creatina, que é encontrada em produtos de origem animal, por ser estocada principalmente nos tecidos musculares. A creatina tem potencial para atuar como um substrato energético havendo menor degradação de proteínas musculares com desvio para gliconeogênese e pouparia aminoácidos que são utilizados na síntese endógena de creatina para serem utilizados com outras finalidades, como por exemplo, síntese proteica, melhorando o desenvolvimento inicial das aves.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do uso da creatina na alimentação *in ovo* de embriões da linhagem Rhode Island Red.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a eclodibilidade e peso à eclosão de pintos Rhode Island Red alimentados *in ovo* com soluções contendo creatina;

Analisar a mortalidade embrionária de pintos Rhode Island Red alimentados *in ovo* com soluções contendo creatina;

Mensurar o desenvolvimento do trato gastrointestinal de pintos Rhode Island Red alimentados *in ovo* com soluções contendo creatina;

Verificar os rendimentos termodinâmicos de pintos Rhode Island Red alimentados *in ovo* com soluções contendo creatina;

Determinar o nível ideal de creatina a ser utilizado em soluções para fins de alimentação *in ovo*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Incubação artificial e a cadeia produtiva de pintos

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 pinto produzido (SANTANA *et al.*, 2014).

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).

Ainda que o ovo possa ser considerado completo em termos nutricionais, os percentuais de aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e lipídeos são suficientes nos dois terços iniciais da incubação, estando aquém dos níveis desejáveis no terço final e durante a eclosão nas linhagens modernas (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Normalmente, os pintos demoram a receber a primeira alimentação logo após a eclosão, suportando uma privação dietética por até 48 horas (UNI e FERKET, 2004). Estratégias para reduzir este impacto negativo, como fornecer alimento e água ainda no incubatório ou durante o transporte, possuem pouca praticidade considerando a produção diária de um incubatório comercial.

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. As práticas 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 e FERREIRA, 2011).

3.2 Desenvolvimento do trato gastrointestinal e nutrição embrionária do pinto durante a incubação e pós eclosão

Nas aves, o desenvolvimento do trato gastrointestinal tende a se iniciar entre as primeiras 24 a 96 horas de vida do embrião. Cronologicamente, no terceiro dia de incubação, o tecido do intestino é derivado de endoderme circundado por mesoderma esplâncnico e divide-se em intestino anterior, intestino médio e intestino grosso (MOORE e PERSAUD, 2008). A endoderme originará o revestimento epitelial do intestino e os ductos das glândulas mucosas, enquanto a mesoderme dá origem à parede muscular e ao tecido conjuntivo (DIBNER e RICHARDS, 2004; DIBNER *et al.*, 2007).

No quinto dia de vida embrionária, ocorre a diferenciação da boca, assim como a formação do proventrículo e da moela, enquanto no sexto dia de vida tem-se início a formação do bico e a diferenciação morfológica da alça duodenal, do intestino delgado e dos cecos. Já no décimo quarto dia, ocorre a introdução do intestino na cavidade abdominal e no décimo sétimo dia a abertura do divertículo de Meckel e no meio intestinal inicia-se o mecanismo fisiológico da absorção do saco vitelino (MAIORKA; BOLELI e MACARI, 2002). Verifica-se ainda que a taxa de crescimento do intestino delgado é maior que os demais órgãos. Neste sentido, aos 18 dias de incubação, o intestino delgado do embrião chega a ser 1% proporcional ao peso corporal do pinto, passando a 3,5% no momento da eclosão (UNI; SMIRNOV e SKLAN, 2003).

Segundo Sklan (2001), após a eclosão, o trato gastrointestinal está totalmente desenvolvido, porém imaturo. Neste momento, ocorre a preparação do sistema digestivo, que passará de uma dieta rica em lipídios para uma dieta rica em carboidratos e proteínas. E dentre as mudanças que sucedem o período pós embrionário, a mais relevante é o aumento da atividade enzimática na borda em escova e nos órgãos que as secretam (NITSAN *et al.*, 1991).

E apesar da ave não ter ingerido alimento até o momento da eclosão, as enzimas do intestino e pâncreas, bem como a capacidade de transporte de nutrientes, já encontram-se

presentes (BUDDINGTON, 1992). Entretanto, a capacidade de digestão dos nutrientes não está totalmente estabelecida neste momento (KROGDAHL e SELL, 1989). Mudanças ontogenéticas ocorrem tanto antes quanto após a eclosão, incluindo o aumento nos níveis de enzimas pancreáticas e intestinais (NOY e SKLAN, 1995; SKLAN e NOY, 2000), aumento da área de absorção total do trato gastrointestinal (IJI; SAKI e TIVEY, 2001; SKLAN *et al.*, 2003), e mudanças nos transportadores de nutrientes (BUDDINGTON e DIAMOND, 1989; SKLAN *et al.*, 2003).

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 e 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 disponíveis 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).

No final do processo de incubação, o saco vitelino é gradualmente internalizada na cavidade abdominal do embrião, constituindo a única fonte de nutrientes após o nascimento até o fornecimento de alimentação exógena no alojamento dos galpões de produção (NOY *et al.*, 2001). Assim, a alimentação precoce do embrião pela administração de nutrientes durante o período embrionário pode ter efeito positivo sobre a eclodibilidade, desenvolvimento do sistema digestivo, peso vivo e estado nutricional pós-eclosão, considerando que o acesso ao alimento é fundamental para o desenvolvimento precoce de pintos recém-eclodidos (UNI e FERKET, 2004).

3.3 Metodologia e otimização da nutrição através da aplicação de substâncias *in ovo*

A tecnologia de inoculação de nutrientes *in ovo*, ou “nutrição *in ovo*”, ou mesmo “alimentação *in ovo*”, deriva da tradução da terminologia em inglês “in egg feeding” ou “*in ovo* feeding”, e é considerada uma prática recente na ciência e na indústria avícola (RUFINO, 2018). Atualmente, tem sido considerada uma alternativa viável para o desenvolvimento dos pintos, com a utilização de soluções nutritivas injetáveis no final do período de incubação (UNI e

FERKET, 2004). Considerando que a deficiência de nutrientes no âmnio pode prejudicar o desenvolvimento perinatal, a suplementação destas substâncias diretamente neste conteúdo poderia acelerar o desenvolvimento intestinal e sua capacidade de digerir nutrientes (UNI e FERKET, 2004).

Embora ainda não seja comercialmente utilizada, a aplicação de vacinas, medicamentos, hormônios, probióticos, prebióticos e outros vários nutrientes suplementares têm como objetivo aumentar potencialmente a imunidade e crescimento do pinto e têm sido continuamente estudados em vários laboratórios nos últimos 20 anos (PEEBLES, 2018).

Visando atender às exigências de mercado, o enfoque das pesquisas tem sido a busca por alimentos e nutrientes que, ao serem suplementados às dietas, atuem melhorando a qualidade dos produtos sem afetar a eficiência alimentar (NUNES *et al.*, 2010). Considerando que alguns destes alimentos e nutrientes possuem a capacidade de alterar eventos genéticos, influenciando a saúde e desenvolvimento dos animais (GONÇALVES *et al.*, 2009), a suplementação destes nutrientes na fase embrionária possibilitaria melhores respostas metabólicas em um organismo em formação, favorecendo a expressão de genes de interesse em fase posterior.

A aplicação de nutrientes *in ovo* para frangos de corte tem sido estudada como alternativa para estimular o desenvolvimento fisiológico e morfológico do trato gastrointestinal de pintos. O método de “alimentação precoce” e/ou “alimentação *in ovo*” pode ajudar a suprir alguma deficiência nutricional dos embriões e possibilitar ao pinto de corte atingir todo o potencial de crescimento, principalmente nos primeiros dias de idade, quando há maior crescimento relativo (CAMPOS; GOMES e ROSTAGNO, 2010).

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 em fase intermediária (pintos e/ou embriões mortos entre 16 e 18 dias de incubação, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo), 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) (DAMASCENO *et al.*, 2017).

Já se comprovou 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 (RUFINO, 2018).

3.4 Principais nutrientes utilizados na inoculação *in ovo*

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 devido a um longo período de privação nutricional durante o período embrionário. Contudo, o acesso a nutrientes poderá ocorrer já na fase embrionária, diminuindo 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 proteico (HMB e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina) e/ou agentes tróficos da mucosa intestinal (glutamina, zinco e ácido butírico) (GEYRA; UNI e SKLAN, 2001; UNI *et al.*, 2005; CAMPOS; GOMES e ROSTAGNO, 2010; LEITÃO *et al.*, 2014).

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 (RUFINO *et al.*, 2018).

Outros nutrientes que podem ser destacados para uso na alimentação *in ovo* com importância no desenvolvimento embrionário são as vitaminas e os minerais. 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; GOMES e ROSTAGNO, 2010).

Enquanto 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).

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-butirato (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 proteica e com o hormônio do crescimento (glutamina) (OHTA *et al.*, 1999; CAMPOS; GOMES e ROSTAGNO, 2010).

3.5 Creatina

A creatina pode ser produzida pelo organismo animal, sendo sua síntese realizada no pâncreas, fígado e rins, a partir de outros aminoácidos: arginina, glicina e metionina (BROSNAN *et al.* 2009; COSTALLAT *et al.* 2007). Em humanos é utilizada como suplemento para atletas com intuito de incrementar a síntese proteica, aumentar a massa e força muscular, devido ao aumento da energia intracelular e aumento da taxa de ressíntese de fosfocreatina, possuindo a capacidade de fornecer energia de forma rápida durante atividades de alta performance (COSTALLAT *et al.* 2007; FRANCO *et al.* 2007).

Nas aves as duas etapas de formação da creatina acontecem no fígado. A creatina produzida pelo organismo animal e a obtida pela dieta, entram na corrente sanguínea por difusão e são levadas para dentro das células por meio de transportadores específicos, dependentes de sódio e potássio (DEMINICE *et al.* 2009). A inclusão de creatina na dieta além de fornecer energia faz com que os aminoácidos glicina, arginina e metionina, que são utilizados para síntese da creatina dentro do organismo sejam destinados a outras funções, como a síntese proteica e crescimento muscular (BORGES, 2017).

A glicina é classificada como um aminoácido não essencial para aves e mamíferos (YUAN *et al.* 2012). Entretanto, tem sido considerado aminoácido essencial para o desempenho máximo de pintos de corte em crescimento (CORZO *et al.* 2004). Dessa forma, esse aminoácido é considerado condicionalmente essencial nos primeiros dias de vida das aves. A glicina é necessária para sintetizar ácido úrico, promovendo excreção do excesso de nitrogênio nas aves (CORZO *et al.* 2004). Este aminoácido possui função proteica, mas, além disso, tem uma série de funções metabólicas (YUAN *et al.* 2012), algumas dessas funções estão relacionadas à síntese da creatina, DNA e RNA, e afeta diretamente a síntese proteica (YUAN *et al.* 2012).

A arginina é um aminoácido essencial para os frangos de corte, pois não conseguem sintetizá-la no organismo. As aves são animais uricotélicos e não possuem o ciclo da ureia funcional, sendo assim, não conseguem sintetizar citrulina e por isso não podem fazer a conversão renal de citrulina em arginina (FERNANDES e MURAKAMI, 2010; MURAKAMI *et al.*, 2012). A arginina possui importância na síntese de vários compostos, como ornitina, poliaminas (espermidina, espermina e putrescina), prolina, creatina, proteínas, óxido nítrico, citrulina e glutamato, e por isso, deve ser fornecido na dieta das aves (MURAKAMI *et al.* 2012).

A metionina é o primeiro aminoácido limitante para as aves, sua disponibilidade adequada garante que outros aminoácidos sejam utilizados de forma eficiente para síntese proteica (VIANA *et al.* 2009). Sua função principal é participar da síntese proteica, sendo ainda uma fonte de enxofre que pode ser doado para a síntese de outros componentes químicos que apresenta o enxofre em sua composição (WU, 2003). Tem grande participação na síntese da cisteína que é também utilizada para a síntese da proteína corporal, formação da pele, penas e pelos, sendo este aminoácido importante frente ao estresse e ao *status* inflamatório (TESSERAUD *et al.* 2009).

Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) relataram que livros de bioquímica negligenciam a importância do sistema de creatina quinase, fosforilcreatina e creatina no metabolismo energético. Geralmente, supõe-se que o transporte de fosfato de alta energia entre os locais de produção de ATP (mitocôndrias, glicólise) e o consumo de ATP (todos os tipos de ATP-celular) dependem apenas da difusão de ATP e ADP. Esse conceito pode refletir a situação em tecidos desprovidos de creatina quinase e fosfocreatina, como o fígado, mas é claramente inadequado para creatina quinase que está contida em tecidos com alta e flutuante demanda de energia, como músculo esquelético ou cardíaco (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). O sistema de creatina e fosfocreatina desempenha um papel importante na manutenção da homeostase energética que pode transferir um grupo fosfato para o ADP para a ressíntese do ATP (ALLEN, 2012).

A creatina está presente em alimentos que possuam proteínas animais ou subprodutos de origem animal. Não sendo encontrada em plantas e conseqüentemente não está presente em dietas exclusivamente de origem vegetal (LEMME *et al.* 2012). Ainda segundo Lemme *et al.* (2012), o potencial de ressíntese da creatina em frangos de corte é limitada, podendo assim ser tida como uma substância semi-essencial.

Em dieta exclusivamente vegetal, a suplementação de creatina ou de seu precursor ácido guanidinoacético (AGA), pode melhorar o desempenho dos animais, pois restaura a

disponibilidade de creatina e fosfocreatina nos tecidos (ARAÚJO *et al.* 2013). A exigência de creatina em animais em crescimento é proporcionalmente maior do que animais adultos, pois além de fornecer creatina que é perdida na forma de creatinina, ainda fornece a creatina para crescimento dos tecidos (BROSNAN *et al.* 2009).

De acordo com Costallat *et al.* (2007), a creatina é considerada importante reservatório de energia prontamente disponível para contração muscular, sendo 95% da creatina do corpo é armazenada no músculo esquelético sob a forma livre (40%) e como fosfocreatina – PCr (60%), sua forma fosforilada. Apenas um grama por dia, em uma dieta onívora, é obtido de creatina através da dieta e o restante da necessidade do animal é sintetizado dentro do seu próprio organismo (1 g/dia) (PERSKY e BRAZEAU, 2012).

Para a síntese endógena de creatina é importante que todos os aminoácidos necessários sejam fornecidos na dieta. A síntese se divide em duas etapas, a primeira inicia-se com a transferência reversível do grupo amino do aminoácido arginina para glicina para formar o AGA e ornitina em uma reação catalisada pela enzima L-arginina: glicina amidinotransferase (AGAT) (DILGER *et al.* 2013; DEMINICE *et al.* 2009). A metionina é ativada pelo ATP para formar S-adenosilmetionina (SAM) (DEMINICE *et al.* 2009). A SAM atua principalmente como doadora de metil universal na síntese de compostos metilados como a creatina (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000; DEMINICE *et al.* 2009).

Na segunda etapa, o AGA é metilado em uma reação irreversível, pelo grupo metil da metionina, que se encontra como SAM, e é doado ao AGA pela enzima S-adenosilmetionina: guanidinoacetato N-metiltransferase (GAMT), dando origem a creatina (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Através dessa reação, a síntese endógena de creatina consome um número considerável de grupos metil (DEMINICE *et al.* 2009).

Nos mamíferos, a ornitina produzida durante a síntese de creatina no organismo pode ser reciclada à arginina, porém, as aves não realizam esse processo por não possuírem as enzimas responsáveis por essa reação, como a carbamilsintetase e a ornitincarbamiltransferase (FERNANDES e MURAKAMI, 2010).

A degradação de creatina e fosfocreatina em vertebrados é um processo não enzimático que ocorre de forma espontânea (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). O metabólito gerado nesta degradação é a creatinina, encontrada no sangue e na urina (RIEHL; FONTANA e LÓPEZ, 2004). De acordo com Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) a creatinina é gerada todos os dias no organismo, sendo filtrada nos rins e excretada na urina. Por isso, há a necessidade de uma reposição contínua da creatina que é perdida na forma de creatinina (BROSNAN *et al.* 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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 1).



Figura 1 - Imagem aérea do local de realização da pesquisa, Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas

Fonte: Brelaz, K.C.B.T.R. (2017)

Todos os procedimentos para avaliação da bioeficácia da creatina para fins de inoculação *in ovo* foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - Protocolo nº 043/2018) da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

4.2 Montagem do experimento

Foram incubados 500 ovos oriundos de matrizes da linhagem Rhode Island Red com idade aproximada de 72 semanas (Figura 2). Os ovos foram identificados, pesados e

distribuídos em máquina de incubação modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 37,6 °C de temperatura e 66% de umidade relativa do ar, onde a viragem dos ovos acontecia em intervalos de uma hora (Figura 3).



Figura 2 - Ovos dispostos na máquina de incubação
Fonte: Melo, L. D. (2018)



Figura 3 - Máquina de incubação realizando a viragem dos ovos
Fonte: Melo, L. D. (2018)

Aos 16 dias de incubação, os ovos foram submetidos à ovoscopia para seleção dos ovos embrionados que foram utilizados na inoculação (Figura 4). 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 creatina injetadas à 0,5 mL na

região do âmnio utilizando-se seringas com agulha 7 x 2,5 mm (Figura 5). Em seguida, o orifício da casca do ovo foi lacrado com parafina fundida.

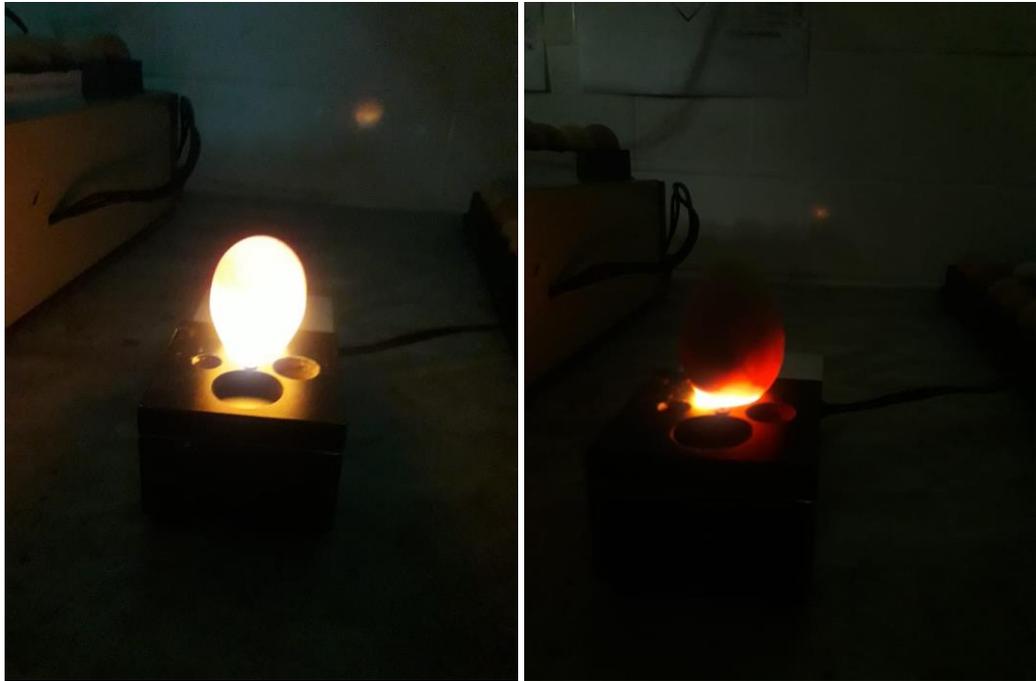


Figura 4 - Ovoscopia para observação dos ovos férteis
Fonte: Melo, L. D. (2018)



Figura 5 - Perfuração da casca do ovo e inoculação *in ovo* das soluções
Fonte: Melo, L. D. (2018)

Após esta etapa, os ovos foram transferidos para máquina de eclosão modelo PETERSIME 168 (Figura 6) 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) (Figura 7).



Figura 6 - Retirada dos pintos da máquina de eclosão
Fonte: Melo, L. D. (2018)

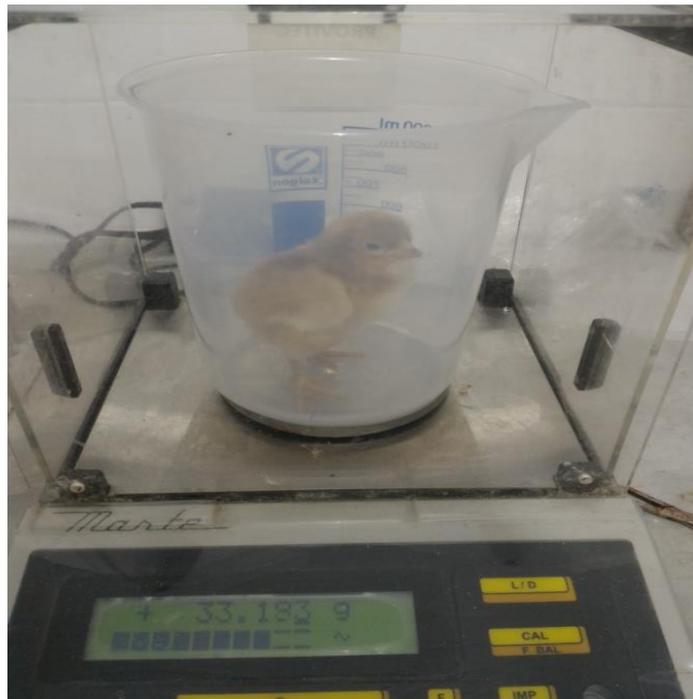


Figura 7 - Pesagem dos pintos de um dia de idade
Fonte: Farias, T. M. (2017)

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), onde os tratamentos do experimento (Tabela 1) consistiram de sete soluções formuladas a partir da inclusão de níveis crescentes de creatina, sendo desenvolvidas com base em solução salina 0,5%, formulada com água deionizada estéril e cloreto de sódio (NaCl), na qual foi incluso cada componente nutricional na dosagem necessária para se obter ao final a concentração desejada (Figura 8). O número de repetições foi estimado com base no percentual de fertilidade dos ovos incubados,

considerando cada ovo como uma repetição, sendo estes distribuídos igualmente entre os tratamentos, utilizando-se assim 61 ovos por tratamento (peso médio de $45,89 \pm 3,91$ g).

Tabela 1 - Tratamentos contendo os grupos controle e soluções com creatina (Cr)¹

Tratamentos	Soluções	Osmolaridade (mOsm/L) ²
Ovo íntegro	-	-
Solução salina	0,5% NaCl	170,94
Solução 1	0,5% NaCl + 0,5 % Cr	247,20
Solução 2	0,5% NaCl + 1,0 % Cr	323,47
Solução 3	0,5% NaCl + 1,5 % Cr	399,73
Solução 4	0,5% NaCl + 2,0 % Cr	476,00
Solução 5	0,5% NaCl + 2,5 % Cr	552,27

¹As soluções experimentais injetadas foram calculadas em 100 mL de solução base.

²Determinado pelo cálculo do peso molecular e concentração das substâncias em cada solução.



Figura 8 - Tratamentos contendo os grupos controle e as soluções com creatina
Fonte: Melo, L. D. (2018)

4.3 Variáveis analisadas

Foram avaliadas as variáveis de rendimentos de incubação, relação pinto/ovo, biometria dos pintos de um dia e rendimento termodinâmico.

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, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo), mortalidade tardia (percentual de pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo), mortalidade pós-bicagem (percentual de pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, com bicagem da casca do ovo) (Figura 9).



Figura 9 - Mortalidade intermediária, tardia e pós-bicagem (esquerda para a direita)
Fonte: Rufino, J. P. F. (2017)

Com base nos resultados de eclodibilidade, selecionou-se aleatoriamente cinco pintos de cada tratamento para serem eutanasiados por meio de deslocamento cervical para realização de biometria dos seguintes órgãos: peso do saco vitelino (g), peso do coração (g), peso do fígado (g), peso do proventrículo (g), peso da moela (g), comprimento total do trato gastrointestinal (cm), 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 10).



Figura 10 - Órgãos do sistema digestivo de um pinto de 1 dia de idade
Fonte: Rufino, J. P. F. (2017)

O rendimento termodinâmico foi calculado através da metodologia de Richard (1971) para temperatura média superficial ($^{\circ}\text{C}$) = $(0.12 \times T. \text{asa}) + (0.03 \times T. \text{cabeça}) + (0.15 \times T.$

canela) + (0.70 x T. dorso), e a temperatura retal (°C) utilizando termômetro para medição das temperaturas dessas diversas áreas do corpo dos pintos (Figura 11).



Figura 11 - Medição das temperaturas corporais dos pintos
Fonte: Melo, L. D. (2018)

4.4 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 foram submetidas à análise de regressão polinomial à 0,01 e 0,05 de significância.

5 RESULTADOS

A eclodibilidade foi linearmente diminuída ($Y = - 15.117x + 105.18 R^2 = 0.85$) por todos os tratamentos que utilizaram inoculação *in ovo* em comparação com o tratamento de ovo íntegro (Tabela 2 e Gráfico 1). Inversamente, a mortalidade intermediária (horas após os procedimentos de inoculação) do embrião aumentou linearmente ($Y = 17,607x + 17,429 R^2 = 0,86$) nos tratamentos com inoculação *in ovo* em comparação ao ovo íntegro (Tabela 2 e Gráfico 1).

Outrora, um efeito quadrático ($y = 0,0456x^2 - 0,958x + 5,4071 R^2 = 0,82$) foi observado na mortalidade embrionária tardia em resposta a utilização de creatina, onde os níveis máximos de mortalidade embrionária tardia foram observados nos tratamentos ovo íntegro e solução salina (Tabela 2). Não foram observadas diferenças nos ovos bicados.

Em resumo, até o nível de 0,5 % de inoculação de creatina, as taxas de eclodibilidade e mortalidade intermediária são relativamente aceitáveis (Tabela 2 e Gráfico 1). A partir do tratamento com nível de 1,0 % de inoculação de creatina, ocorreu uma queda extremamente acentuada na eclodibilidade (61,56 %) e um aumento extremamente acentuado na mortalidade intermediária (61,56 %) em relação ao tratamento anterior (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 - Efeitos da inoculação *in ovo* de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre a eclodibilidade e mortalidade embrionária de pintos Rhode Island Red

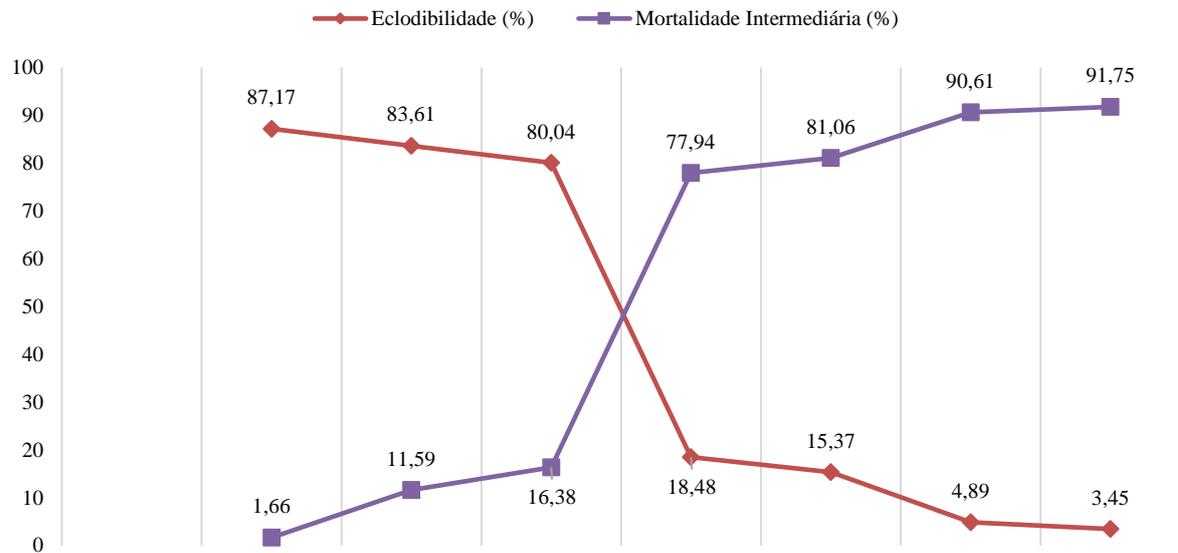
Tratamento ¹	Eclodibilidade, %	Mortalidade intermediária, %	Mortalidade tardia, %	Ovos bicados, %
Ovo íntegro	87,17	1,66	4,70	6,47
Solução salina	83,61	11,59	4,80	0,00
0,5% Cr.	80,04	16,38	3,58	0,00
1,0% Cr.	18,48	77,94	3,58	0,00
1,5% Cr.	15,37	81,06	3,57	0,00
2,0% Cr.	14,89	90,61	3,48	1,02
2,5% Cr.	13,45	91,75	3,22	1,58
p-valor	0,01	0,01	0,05	0,57
Efeito ²	LN	LP	Q	ns
CV (%) ³	3,92	10,78	14,10	16,64

¹Solução salina é a solução com 0,5% de NaCl; Cr. = concentração de creatina. Toda a creatina utilizada na inoculação *in ovo* foi dissolvida em solução salina tamponada.

²Q = Quadrático. LP = Linear Positivo. LN = Linear Negativo. ns = não significativo.

³CV = Coeficiente de variação.

Gráfico 1 - Eclodibilidade vs mortalidade intermediária



Os resultados de peso do pinto ao nascer foram melhorados linearmente ($Y = 0,2532x + 4,86$ $R^2 = 0,75$) por todos os tratamentos que utilizaram inoculação *in ovo* em comparação ao ovo íntegro (Tabela 3 e Gráfico 2). A proporção do peso do pinto para o peso do ovo fértil em todos os tratamentos com inoculação *in ovo* aumentou significativamente ($Y = 0,0111x + 0,6786$ $R^2 = 0,79$) em relação ao ovo íntegro (Tabela 3 e Gráfico 3).

Tabela 3 - Efeitos da inoculação *in ovo* de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre o peso de eclosão de pintos Rhode Island Red

Tratamento ¹	Peso do pinto à eclosão, g	Proporção do peso do pinto em relação ao peso do seu respectivo ovo
Ovo íntegro	31,94	0,68
Solução salina	33,30	0,71
0,5% Cr.	33,40	0,72
1,0% Cr.	33,62	0,73
1,5% Cr.	33,70	0,72
2,0% Cr.	33,79	0,73
2,5% Cr.	36,08	0,77
p-valor	0,01	0,01
Efeito ²	LP	LP
CV (%) ³	2,43	3,59

¹Solução salina é a solução com 0,5% de NaCl; Cr. = concentração de creatina. Toda a creatina utilizada na inoculação *in ovo* foi dissolvida em solução salina tamponada.

²LP = Linear Positivo.

³CV = Coeficiente de variação.

Gráfico 2 - Peso do pinto à eclosão, g

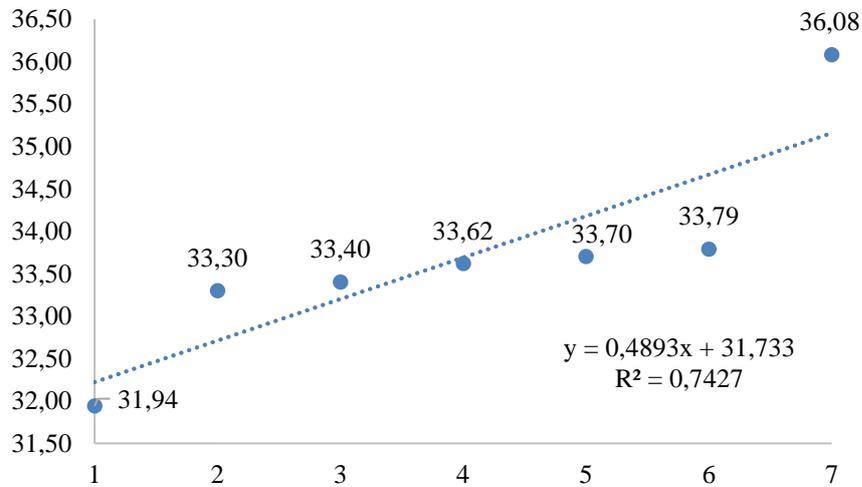
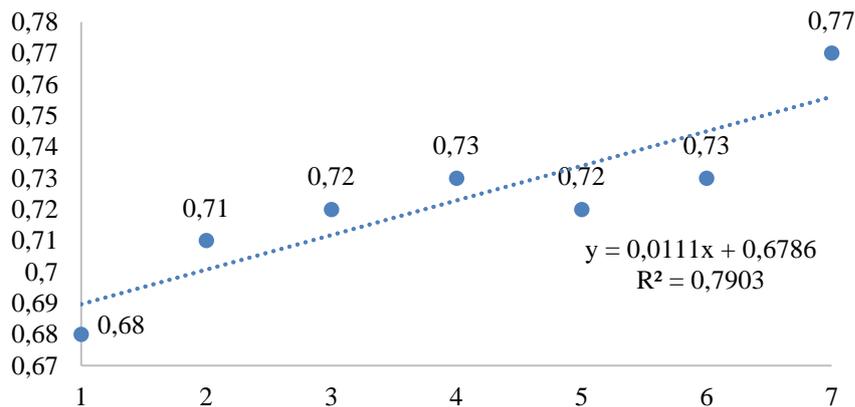


Gráfico 3 - Proporção do peso do pinto em relação ao peso do seu respectivo ovo



Houve ainda um aumento linear no peso do saco vitelino ($Y = 0,3868x + 1,5186$ $R^2 = 0,90$) (Gráfico 4) e peso da moela ($Y = 0,1025x + 1,8129$ $R^2 = 0,81$) (Gráfico 5) por todos os tratamentos com inoculação *in ovo* em comparação ao ovo íntegro (Tabela 4). Efeitos quadráticos no peso do coração ($Y = 0,0061x^2 - 0,0319x + 0,4543$ $R^2 = 0,73$) (Gráfico 6) e peso do proventrículo ($Y = 0,0117x^2 - 0,0655x + 0,5929$ $R^2 = 0,91$) (Gráfico 7) também foram observados em resposta ao aumento dos níveis de creatina, com níveis elevados de creatina (2,5%) proporcionando os melhores resultados (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos da inoculação *in ovo* de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre o peso dos órgãos de pintos Rhode Island Red

Tratamento ¹	Saco vitelino, g	Coração, g	Fígado, g	Proventrículo, g	Moela, g
Ovo íntegro	1,69	0,34	1,12	0,35	2,04
Solução salina	2,09	0,28	1,17	0,32	2,08
0,5% Cr.	3,09	0,28	1,23	0,33	2,09
1,0% Cr.	3,39	0,29	1,27	0,30	2,09
1,5% Cr.	3,26	0,33	1,88	0,31	2,11
2,0% Cr.	3,91	0,36	1,84	0,40	2,32
2,5% Cr.	4,03	0,36	1,90	0,47	2,83
p-valor	0,01	0,01	0,14	0,05	0,05
Efeito ²	LP	Q	ns	Q	LP
CV (%) ³	12,61	14,45	16,98	18,54	11,08

¹Solução salina é a solução com 0,5% de NaCl; Cr. = concentração de creatina. Toda a creatina utilizada na inoculação *in ovo* foi dissolvida em solução salina tamponada.

²Q = Quadrático. LP = Linear Positivo. ns = não significativo.

³CV = Coeficiente de variação.

Gráfico 4 - Saco vitelino, g

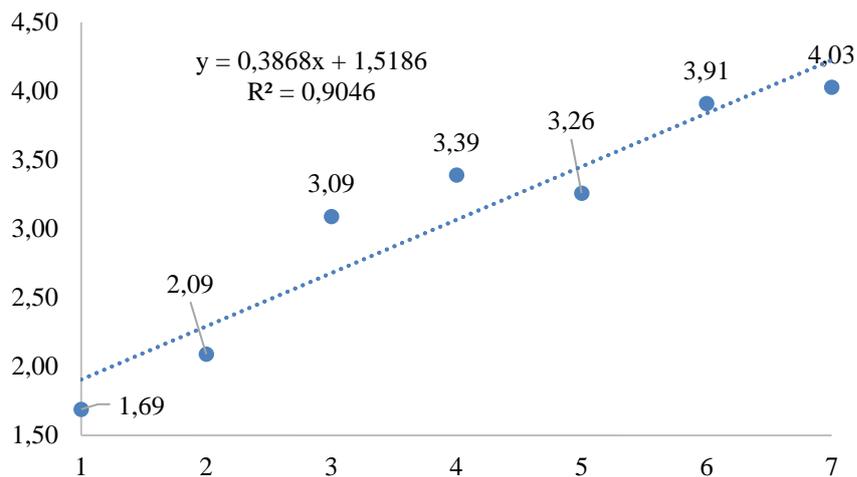


Gráfico 5 - Moela, g

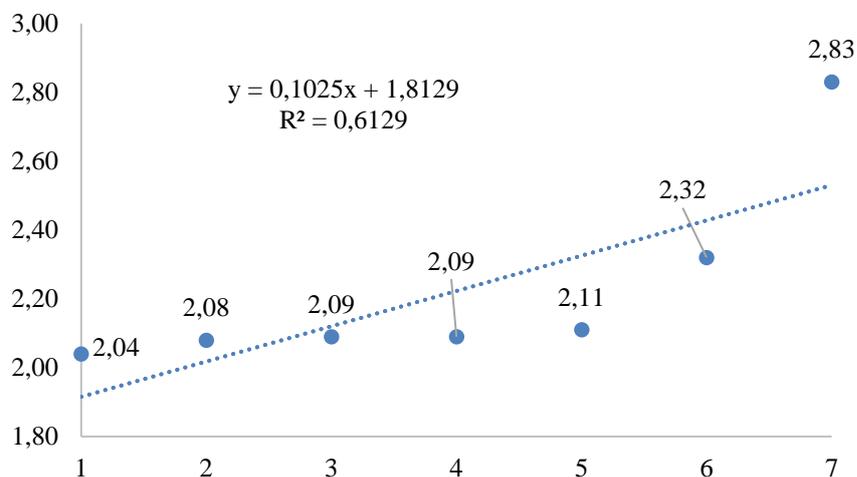


Gráfico 6 - Coração, g

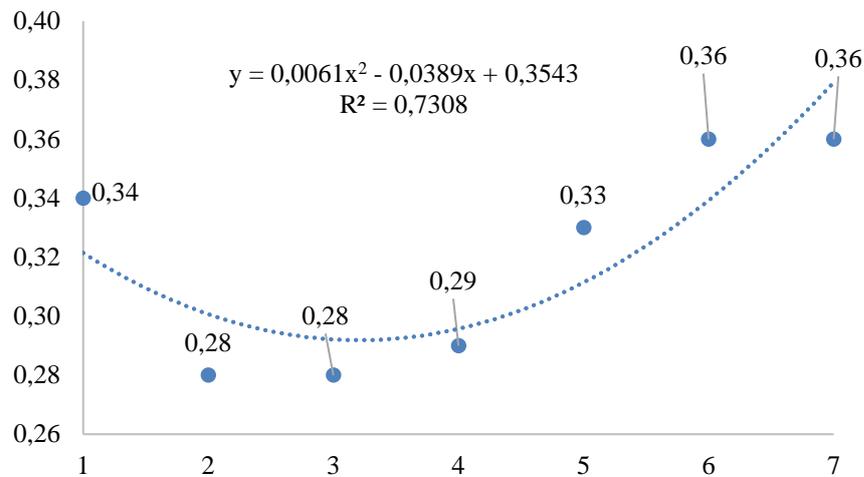
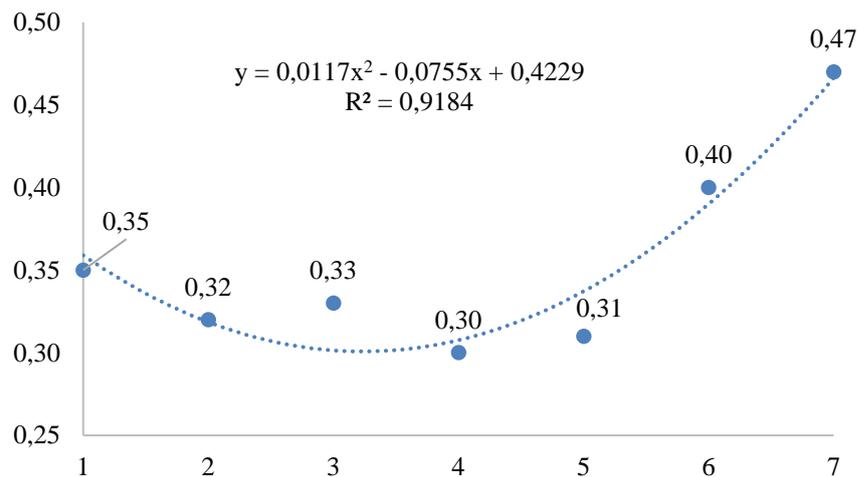


Gráfico 7 - Proventrículo, g



O comprimento total do trato gastrointestinal ($Y = 1,155x + 39,913$ $R^2 = 0,95$) (Gráfico 8), orofaringe + esôfago ($Y = 0,1432x + 6,6271$ $R^2 = 0,93$) (Gráfico 9), alça duodenal ($Y = 0,1868x + 6,3457$ $R^2 = 0,87$) (Gráfico 10), jejuno + íleo ($Y = 0,7286x + 17,22$ $R^2 = 0,94$) (Gráfico 11), cecos ($Y = 0,1421x + 5,3829$ $R^2 = 0,82$) (Gráfico 12) e cólon + reto ($y = 0,2532x + 1,9914$ $R^2 = 0,88$) (Gráfico 13) foram todos linearmente melhorados pelos tratamentos com inoculação *in ovo* em comparação ao ovo íntegro (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeitos da inoculação *in ovo* de creatina no 16º dia do desenvolvimento embrionário sobre o comprimento das regiões do trato gastrointestinal de pintos Rhode Island Red

Tratamento ¹	Comprimento total, cm	Orofaringe + esôfago, cm	Alça duodenal, cm	Jejuno + íleo, cm	Cecos, cm	Cólon + reto, cm
Ovo íntegro	41,60	6,80	6,50	17,60	5,40	2,50
Solução salina	41,90	6,90	6,82	18,60	5,64	2,46
0,5% Cr.	43,70	7,00	7,03	19,90	6,00	2,60
1,0% Cr.	43,81	7,30	7,00	20,45	6,00	2,90
1,5% Cr.	45,60	7,21	7,00	20,50	6,20	3,10
2,0% Cr.	46,32	7,57	7,50	21,90	6,00	3,40
2,5% Cr.	48,80	7,62	7,80	22,00	6,42	4,07
p-valor	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
Efeito ²	LP	LP	LP	LP	LP	LP
CV (%) ³	5,63	11,48	11,59	9,85	14,63	13,15

¹Solução salina é a solução com 0,5% de NaCl; Cr. = concentração de creatina. Toda a creatina utilizada na inoculação *in ovo* foi dissolvida em solução salina tamponada.

²LP = Linear Positivo.

³CV = Coeficiente de variação.

Gráfico 8 - Comprimento total, cm

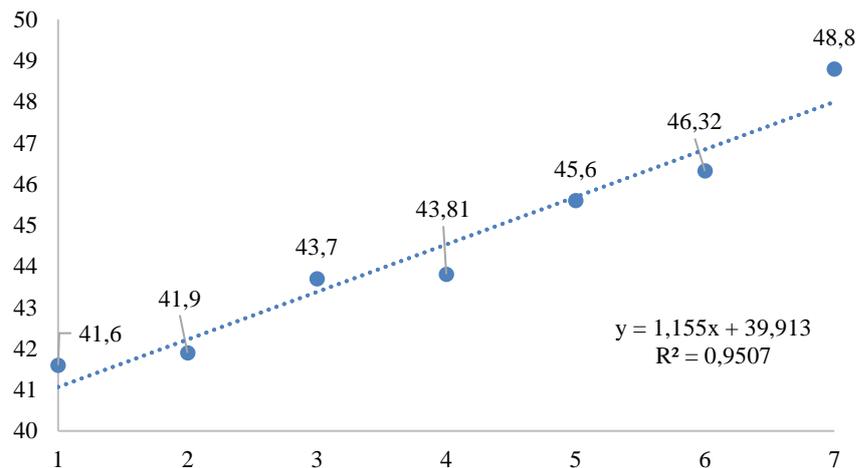


Gráfico 9 - Orofaringe + esôfago, cm

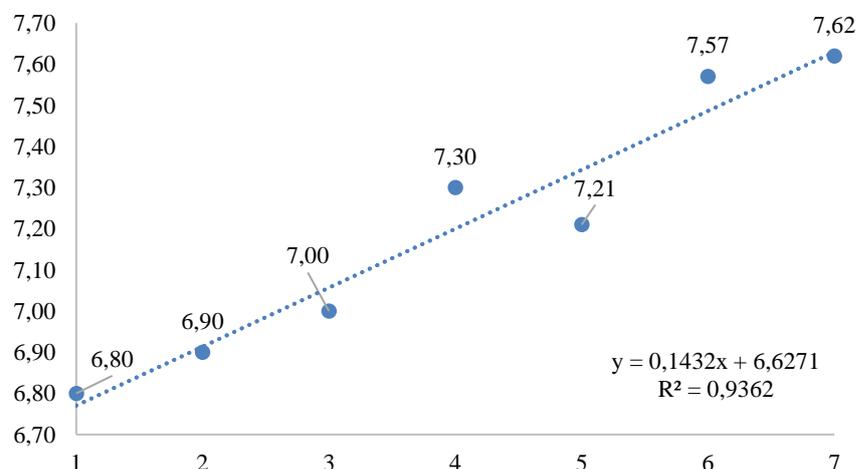


Gráfico 10 - Alça duodenal, cm

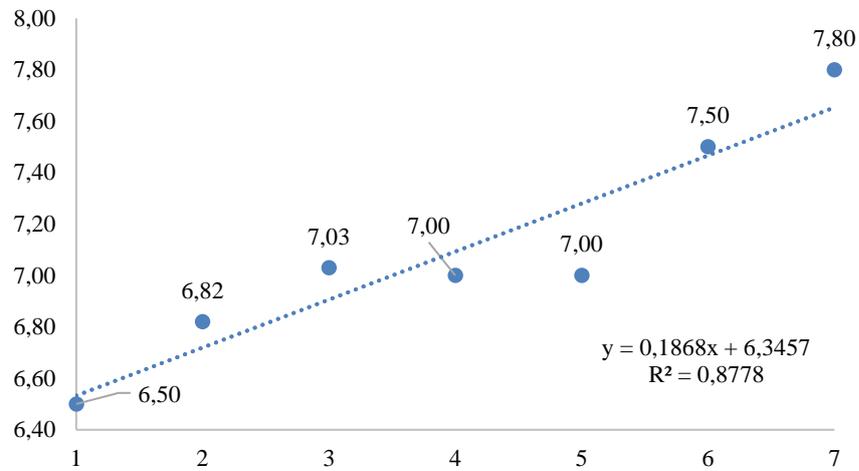


Gráfico 11 - Jejuno + íleo, cm

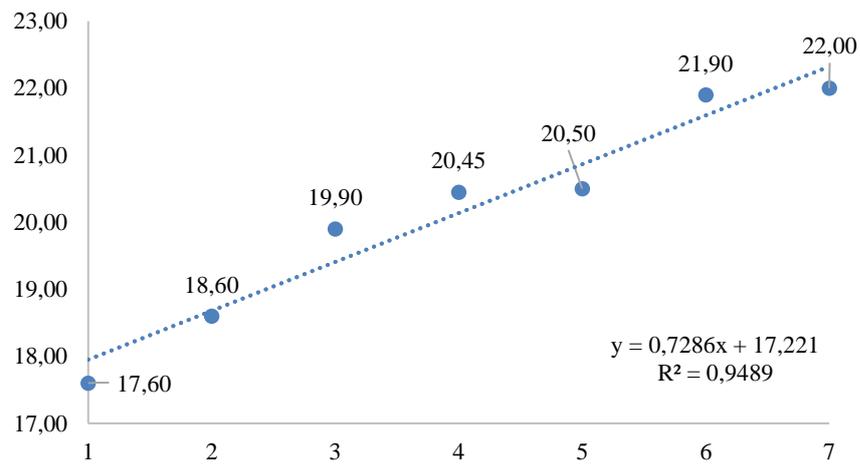


Gráfico 12 - Cecos, cm

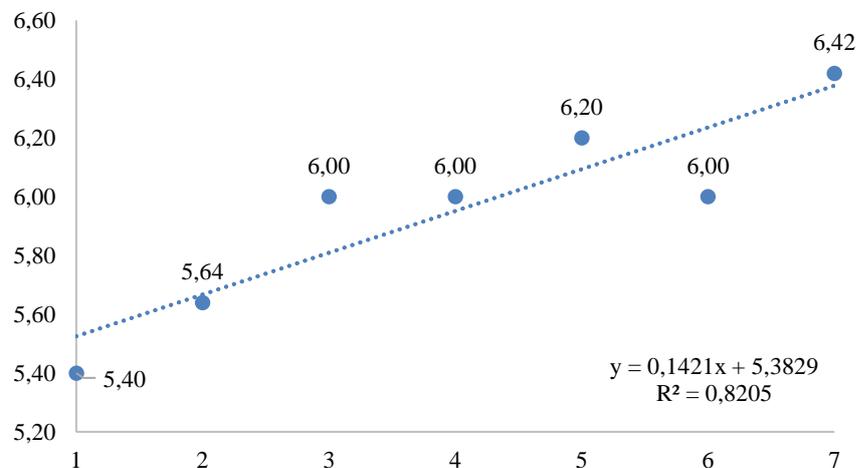
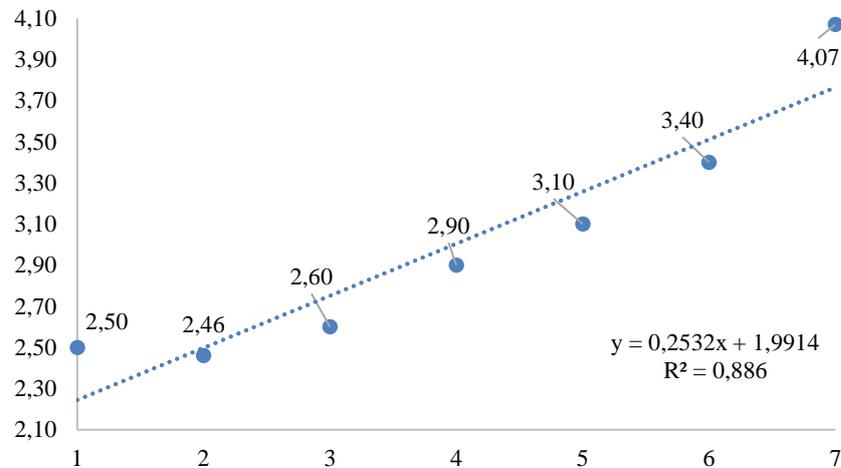


Gráfico 13 - Cólón + reto, cm



Os rendimentos termodinâmicos, tanto temperatura média superficial ($Y = 0,2286x + 35,291$ $R^2 = 0,89$) quanto temperatura retal ($Y = 0,3668x + 34,66$ $R^2 = 0,93$) foram linearmente aumentados pelos tratamentos com inoculação *in ovo* em comparação ao ovo íntegro (Tabela 6 e Gráfico 14).

Tabela 6 - Efeitos da inoculação *in ovo* de creatina no 16º dia de desenvolvimento embrionário sobre os rendimentos termodinâmicos de pintos Rhode Island Red

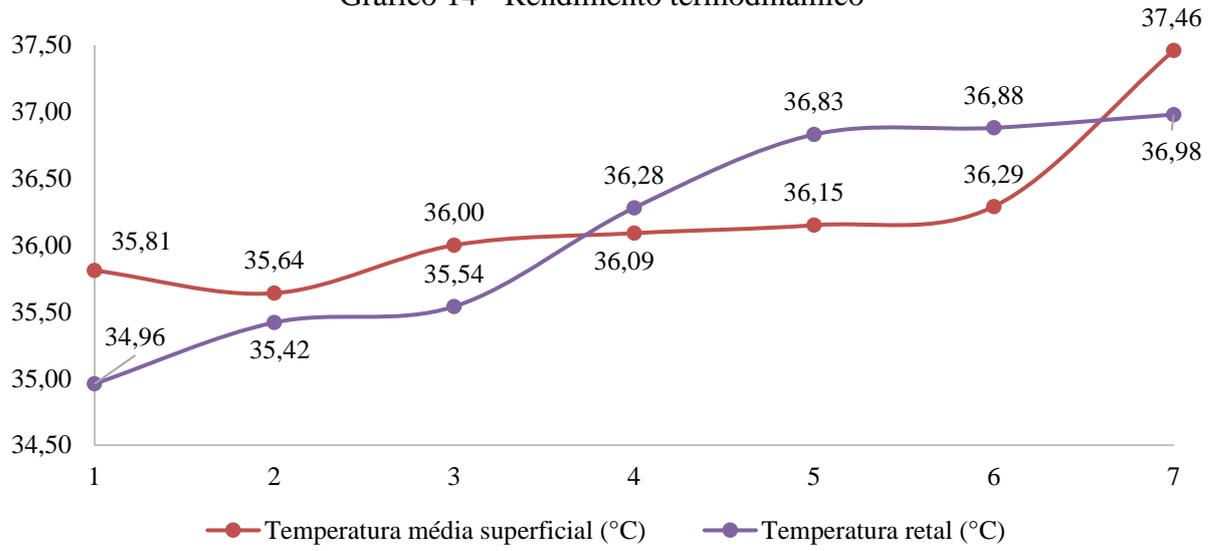
Tratamentos ¹	Temperatura média superficial (°C)	Temperatura retal (°C)
Ovo íntegro	35,81	34,96
Solução salina	35,64	35,42
0,5% Cr.	36,00	35,54
1,0% Cr.	36,09	36,28
1,5% Cr.	36,15	36,83
2,0% Cr.	36,29	36,88
2,5% Cr.	37,46	36,98
p-valor	0,01	0,01
Efeito ²	LP	LP
CV (%) ³	1,56	1,61

¹Solução salina é a solução com 0,5% de NaCl; Cr. = concentração de creatina. Toda a creatina utilizada na inoculação *in ovo* foi dissolvida em solução salina tamponada.

²LP = Linear Positivo.

³CV = Coeficiente de variação.

Gráfico 14 - Rendimento termodinâmico



6 DISCUSSÃO

Os resultados de eclodibilidade corroboram com os observados por Pedroso *et al.* (2006), que relataram maior mortalidade embrionária utilizando solução de glicose injetada no líquido amniótico de embriões aos 16 dias de idade. Segundo esses autores, os nutrientes inoculados *in ovo* apresentam alta energia livre e podem causar alta osmolaridade na solução inoculada. Assim, essas soluções afetam diretamente o desenvolvimento embrionário, sugerindo que a menor taxa de eclodibilidade e a alta mortalidade intermediária dos ovos injetados com alto teor de aminoácidos, verificados nos resultados obtidos neste experimento, podem ser causadas por desequilíbrio osmótico (UNI e FERKET, 2004).

Esta mortalidade intermediária elevada (a partir dos tratamentos com 1% de inoculação *in ovo* de creatina observada nessa pesquisa) e também pelos autores Ohta, Kidd e Ishibashi (2001), e Jochemsen e Jeurissen (2002) testando outros aminoácidos, pode ser atribuída justamente ao aumento gradual da concentração de nutrientes nas soluções, o que causa desbalanceamento considerável do equilíbrio osmótico na fisiologia do embrião, causando um efeito de “dose letal”.

Por outro lado, Pedroso *et al.* (2006) e Santos *et al.* (2010) não relataram efeito da inoculação de glutamina no líquido amniótico de embriões sobre a eclodibilidade. No entanto, Salmanzadeh *et al.* (2016) mostraram que a eclodibilidade foi significativamente reduzida ao inocular glutamina no 7º dia de incubação. Estudos relataram que a inoculação *in ovo* na fase final de incubação, como utilizado neste estudo, pode fornecer efeitos melhores do que na fase inicial, incluindo aumento na eclodibilidade (UNI *et al.*, 2005). A diferença significativa na eclodibilidade entre os grupos inoculados neste estudo e em outros estudos (AL-MURRANI, 1982; OHTA *et al.*, 1999; SALMANZADEH *et al.*, 2016), indica que o tipo de nutriente, sua função metabólica e como isso afeta a osmolaridade da solução injetável são as principais causas de alterações na eclodibilidade e na mortalidade intermediária dos embriões.

O papel da síntese de creatina nas variações do requerimento de outros aminoácidos dos pintos é incerto (AUSTIC e NESHEIM, 1972). Alguns estudos indicaram que as concentrações plasmáticas ou teciduais de creatina podem ser reduzidas quando os pintos são alimentados com dietas deficientes em aminoácidos e que a suplementação de tais dietas com creatina resulta em crescimento destes pintos (ALMQUIST; MECCHI e KRATZER, 1941; FISHER; SALANDER e TAYLOR, 1956).

Ohta, Kidd e Ishibashi (2001) relataram que o aumento no peso do pinto ao nascer pode ser devido a um acréscimo no conteúdo de aminoácidos do saco vitelino ou na utilização de

aminoácidos pelo embrião. North e Bell (1990) comentam que existe uma relação direta entre o peso do ovo e o peso do pinto ao nascer, e por conseguinte com o peso do frango ao abate, sendo que o peso do pinto representa cerca de 70% do peso do ovo. E cada grama a mais no peso do pinto pode representar até 13 gramas no peso do frango ao abate. Neste estudo, pintos oriundos de ovos inoculados com o nível máximo de creatina apresentaram 4,14g a mais de peso em relação aos pintos do tratamento com ovo íntegro, o que pode representar um aumento significativo de peso final da ave.

Yang *et al.* (2017) inoculando piruvato de creatina relataram que a maior capacidade de tamponamento de energia nos músculos dessas aves provavelmente reduziu a necessidade de síntese de glicose via gliconeogênese a partir de proteínas musculares, e foi benéfico para a maior construção muscular dos embriões. No entanto, Zhang *et al.* (2017) relataram que a injeção individual de monidrato de creatina foi insuficiente para promover o crescimento do frango pós-eclosão. Isso pode ser explicado pelas diferentes formas aditivas de creatina usadas para injeção, bem como pelas diferenças na dosagem.

Kornasio *et al.* (2011) relataram que a inoculação de nutrientes no líquido amniótico do embrião, vários dias antes da eclosão, favorece o crescimento de frangos porque seu peso corporal e peso muscular são afetados apenas marginalmente em idade precoce. E como os embriões modernos mostram uma alta exigência de energia, nossa hipótese era que a injeção de creatina no líquido amniótico de embriões em estágio avançado levaria ao seu consumo, absorção intestinal e circulação para áreas de armazenamento de gordura, como o saco vitelino, facilitando o catabolismo de ácidos graxos para energia. Além disso, as maiores reservas de glicogênio provavelmente reduziram a necessidade de síntese de glicose via gliconeogênese a partir de proteínas musculares, concentrando as reservas de energia disponíveis para o desenvolvimento muscular (KORNASIO *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2009; NOY e UNI, 2010).

Neste aspecto, o uso de aminoácidos na alimentação *in ovo* busca atuar justamente sobre estas vias metabólicas, podendo inclusive possibilitar diversos outros efeitos benéficos ao desenvolvimento dos embriões avícolas (OHTA; KIDD e ISHIBASHI, 2001; YANG *et al.*, 2019), tal como o atendimento do requerimento ideal de aminoácidos essenciais e não essenciais para a síntese de proteínas durante o desenvolvimento do embrião, e, conseqüentemente, favorecer a produção muscular (UNI e FERKET, 2004; EBRAHIMI *et al.*, 2017; COSKUN; AKKAN e ERENER, 2018). A creatina, a síntese endógena de glicina, arginina e metionina, que pode ser fosforilada como a fosfocreatina, são moléculas nitrogenadas que podem justamente atuar nestas funções, sendo especialmente importantes para o

metabolismo energético do embrião (BROSNAN e BROSNAN, 2007; NABUURS *et al.*, 2013).

No âmbito da alimentação *in ovo*, em estudo desenvolvido por Elwan *et al.* (2019) utilizando metionina + cistina, verificou-se uma melhora no desenvolvimento embrionário, especialmente na área intestinal, resultando em pintos mais pesados ao nascimento. Ao mesmo tempo, constatou-se valores aumentados do hormônio da tireoide, onde os autores associaram este resultado a um melhor metabolismo embrionário ocasionado justamente pela suplementação de aminoácidos exógenos. Além disso, Coskun *et al.* (2018) também relataram que o uso da metionina na alimentação *in ovo* não ocasionou efeitos negativos sobre o desempenho até 21 dias. Nesta mesma linha de raciocínio, Coskun *et al.* (2014) verificaram que a inoculação *in ovo* de metionina (50 mg de metionina para 1 mL de solução) na região do âmnio chega a aumentar o peso relativo do pinto de 70 para 73%, mas pode diminuir a eclodibilidade em cerca de 5% em comparação ao grupo controle.

Ohta *et al.* (1999) verificaram que no final da incubação, o conteúdo de lisina diminui com o tempo de incubação, o que facilmente leva à uma insuficiência de lisina nos nutrientes a serem disponibilizados aos embriões das linhagens industriais modernas. Entretanto, quando utiliza-se uma suplementação *in ovo* de lisina, esta deficiência pode ser corrigida e ainda melhorar o peso muscular, a morfologia intestinal e a concentração de metabólitos sanguíneos dos pintos (EBRAHIMI *et al.*, 2017). Zhu *et al.* (2019) comenta ainda que o uso da lisina na alimentação *in ovo* pode também ocasionar uma leve redução na eclodibilidade.

O desenvolvimento dos órgãos digestivos é crítico durante o período pós-eclosão, quando as aves mudam para a nutrição enteral, pois desempenham um papel vital na digestão e absorção dos nutrientes (UNI; YAEL e SKLAN, 1999). Além disso, o perfil dos nutrientes exógenos fornecidos ao embrião fornece respostas diferentes ao desenvolvimento embrionário. A inoculação *in ovo* utilizando fontes de energia (carboidratos e alguns aminoácidos) pode acelerar o desenvolvimento intestinal e sua maturidade funcional, agindo como uma ferramenta para superar as limitações de crescimento impostas pela capacidade digestiva limitada em embriões modernos, aumentando sua função intestinal e maturação antes da eclosão (TAKO; FERKET e UNI, 2004; FOYE; UNI e FERKET, 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 pintos, 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 pinto 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; FERKET e UNI, 2004).

Estudos anteriores relataram que os aminoácidos injetados foram absorvidos pelos músculos devido à ação da insulina e incorporados à proteína (FOYE; UNI e FERKET, 2006; CHEN *et al.*, 2009; SALMANZADEH *et al.*, 2016). Os aminoácidos da dieta são importantes mediadores de sinalização na secreção de insulina de células β pancreáticas *in vitro* e liberação de fatores de crescimento semelhantes à insulina *in vivo* (XU *et al.*, 2019), e que as reservas de aminoácidos presentes no saco vitelino são insuficientes para atender aos requisitos do processo de crescimento das aves, especialmente no período final de desenvolvimento embrionário e primeiras 72 horas pós-eclosão (OHTA; KIDD e ISHIBASHI, 2001). O pinto recém-eclodido requer uma dieta balanceada com aminoácidos para apoiar um crescimento ideal. Como o saco vitelino é usado para fornecer nutrientes ao embrião, pesquisas futuras devem abordar a administração de aminoácidos *in ovo* nos atributos subsequentes de crescimento e processamento das aves.

O aumento do rendimento termodinâmico verificado nessa pesquisa, através do crescimento linear da temperatura média superficial e temperatura da cloaca dos pintos, pode de certa forma, constatar possíveis alterações fisiológicas relacionadas a utilização da creatina na alimentação *in ovo*. O aumento dos órgãos digestivos e a morfologia intestinal melhorada indicaram um desenvolvimento mais rápido do trato gastrointestinal nos pintos que receberam creatina *in ovo*. Uma compreensão abrangente do crescimento do embrião e da trajetória do desenvolvimento pode lançar luz sobre a possível contribuição da creatina (ZHANG *et al.*, 2017).

No presente estudo, observou-se que as alterações dos órgãos digestivos devido à injeção de creatina foram muito pronunciadas. Após a injeção da solução de nutrientes no líquido amniótico, o embrião consome oralmente o conteúdo amniótico, o que leva à exposição de nutrientes suplementados ao trato gastrointestinal. Isso pode contribuir para o desenvolvimento mais rápido do trato gastrointestinal antes, no momento, e depois que os pintos perfuram a casca (CHEN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2019).

7 CONCLUSÕES

A utilização de níveis crescentes de creatina na alimentação *in ovo* provocou aumento significativo no peso do pinto, correlação pinto-ovo, desenvolvimento de todas as regiões do trato gastrointestinal, saco vitelino e moela, além do rendimento termodinâmico. A creatina inoculada em concentrações de 2,5% proporcionou um melhor desenvolvimento do coração e proventrículo. A inoculação *in ovo* de creatina afeta diretamente os rendimentos de incubação, podendo ser utilizada até um nível de 0,5% com resultados satisfatórios para percentual de eclodibilidade e mortalidade embrionária intermediária.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, F. *et al.* 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, n. 1, p. 33-39, 2011.

ALLEN, P.J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: does creatine supplementation have therapeutic value? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1442-1462, 2012.

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, p. 171-174, 1982.

ALMQUIST, H.J.; MECCHI, E.; KRATZER, F.H. Creatine formation in the chick. **Journal of Biological Chemistry**, v. 141, p. 365-373, 1941.

ARAÚJO L.F. *et al.* Efeito do ácido guanidinoacético em matrizes pesadas e o desempenho das progênes. **Revista de Produção Animal – Avicultura**. 2013.

AUSTIC, R.E.; NESHEIM, M.C. Arginine and creatine interrelationships in the chick. **Poultry Science**, v. 51, p. 1098-1105, 1972.

BORGES, K.M. **Ácido guanidinoacético em dieta pré-inicial para frangos**. 2017. 54 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, 2017.

BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 241-61, 2007.

BROSNAN, J.T. *et al.* Creatine synthesis is a major metabolic process in neonatal piglets and has important implications for amino acid metabolism and methyl balance. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 7, p. 1292-1297, 2009.

BUDDINGTON, R.; DIAMOND, J. Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 601-619, 1989.

BUDDINGTON, R. Intestinal nutrient transport during ontogeny of vertebrates. **American Journal of Physiology**, v. 32, p. 503-509, 1992.

CALIL, T.A.C. Princípios básicos de incubação. In: CONFERÊNCIA APINCO 2007, SIMPÓSIO SOBRE INCUBAÇÃO, **Anais**, Santos, São Paulo, Brasil, 2007.

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.

CAMPOS, A.M.A. *et al.* 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.

CHEN, W. *et al.* Influence of *in ovo* injection of glutamine and carbohydrates on digestive organs and pectoralis muscle mass in the duck. **British Poultry Science**, v. 50, p. 436-442, 2009.

CHEN, W. *et al.* Influence of *in ovo* injection of disaccharides, glutamine and β -hydroxy- β -methylbutyrate on the development of small intestine in duck embryos and neonates. **British Poultry Science**, v. 51, p. 592-601, 2010.

CORZO, A. *et al.* Dietary glycine needs of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 83, n. 8, p. 1382-1384, 2004.

COSKUN, I. *et al.* Impacts of *in ovo* feeding of DL-methionine on hatchability and chick weight. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 2, p. 47-50, 2014.

COSKUN, I.; AKKAN, A.; ERENER, G. Effects of *in ovo* injection of lysine and methionine into fertile broiler (parent stock) eggs on hatchability, growth performance, caecum microbiota, and ileum histomorphology. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, p. 20170220e, 2018.

COSTALLAT, B.L. *et al.* Resistência à insulina com a suplementação de creatina em animais de experimentação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 1, p. 18e – 21e, 2007.

DAMASCENO, J.L. *et al.* 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.

DEMINICE, R. *et al.* Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 110-116, 2009.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. The digestive system: challenges and opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, p. 86-93, 2004.

DIBNER, J.J. *et al.* Gut development and health in the absence of antibiotic growth promoters. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 1007-1014, 2007.

DILGER, R.N. *et al.* Dietary guanidino acetic acid is an efficacious replacement for arginine for young chicks. **Poultry Science**, v. 92, p. 171–177, 2013.

EBRAHIMI, M. *et al.* The effect of L-lysine *in ovo* feeding on body weight characteristics and small intestine morphology in a day-old Ross broiler chicks. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 168, n. 4, p. 116-125, 2017.

ELWAN, H. *et al.* Effects of *in ovo* methionine-cysteine injection on embryonic development, antioxidant status, IGF-I and TLR4 gene expression, and jejunum histomorphometry in newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. **Animals**, v. 9, p. 25, 2019.

FERKET, P. *et al.* Effect of *in ovo* feeding solution osmolality on hatching turkeys. *In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM*, 2005, Atlanta. **Anais...** Atlanta: Poultry Science Association, v. 84, p. 118, 2005.

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.

FERNANDES, J.I.M.; MURAKAMI, A.E. Arginine metabolism in uricotelic species. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences, v. 32, n. 4, p. 357-366, 2010.

FISHER, H.; SALANDER, R.C.; TAYLOR, M.W. The influence of creatine biosynthesis on the arginine requirement of the chick. **The Journal of Nutrition**, v. 59, p. 491-499, 1956.

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.

FRANCO, F.S.C. *et al.* Efeitos da suplementação de creatina e do treinamento de potência sobre a performance e a massa corporal magra de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, p. 268e-273e, 2007.

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, p. 1-19, 2011.

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.

GONÇALVES, F.M. *et al.* Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104, p. 5-11, 2009.

GONÇALVES, F.M. *et al.* Nutrição *in ovo*: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, p. 45-55, 2013.

IJI, P.A.; SAKI, A.; TIVEY, R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. I. Intestinal weight and mucosal development. **British Poultry Science**, v. 42, p. 505-513, 2001.

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.

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

KROGDAHL, A.; SELL, J. Influence of age on lipase, amylase, and protease activities in pancreatic tissue and intestinal contents of young turkeys. **Poultry Science**, v. 68, p. 1561-1568, 1989.

LEITÃO, R.A. *et al.* Inoculação de maltose, sacarose ou glicose em ovos embrionados de baixo peso. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, p. 93-100, 2010.

LEITÃO, R.A. *et al.* Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2014.

LEMME A. *et al.* Supplemental guanidinoacetic acid affect energy metabolism of broilers. *In*: 16th European Symposium on Poultry Nutrition; Strasbourg, França. **World Poultry Science Association**, 2012.

MAIORKA, A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. *In*: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2^a ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 113-123, 2002.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia básica**. Rio de Janeiro: Elsevier do Brasil, 365p., 2008.

MORAN, E.T. Digestion and absorption in fowl and events through prenatal development. **The Journal of Nutrition**, v. 115, n. 5, p. 665-674, 1985.

MURAKAMI, A.E. *et al.* Effects of starter diet supplementation with arginine on broiler production performance and on small intestine morphometry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 259-266, 2012.

NABUURS, C.I. *et al.* Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. **The Journal of Physiology**, v. 591, p. 571-592, 2013.

NITSAN, Z. *et al.* Growth and development of digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, v. 32, p. 515-523, 1991.

NORTH, M.O.; BELL, D.D. **Commercial chicken production**. 4.ed. New York: Chapman & Hall, 1990.

NOY, Y.; SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poultry Science**, v. 74, p. 366-373, 1995.

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

NOY, Y.; UNI, Z. Early nutritional strategies. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, p. 639-646, 2010.

NUNES, J.K. *et al.* Suplementação de extrato de levedura na dieta de poedeiras: qualidade de ovos. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 369-377, 2010.

OHTA, Y. *et al.* 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.

OHTA, Y.; KIDD, M.P.; ISHIBASHI, T. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos and chicks after *in ovo* administration of amino acids. **Poultry Science**, v. 80, p. 1430-1436, 2001.

PEDROSO, A.A. *et al.* Glutamine as broilers embryos nutrient. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, p. 43-49, 2006.

PEEBLES, E.D. *In ovo* applications in poultry: A review. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2322-2338, 2018.

PERSKY A.M.; BRAZEAU G.A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 161-176, 2012.

RICHARD, S.A. The significance of changes in the temperature of the skin and body core of the chicken in the regulation of heat loss. **Journal of Physiology**, v. 216, n. 1, p. 1-10, 1971.

RIEHL, O.; FONTANA, K.E.; LÓPEZ, R.F.A. Excreção de creatinina como meio de análise de massa corporal magra. **EFDEPORTES** - Revista digital, Buenos Aires, p. 69, 2004.

RUFINO, J.P.F. **Bioeficácia da inoculação de L-glutamina em ovos embrionados de matrizes avícolas**. 2018. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, 2018.

RUFINO, J.P.F. *et al.* **Biotechnologias aplicadas à reprodução de aves**. Manaus: EDUA, 131 p., 2018.

SALMANZADEH, M. *et al.* The effects of *in ovo* feeding of glutamine in broiler breeder eggs on hatchability, development of the gastrointestinal tract, growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. **Archives of Animal Breeding**, v. 59, p. 235-242, 2016.

SANTANA, M.H.M. *et al.* Incubação: principais parâmetros que interferem no desenvolvimento embrionário de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 2, p. 3387-3398, 2014.

SANTOS, T.T. *et al.* Influence of *in ovo* inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, p. 1-12, 2010.

SAS. **Statistical Analysis System** [CD-ROM]. SAS/STAT Software Version 9.2. Cary: SAS Institute Inc, 2008.

SAVAGE, J.E. Trace minerals and avian reproduction. **Federation Proceedings**, v. 27, p. 927-931, 1968.

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.

SKLAN, D.; NOY, Y. Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 1306-1310, 2000.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, n. 4, p. 415-428, 2001.

SKLAN, D. *et al.* Ontogeny of brush border carbohydrate digestion and uptake in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 747–753, 2003.

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, p. 2023–2028, 2004.

TESSERAUD, S. *et al.* Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1132–1139, 2009.

UNI, Z.; YAEL, N.; SKLAN, D. Post hatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, v. 78, p. 215–222, 1999.

UNI, Z.; FERKET, P.R. (2003). **Enhancement of development of oviparous species by *in ovo* feeding**. U.S. Patent No. 6,592,878. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2003.

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

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.

UNI, Z. *et al.* *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, n. 5, p. 764–770, 2005.

VIANA, M.T.S. *et al.* Fontes e níveis de metionina em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 9, p. 1751–1756, 2009.

VIEIRA, S.L. Nutrição do embrião. **Ave World**, v. 18, n. 3, p. 66–71, 2005.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol**, v. 80, n. 3, p. 1107–1213, 2000.

XU, Q.Q. *et al.* Effects of *in ovo* injection of L-histidine on hatch performance and post-hatch development in domestic pigeons (*Columba livia*). **Poultry Science**, v. 98, n. 8, p. 3194-3203, 2019.

YANG, T. *et al.* *In ovo* feeding of creatine pyruvate alters energy metabolism in muscle of embryos and post-hatch broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 32, p. 834-841, 2019.

YUAN, J. *et al.* Evaluation of the role of glycine in low-protein amino acid-supplemented diets. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, p. 726-737, 2012.

WU, G. Interrelation ship among methionine, choline and betaine in channel catfish – *Ictalurus punctatus*. **Master of Science**, v. 15, p. 45, 2003.

ZHANG, X.Y. *et al.* Effects of *in ovo* feeding of L-arginine on hatchability, hatching time, early post hatch development, and carcass traits in domestic pigeons (*Columba livia*). **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 4462-4471, 2017.

ZHU, M.K. *et al.* Effects of *in ovo* feeding of L-lysine on hatchability, hatching time, and early post-hatch development in domestic pigeons (*Columba livia*). **Poultry Science**, v. 0, p. 1-8, 2019.