

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**USO DE ANTIBIÓTICO ASSOCIADO A VACINAÇÃO *IN OVO*:
RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE
PINTOS DE CORTE**

DAYANNA FERNANDES ADORNO

**SALVADOR – BA
JUNHO - 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**USO DE ANTIBIÓTICO ASSOCIADO A VACINAÇÃO *IN OVO*:
RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE
PINTOS DE CORTE**

DAYANNA FERNANDES ADORNO

Médica Veterinária

**SALVADOR – BA
JUNHO - 2017**

DAYANNA FERNANDES ADORNO

**USO DE ANTIBIÓTICO ASSOCIADO A VACINAÇÃO *IN OVO*:
RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO E PARÂMETROS
ZOOTÉCNICOS DE PINTOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção de Monogástricos.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa
Coorientadora: Dra. Viviane de Souza Morita

**SALVADOR – BA
JUNHO - 2017**

Adorno, Dayanna Fernandes.

Uso de antibiótico associado a vacinação in ovo rendimento de incubação e parâmetros zootécnicos de pintos de corte / Dayanna Fernandes Adorno. - 2017.
60 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa.

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane de Souza Morita.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2017.

1. Zootecnia. 2. Eclodibilidade. 3. Ovos - Incubação. 4. Antibióticos em veterinária. 5. Aves domésticas - Vacinação. I. Barbosa, Vanessa Michalsky. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.5

CDU - 636.5

DAYANNA FERNANDES ADORNO

**USO DE ANTIBIÓTICO ASSOCIADO A VACINAÇÃO *IN OVO*:
RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE
PINTOS DE CORTE**

Dissertação defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 16 de junho de 2017.

Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa
UFBA
Orientadora/Presidente



Profa. Dra. Juliana Cantos Faveri
UFBA



Profa. Dra. Lia Muniz Barretto Fernandes
UFBA

*“O Senhor é a minha luz e a minha salvação;
A quem temerei?
O Senhor é a força da minha vida;
De quem me recearei? ”*

Salmos 27:1

Dedico este trabalho aqueles que me deram força, pois sem vocês eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e iluminado o meu caminho por onde passei.

A toda minha família, em especial a meu esposo e a minha mãe que acreditaram em mim e deram o apoio incondicional para este momento.

À minha orientadora Professora Vanessa Michalsky, por ter tido fé em mim mesmo sem me conhecer, ter tido a paciência para me ensinar e ter me ajudado sempre tanto no profissional quanto no pessoal. Você é muito importante para minha vida e sempre estará comigo na minha caminhada pela profissão.

Ao meu grupo de pesquisa NUPIA, que hoje é mais do que um grupo e sim minha família. Nunca irei esquecer todos os momentos que passamos juntos, as lutas para ter o nosso laboratório, criar o grupo, vê-lo crescer, receber novas pessoas, as brigas, as alegrias, as dificuldades e as comemorações. Vocês fazem parte desde momento surreal: Vanessa, Viviane, Fúlvio Melo, Izabela, Larissa, Tayana, Taís, Nayana, Vítor e Najela. Também quero agradecer a todos os alunos da graduação/Pibics que participaram de alguma forma na realização deste experimento.

Aos membros da comissão examinadora pela enriquecedora colaboração neste trabalho.

Aos professores da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA por me ajudarem nos momentos de dificuldade, não deixando de destacar ao Professor José Esler pela paciência e enriquecedora colaboração nas análises estatísticas e nas análises sanguíneas.

Aos meus novos amigos Nezas e André que tive a sorte de tê-los conhecido e tiveram a delicadeza de me ajudar durante os dias no incubatório.

À patrocinadora deste trabalho, empresa BIOCAMP por financiar a pesquisa e me dar à oportunidade de realização do experimento.

À empresa Asa Branca, representada por Danilo Cardoso, pela condução e realização do experimento dentro do incubatório e pela oportunidade de conhecer diversos setores da Avicultura.

Agradeço também a todos os funcionários da Granja Asa Branca, por me recepcionar com muito carinho e preocupação. Obrigada a todos vocês pela ajuda e colaboração.

Aos meus amigos, Ariana Pereira, Alba Dutra, Mariana, Isabela Fontinelle, Rui Vilas Boas, Jozir Dantas, Gilmar Cardoso e Gilmar Cardoso Júnior por terem feito a minha estadia em Salvador maravilhosa, amo vocês.

Aos meus amigos de graduação e pós-graduação: Carine, Sylvania Dourado e Isabela.

A todos que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões do ovo embrionado (Embrex®) para aplicação da vacina <i>in ovo</i>	3
Figura 2. Distribuição dos ovos incubáveis de acordo com os tratamentos.....	14
Figura 3. Avaliação do peso específico de acordo com cada densidade.....	15
Figura 4. Peso do ovo e seus componentes.....	16
Figura 5. Medição da espessura da casca.....	17
Figura 6. Distribuição das bandejas dentro da máquina incubadora.....	18
Figura 7. Mensuração da temperatura da casca do ovo.....	18
Figura 8. Teste de injeção realizado por 15 minutos.....	19
Figura 9. Preparação da vacina.....	20
Figura 10. Bolsa térmica contendo gelo para preservação da qualidade da vacina.....	20
Figura 11. Processo de vacinação <i>in ovo</i>	21
Figura 12. Transferência dos ovos vacinados das bandejas de incubação para a bandeja de eclosão.....	22
Figura 13. Contagem dos pintinhos para avaliação de janela de nascimento.....	23
Figura 14. Comprimento de pintinho.....	25
Figura 15. Escore de umbigo.....	26
Figura 16. Órgãos separados para pesagem individual.....	27

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Relação dos antibióticos utilizados como promotores de crescimento.....	7
Tabela 2. Prazo para a retirada dos antibióticos nos animais antes da obtenção dos produtos.....	9
Tabela 3. Composição, peso específico e espessura da casca de ovos provenientes de matrizes pesadas Cobb® com 35 semanas de idade, utilizados em ambos os tratamentos do experimento.....	30
Tabela 4. Parâmetros do rendimento de incubação de ovos submetidos ao processo de vacinação <i>in ovo</i> com e sem antibiótico.....	31
Tabela 5. Parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos vacinados <i>in ovo</i> com ou sem antibiótico.....	33
Tabela 6. Peso de órgãos em valores absolutos (g) e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino (%) de recém-eclodidos que foram submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem antibiótico.....	34
Tabela 7. Parâmetros sanguíneos de recém-eclodidos que foram submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem antibiótico.....	35
Gráfico 1. Dispersão de eclosão de acordo com os tempos de nascimento para tratamento controle.....	32
Gráfico 2. Dispersão de eclosão de acordo com os tempos de nascimento para o tratamento vacinação <i>in ovo</i> + antibiótico.....	33

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Vacinação <i>in ovo</i>	2
2.2. Antibióticos.....	4
2.2.1. Definição e características	4
2.2.2. Uso de antibióticos como promotor de crescimento animal.....	6
2.2.3. Uso de antibióticos <i>in ovo</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Primeira fase experimental	13
3.1.1. Local	13
3.1.2. Ovos	13
3.1.2.1. Características dos ovos.....	15
3.1.2.2. Peso específico dos ovos.....	15
3.1.2.3. Peso dos ovos e seus componentes	16
3.1.2.4. Espessura da casca	16
3.1.3. Pré-incubação e incubação dos ovos.....	17
3.1.4. Ovos inférteis e mortalidade embrionária observada na ovoscopia.....	19
3.1.5. Vacinação <i>in ovo</i>	19
3.1.6. Transferência para o nascedouro	22
3.1.7. Avaliação de janela de nascimento	22
3.1.8. Nascimento dos pintos	23
3.1.9. Análises de rendimento de incubação – primeira fase experimental.....	23
3.1.9.1. Perda de peso dos ovos durante o período de incubação.....	23
3.1.9.2. Mortalidade embrionária e fertilidade (%)	24
3.1.9.3. Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis (%).....	25
4.1. Segunda fase experimental	25
4.1.1. Variáveis Analisadas.....	25

4.1.1.1. Peso dos pintos no momento da eclosão.....	25
4.1.1.2. Comprimento do pintinho (cm)	25
4.1.1.3. Escore de umbigo.....	26
4.1.1.4. Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia.....	26
4.1.1.5. Peso dos órgãos e Peso do pinto sem o saco vitelino	27
5. Análise Estatística.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Uso de antibiótico associado a vacinação *in ovo* rendimento de incubação e parâmetros zootécnicos de pintos de corte

RESUMO

A utilização de antibiótico concomitantemente à vacinação *in ovo* tem sido realizada em alguns incubatórios industriais. Entretanto, pesquisas sobre as implicações deste procedimento são escassas. Foi realizado um experimento em larga escala para avaliar os efeitos do uso do antimicrobiano gentamicina associado à vacinação *in ovo* sobre o rendimento de incubação, qualidade e morfofisiologia dos pintos recém-eclodidos. Ovos provenientes de matrizes Cobb® com 35 semanas de idade foram divididos em dois tratamentos, baseados na aplicação ou não do antibiótico no momento da vacinação *in ovo*. O estudo foi dividido em duas fases experimentais. Na primeira fase, foram realizadas as análises de qualidade dos ovos incubáveis e de rendimento de incubação. Na segunda fase, foram avaliados a qualidade e parâmetros fisiológicos dos pintinhos de 1 dia. A eclodibilidade sobre os ovos férteis não foi afetada pela inclusão de antibiótico *in ovo* ($P>0,05$), assim como não houve alteração na mortalidade embrionária ($P>0,05$). Os pintos que receberam antibiótico apresentaram variáveis de qualidade como peso, YFBM e comprimento maiores ($P\leq 0,05$) quando comparado aos pintos que não receberam antibiótico. O escore de umbigo não apresentou diferença significativa. Em relação ao peso dos órgãos, os embriões que receberam o antimicrobiano apresentaram maiores ($P\leq 0,05$) pesos absolutos do coração, fígado e pulmão. Glicose, lactato e ácido úrico foram os parâmetros bioquímicos analisados e os resultados são sugestivos de que os pintos oriundos de ovos inoculados com antibiótico mobilizam menos proteína muscular no processo de eclosão. Estudos aprofundados sobre o uso de antibióticos *in ovo* devem ser realizados na fase de criação e abate das aves para elucidar os impactos zootécnicos e de segurança alimentar desta prática.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, frangos de corte, metabolismo, incubação, fisiologia

Use of antibiotic associated with vaccination in ovo incubation yield and zootechnical parameters of broiler chicks.

ABSTRACT

The use of antibiotics concomitantly with in ovo vaccination has been performed in some industrial hatcheries. However, research on the implications of this procedure is scarce. A large-scale experiment was carried out to evaluate the effects of the antimicrobial gentamicin associated with in ovo vaccination on the incubation yield, quality and morphology of newly hatched chicks. 35-week-old Cobb® eggs were divided into two treatments, based on whether or not the antibiotic was applied at the time of in ovo vaccination. The study was divided into two experimental phases. In the first phase, quality analyzes of hatching eggs and incubation yield were performed. In the second phase, the quality and physiological parameters of 1-day chicks were evaluated. Hatchability on fertile eggs was not affected by the inclusion of antibiotic in ovo ($P > 0.05$), nor was there any change in embryo mortality ($P > 0.05$). The chicks that received antibiotics presented quality variables such as weight, YFBM and longer length ($P < 0.05$) when compared to chicks that did not receive antibiotics. The navel score did not present a significant difference. Regarding the organ weight, the embryos that received the antimicrobial presented higher ($P < 0.05$) absolute weights of the heart, liver and lung. Glucose, lactate and uric acid were the biochemical parameters analyzed and the results are suggestive that the chicks from eggs inoculated with antibiotics mobilize less muscle protein in the hatching process. It was concluded that the use of the antibiotic gentamicin associated with in ovo vaccination at a dose of 0.20mg / egg does not alter the incubation yield and produces one day chicks of better quality. However, more studies on the use of antibiotics in ovo should be conducted at the stage of poultry breeding and slaughter to elucidate the zootechnical and food safety impacts of this practice.

Keywords: broiler chicken, embryonic development, incubation, metabolism, physiology

1. INTRODUÇÃO

Os pesquisadores Sharma e Burmester (1982) demonstraram pela primeira vez a viabilidade da aplicação da vacina *in ovo* contra o vírus de Marek, quando aplicada entre 18^o a 19^o dias de incubação nos embriões de galinha. Esta possibilidade estimulou o mercado avícola a desenvolver um mecanismo automatizado de injeção em ovos, que é considerado rápido, preciso e seguro para os embriões.

A vacinação *in ovo* não só modernizou a forma de como se realiza o procedimento de vacinação nas aves, como também possibilitou a utilização de outros produtos simultaneamente, tais como nutrientes e antibióticos (GILDERSLEEVE et al., 1993; GILDERSLEEVE; FLUKE, 1995; WILLIAMS, 2009; BERNADINO; DAGA, 2013).

A administração de antibióticos em conjunto com a vacinação *in ovo* tem sido realizada em alguns incubatórios, apesar do mecanismo de ação das substâncias utilizadas como promotores de crescimento nos embriões ainda não estar totalmente elucidado. Acredita-se na ocorrência da diminuição de um determinado grupo de bactérias sensíveis à substância administrada, que beneficiará os micro-organismos benéficos mais resistentes. Adicionalmente, espera-se melhora do desempenho zootécnico causada pelo aumento da absorção de nutrientes devido à mudança no ambiente intestinal (BOELTER, 1998).

Pesquisas sobre os benefícios e a segurança da inoculação de substâncias associadas à vacina *in ovo* são promissoras, entretanto, em sua maioria, os estudos existentes não utilizam o método automatizado em larga escala, o que limita as conclusões do efeito destes produtos na rotina das empresas. Relatos de tentativas malsucedidas são comuns e atribuídas principalmente a quedas na eclosão e atrasos de nascimentos.

Diante destes fatores, foi realizado um experimento em incubatório industrial para avaliar os efeitos do uso do antimicrobiano gentamicina associado à vacinação *in ovo* sobre o rendimento de incubação, qualidade e morfofisiologia dos pintos recém-eclodidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vacinação *in ovo*

A técnica de vacinação *in ovo* tem sido considerada um dos maiores avanços na produção avícola no que se refere à imunização de frangos de corte. A primeira vacina a ser testada, via inoculação *in ovo*, foi a vacina de Marek em 1982, por Sharma e Burmester (1982). Nesse estudo, os autores inocularam nos ovos de galinhas a vacina contra Herpes Vírus de Perus (HVT, sorotipo 3), e constataram que estas aves obtiveram uma maior proteção quando desafiadas à Marek (MDV) aos três dias de idade, em comparação aos pintos vacinados após o nascimento. De acordo com a literatura, isto ocorre devido à rápida infecção dos tecidos pulmonares e sua replicação com títulos elevados dos embriões (SARMA et al., 1995). Dez anos depois, em 1992, surgiu o primeiro sistema automatizado de vacinação *in ovo*, o Inovoject®, desenvolvido pela Embrex Inc, o que possibilitou uma vacinação com distribuição mais uniforme de dosagem e redução no tempo de execução (SARMA et al., 1995; WINANS; NEWMAN, 1997; AVAKIAN et al., 1999; GIAMBRONE et al., 2001).

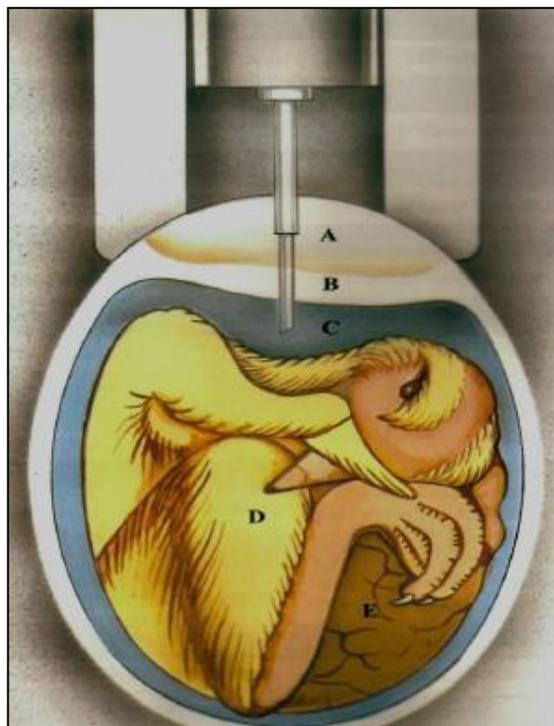
A técnica vacinação *in ovo* automática se mostrou uma alternativa mais eficiente em comparação à vacinação mecânica e subcutânea, uma vez que estas últimas necessitam de mais mão de obra, requerem mais tempo de execução, além de apresentarem menor uniformidade para distribuição das dosagens e maior incidência de erros (GILDERSLEEVE et al., 1993; GILDERSLEEVE; FLUKE, 1995; WILLIAMS, 2009; BERNADINO; DAGA, 2013). Outra característica bastante interessante é que a máquina assegura o posicionamento adequado dos ovos no momento da vacinação, pois as mesmas possuem um sistema de cabeçotes flutuantes com uma matriz de tubagem expansível, onde recebe um sopro de ar fazendo com que se tenha um ajuste individual para cada ovo, de modo que a agulha tenha uma trajetória adequada no momento da inserção (JOHNSTON et al., 1997; WILLIAMS; ZEDEK, 2010).

O procedimento de vacinação é realizado no momento da transferência dos ovos da incubadora para o nascedouro, o que acontece entre o 18º e 19º dia de incubação (SHARMA; BURMESTER, 1982). Neste momento, o embrião está iniciando a incorporação do saco vitelino na cavidade abdominal, o bico está se projetando em

direção a câmara de ar e sua cabeça encontra-se posicionada embaixo da asa (WILLIAMS, 2009; BARBOSA, 2011a).

A máquina utilizada no procedimento de vacinação *in ovo* pode acessar cinco áreas distintas no ovo no momento da vacinação: câmara de ar, cavidade alantoideana, cavidade amniótica, corpo do embrião ou saco vitelínico (Figura 1). Entretanto, alguns estudos observaram que a aplicação de algumas vacinas na câmara de ar, como é o caso da vacina de Marek, não apresentaram resultados satisfatórios quando comparados à inoculação da vacina em outros locais, como a cavidade amniótica (94,4%) e corpo do embrião (93,9%) (ISLAM et al., 2001; JOCHEMSEN; JEURISSEN, 2002; WAKENELL et al., 2002). Quando observado na prática, é mais comum nos incubatórios a inoculação da vacina no líquido amniótico ou no tecido do embrião (GILDERSLEEVE et al., 1993; UNI; FERKET, 2003; WILLIAMS, 2005). Quando injetada no líquido amniótico, a vacina é consumida oralmente antes da eclosão e se espalha rapidamente pelas vias respiratórias, vísceras e Bursa de Fabricius, promovendo, por sua vez, imunidade precoce no embrião (FERKET, 2006; SOUZA, 2008).

Figura 1- Regiões do ovo embrionado (Embrex®) para aplicação da vacina *in ovo*. A) Câmara de ar; B) Alantóide; C) Líquido Amniótico; D) Embrião; E) Saco vitelino.



Fonte: Bernardino e Daga (2013)

A vacinação *in ovo* não só modernizou a forma de como se realiza o procedimento de vacinação nas aves, como também possibilitou a utilização de outros produtos simultaneamente, tais como os promotores de crescimento, diversos nutrientes e antibióticos (GILDERSLEEVE et al., 1993; GILDERSLEEVE; FLUKE, 1995; WILLIAMS, 2009; BERNADINO; DAGA, 2013). A associação de antibiótico ao processo de vacinação *in ovo* têm sido uma prática rotineira em alguns incubatórios industriais, porém os efeitos deste procedimento necessitam de maiores estudos científicos.

2.2. Antibióticos

2.2.1. Definição e características

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os antibióticos podem ser definidos como uma substância de origem sintética, semissintética ou natural, que em concentrações reduzidas eliminam ou inibem o crescimento de micro-organismos, podendo causar ou não algum dano ao organismo hospedeiro (EMEA, 1999). Segundo Tavares (1990), essas substâncias podem ser classificadas de acordo com os seus mecanismos de ação, espectro de ação, processo de obtenção, ação biológica ou estrutura química.

Dentre os mecanismos de ação, os antibióticos podem atuar por inibição da síntese da parede celular ou da replicação cromossômica, resultando na degeneração do DNA bacteriano. Além disso, atuam na intervenção do processo de respiração celular e na síntese proteica, ocasionando desorganização da membrana celular e redução do crescimento e da célula bacteriana, respectivamente. Outro mecanismo de ação seria alterações na permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática bacteriana, provocando perdas de elementos relevantes e entrada de substâncias prejudiciais. (CHAMBRES, 2005; CARVALHAL et al., 2008).

Em relação ao espectro de ação, os antibióticos podem ser classificados em gram-negativos, gram-positivos e amplo espectro (atuam no combate das bactérias gram-positivas e gram-negativas) (CARVALHAL et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010; MOTA et al., 2010; TORTORA et al., 2012).

Quanto ao processo de obtenção, podem ser naturais (obtidos por fermentação), biossintéticos (adquiridos por um precursor de fermentação), sintobióticos (adquiridos exclusivamente por síntese), ou semissintéticos (obtidos por fermentação e síntese). (GUIMARÃES et al., 2010; MOTA et al., 2010).

Pesquisadores como Silva (1999), Butolo (2002) e Mota et al. (2010) descreveram que os antibióticos podem ser classificados, de acordo com a ação biológica, em bacteriostáticos (impedem o crescimento e reprodução do micro-organismo) ou bactericidas (causam a morte dos micro-organismos).

Quanto à estrutura química, tais substâncias podem ser provenientes de açúcar (macrolídeos [eritromicina], aminoglicosídeos [estreptomicina, neomicina, gentamicina, canamicina, amicacina], sinergistas [virginiamicina], lincosaminas [lincomicina, clindamicina], glicosídeos [novobiocina], entre outros; derivados de acetatos e propionatos (poliênicos [nistatina, anfotericina B], esteroides [ácido fusídico], aromáticos [tetraciclina, rifamicinas], derivados do crisano [griseofulvina]), derivados de aminoácidos (β -lactâmicos [penicilinas, cegolosporinas], derivados de aminopropanodiol [clorofenicol], glicopeptídeos [vancomicina], polipeptídicos [polimixinas, bacitracina] e mono-peptídicos [cicloserina]) (TAVARES, 1990; BUTOLO, 2002; FERNANDES, 2006; GUIMARÃES et al., 2010).

Outra classificação utilizada para os antibióticos é a de Colusi (1993), que é baseada na dosagem, a qual pode ser terapêutica, profilática ou promotora de crescimento animal. A terapêutica seria a dosagem necessária para o tratamento de doenças diagnosticadas em que se usam uma dosagem acima da concentração inibitória mínima (CIM) para que a patologia seja rapidamente controlada. Geralmente na terapêutica é realizado o uso associado de diferentes antibióticos para tentar potencializar o espectro de ação.

Na dosagem profilática são utilizados 50% ou menos que a dosagem terapêutica, a qual deve atingir o organismo animal de forma plasmática ou tissular, em que a CIM leva em conta a biodisponibilidade de cada droga. Caso a CIM não for alcançada, poderá ser observada a inativação do fármaco futuro e a seleção de flora resistente por subdosagem. Para promotores de crescimento realizam-se a dosagem inferior a CIM, com a finalidade de conter o crescimento acentuado e indesejado de determinadas populações microbianas patogênicas, reduzir a inflamação do epitélio intestinal, evitar a

ocorrência de diarreias e reduzir a secreção de substâncias tóxicas pelos micro-organismos. Sendo assim, esta dosagem pode causar uma seleção do ambiente intestinal, e com isso a promoção de uma melhora na absorção de nutrientes, resultando no maior crescimento do indivíduo (COLUSI, 1993; BENÍCIO, 1996; SOARES, 1996; BRUMANO; GATTÁS, 2009; ROSTAGNO, 2011).

2.2.2. Uso de antibióticos como promotor de crescimento animal

A utilização dos antimicrobianos como promotor de crescimento animal teve início em 1940, com a adição de resíduos de fermentação provenientes da produção de tetraciclina na ração de galinhas como fonte de vitamina B12. Na ocasião, os autores observaram que as aves que receberam ração com resíduos de tetraciclina apresentaram maior ganho de peso em relação ao tratamento controle, concluindo-se que este ganho de peso foi causado pela ação da tetraciclina residual e não pelo conteúdo vitamínico na ração (STOKSTAD; JUKES, 1949; PEDERSEN; EDQVIST, 2001). Esta prática alimentar de fazer dosagens sub-terapêuticas de antimicrobianos na produção animal possibilitou uma melhoria na produção de ovos e desenvolvimento dos frangos (PEDERSEN; EDQVIST, 2001).

O mecanismo de ação das substâncias utilizadas como promotores de crescimento animal, como é o caso dos antibióticos, ainda não está totalmente elucidada pela literatura, mas acredita-se na ocorrência da diminuição de bactérias sensíveis à substância administrada, no qual beneficiará os micro-organismos mais resistentes. Além dessa seleção ambiental, há uma diminuição na quantidade de toxinas produzidas pelas bactérias a partir dos aminoácidos da ração, tornando estes aminoácidos mais disponíveis para os animais, além de uma notável melhora da absorção de monossacarídeos, vitaminas e minerais devido à mudança no ambiente intestinal (BOELTER, 1998).

Na tabela 1 encontra-se a relação dos antibióticos utilizados como promotores de crescimento e as espécies que utilizam estas substâncias.

Tabela 1. Relação dos antibióticos utilizados como promotores de crescimento

Medicamento	Espécie
Tetraciclina	Aves, suínos, peixes e bovinos
Clortetraciclina	Aves
Oxitetraciclina	Aves e peixes
Penicilina	Bovinos, ovinos, caprinos e suínos
Ampicilina	Aves
Estreptomicina	Bovinos
Diidroestreptomicina	Aves, suínos e bovinos
Espectomicina	Aves e suínos
Kitasamina	Aves e suínos
Espiramicina	Aves, suínos e bovinos
Eritromicina	Aves, suínos e bovinos
Tilosina	Aves, suínos e bovinos
Virginiamicina	Aves, suínos e bovinos
Lincomicina	Aves, suínos e bovinos
Florfenicol	Suínos
Nistatina	Aves e bovinos
Griseofulvina	Bovinos
Higromicina B	Aves e suínos
Monensina	Aves e bovinos
Novobiocina	Aves
Destomicina	Aves e suínos
Flavomicina	Aves, suínos e bovinos
Tiamulina	Aves e suínos
Salinomicina	Aves e suínos
Ceftiofur	Suínos
Bacitracina	Aves
Oleandomicina	Aves
Sulfametazina	Peixes

Fonte: Adaptado de BOELTER (1998).

Spinosa et al. (2002) complementaram esta relação de substâncias citando o uso de avilamicina, para aves; colistina, para aves, suínos e bovinos; enramicina, para aves e suínos; lasalocida, para bovinos; nitrovin e olaquinox, ambos para aves, suínos e bovinos.

O modo de administração dos promotores de crescimento é variável, podendo os mesmos serem adicionados continuamente às rações e/ou à água para consumo ou como medida profilática para doenças específicas e para determinados períodos em que haja

necessidade de controle de doenças. As dosagens destas substâncias variam de acordo com a espécie animal, e dependendo da forma de apresentação e administração dos antimicrobianos, podem ser usadas gramas por toneladas de ração (BOELTER, 1998; SPINOSA et al., 2002).

Algumas substâncias são proibidas como promotores de crescimento em animais de produção, pois além de serem extremamente tóxicas, podem ter potencial carcinogênico (BOELTER, 1998; PEDERSEN; EDQVIST, 2001), causar resistência bacteriana em seres humanos (VAN DEN BOGGARD et al., 2000; CASEWELL et al., 2003), deixam resíduos na carne (MCDONALD; WANG 2011; HASAN et al., 2011; KHALIL et al., 2012) efeitos nefrotóxicos (SINGROHA et al., 2012; TAVAKKOLI et al., 2014) e alterações no desenvolvimento (SINGROHA et al., 2013; TAVAKKOLI et al., 2013; TAVAKKOLI et al., 2014).

A legislação brasileira proíbe a fabricação, comercialização, importação e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, das rações e aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona (BRASIL, 1998); como há também medicamentos veterinários que são proibidos para o uso como promotores de crescimento, sendo eles: dietilestilbestrol, zeranol, trembolona, hexestrol, dienestrol (BRASIL, 1999).

A proibição de promotores de crescimento para animais de produção na União Europeia ocorreu primeiramente na Suécia em 1986. Logo após houve a proibição da avoparcina em 1997 (WHO, 1997), e de bacitracina, a espiramicina, a tilosina e a virginiamicina em 1999. Após estas proibições, houve uma diminuição na aquisição de enterococos resistentes à vancomicina isolada em humanos. Esta resistência pode estar relacionada ao aumento do uso de vancomicina para o tratamento de estafilococos resistentes à meticilina (WHO, 2000; CASEWELL et al., 2003). Contudo, Casewell et al. (2003), descreveram que a proibição dos promotores de crescimento revelou que estes agentes tinham uma atividade profilática importante e a sua retirada está agora associada a uma deterioração da saúde animal, incluindo aumento de diarreia, perda de peso e mortalidade devido a *Escherichia coli* e *Lawsonia intracellularis* no início do desmame de suínos e enterite necrótica clostridial em frangos de corte. O resultado, diretamente atribuído a estas infecções, é o aumento do uso de antimicrobianos terapêuticos em animais de produção, incluindo o da tetraciclina, aminoglicosídeos,

trimetoprim / sulfonamida, macrólidos e lincosamidas, todos eles de importância direta na medicina humana. Segundo os autores, os benefícios teóricos e políticos da proibição generalizada dos promotores de crescimento precisam ser mais cuidadosamente ponderados em relação às consequências adversas que são cada vez mais aparentes.

Outra exigência a ser considerada para o uso de antibióticos é em relação ao prazo de retirada da utilização dos antimicrobianos no período anterior ao abate, com o intuito de prevenir resíduos nos produtos de origem animal (WHO, 1997; SPINOSA et al., 2002), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Prazo para a retirada dos antibióticos nos animais antes da obtenção dos produtos.

(Continua)

Medicamento	Espécie	Prazo de retirada
Sulfonamidas	Bovinos	4 a 10 dias
Sulfonamidas	Suínos	4 dias
Amoxicilina	Bovinos	Carne: 25 dias/ Leite: 80 horas
Ampicilina	Bovinos	Carne: 6 dias/ Leite: 48 horas
Penicilina G benzatina	Bovinos	Carne: 14 a 30 dias/ Leite: 96 horas
Penicilina G procaína	Bovinos	Carne: 5 a 10 dias/ Leite: 48 a 72 horas
Penicilina G procaína	Suínos	5 dias
Penicilina G procaína	Ovinos e caprinos	3 dias
Cefazolina	Bovinos	Carne: 30 dias
Aminoglicosídeos	Bovinos	Carne: 30 dias/ Leite: 96 horas
Oxitetraciclina	Bovinos	Carne: 18 a 22 dias/ Leite: 60 a 72 horas
Oxitetraciclina (longa duração)	Bovinos	Carne: 28 a 48 dias
Florfenicol	Bovinos	36 dias
Eritromicina	Bovinos	Carne: 14 dias/ Leite: 72 horas

Fonte: Adaptado de SPINOSA et al. (2002).

Tabela 2. Prazo para a retirada dos antibióticos nos animais antes da obtenção dos produtos.
(Continuação)

Medicamento	Espécie	Prazo de retirada
Eritromicina	Suínos	7 dias
Eritromicina	Aves	Carne: 1 a 2 dias
Tilosina	Bovinos	Carne: 21 dias/ Leite: 96 horas
Tilosina	Suínos	4 dias
Estreptomicina	Bovinos	10 dias
Espectinomicina	Suínos	21 dias
Lincomicina	Suínos	48 horas
Monensina	Aves	Carne: 3 dias
Tiamulina	Aves	12 dias

Fonte: Adaptado de SPINOSA et al. (2002).

2.2.3. Uso de antibióticos *in ovo*

A utilização de antibióticos no período de desenvolvimento embrionário (*in ovo*) tem se tornado uma prática cada vez mais utilizada na cadeia avícola, uma vez que esse sistema impede a entrada de patógenos no organismo, e conseqüentemente, contribui de maneira significativa para o crescimento e desempenho das aves (COLOMER-LLUCH et al., 2011, SAPKOTA et al., 2011).

O primeiro relato de inoculação de antimicrobianos *in ovo* ocorreu antes do aperfeiçoamento da técnica de vacinação *in ovo*, em 1967, por Smith e Hoekstra. Os autores injetaram tilosina na fase de desenvolvimento embrionário com o intuito de erradicar a infecção por *Mycoplasma sp.* e obtiveram resultados bastante satisfatórios. Desde então, pesquisadores têm sugerido o uso de diferentes compostos antibacterianos para melhorar o desempenho de diferentes espécies de aves, incluindo frangos jovens (COLOMER-LLUCH et al., 2011; SAPKOTA et al., 2011; BANERJEE et al., 2014; TAVAKKOLI et al., 2014).

Paralelo ao tipo de antibiótico inoculado, a dosagem utilizada também pode influenciar o resultado, como é o caso da tilosina, que pode ser tóxica para ovos se usada em altas doses (NASCIMENTO et al., 2005). Além disso, o local de aplicação do antibiótico também deve ser levado em consideração, caso contrário, a inoculação pode causar efeitos indesejados aos embriões. McCapes et al. (1976) e Nascimento et al. (2005) verificaram aumento da mortalidade de embriões inoculados na região da câmara

de ar. Mossallanejad et al. (2014) testaram locais distintos para a injeção *in ovo* da solução de trimetoprim / sulfametoxazol em perdizes e concluíram ser o saco vitelino o local mais indicado para aplicação de antimicrobianos. Porém, nos incubatórios industriais, como o uso de antibiótico é realizado em conjunto com a vacina *in ovo*, o local de inoculação, dependendo do momento que é realizado, restringe-se ao líquido amniótico ou ao tecido do embrião.

Tavakkoli et al. (2014), avaliaram o uso de florfenicol *in ovo*, e frente à ausência de lesões nos tecidos, tanto macroscopicamente quanto microscopicamente, concluíram que o antibiótico não é tóxico para o embrião de galinha. Assim, os autores afirmaram que a injeção de florfenicol pode ser usada para eliminar patógenos e prevenir a transmissão de micro-organismos sem qualquer efeito adverso. Todavia, Khalil et al. (2012) observaram a presença de resíduos de florfenicol no fígado de frangos de corte e na histopatologia houve alterações no tecido hepático dos animais tratados com 60mg/kg de dose terapêutica.

Os efeitos antagônicos e a presença de resíduos nos tecidos causados pelo uso destes medicamentos ainda são de grande preocupação, pois a literatura que descreva o efeito dos antibióticos nos embriões de aves é escassa, e por isso, ainda precisam ser realizados estudos adicionais para determinar a segurança, toxicidade e potencial teratogênico dos antibióticos (MOSSALLANEJAD et al., 2014; TAVAKKOLI et al., 2014).

Alguns antibióticos como a tilosina e gentamicina se mostraram eficazes na redução da transmissão de infecção nos ovos (NASCIMENTO et al., 2005; MOSSALLANEJAD et al., 2014). A tilosina é utilizada devido a sua eficácia contra *Mycoplasma sp.* e a gentamicina, devido a sua ação de amplo espectro contra as bactérias e baixa toxicidade para as células hospedeiras (WHO, 1995).

A gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo constituído por amino-açúcar unidos por ligações glicosídicas. Este antimicrobiano é produzido pelos fungos do gênero *Microniospora sp.* e *Streptomyces sp.* (BROWN, 1991; ALMENARA et al., 2008). É classificado de amplo espectro sendo utilizado contra micro-organismos aeróbios como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, e *Staphylococcus aureus* (ABU-BASHA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010).

Este aminoglicosídeo tem ação bactericida e vincula-se de forma irreversível a proteína S12 da subunidade do ribossomo 30S bacteriano, interferindo nos vários mecanismos de leitura do RNAm durante a tradução e assim impedindo a síntese proteica, pois provoca a incorporação de um aminoácido incorreto (JAWETZ, 1984; BROWN, 1991; BARBOSA et al., 2001; ALMENARA et al., 2008).

A atividade da gentamicina é mais eficaz em pH levemente alcalino, em torno de 7,4, onde a entrada no organismo bacteriano é facilitada (GUIMARÃES et al., 2010). Quanto a absorção, a mesma não é absorvida pelo trato gastrointestinal quando administrada por via oral (BROWN, 1991; ABU-BASHA et al., 2007), porém é rapidamente absorvida quando administrada por via intramuscular e subcutânea (ABU-BASHA et al., 2007) e sua eliminação ocorre pelos rins (SPOO; RIVIERE, 2003; ALMENARA et al., 2008).

A gentamicina deve ser utilizada com cautela já que seu uso contínuo pode causar intoxicações no sistema auditivo e no sistema renal (OLIVEIRA et al., 2000; PATRICK, 2005; ALMENARA et al., 2008; DURANTE-MANGONI et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010). Saleemi et al. (2009), investigou os efeitos patológicos da gentamicina em aves. O autor administrou níveis de gentamicina via intramuscular entre 0 a 180mg/kg nos pintinhos de 1 dia. Neste estudo foram observados efeitos como: diminuição do consumo alimentar, aumento de ingestão de água, excremento aquoso solto e redução dos pesos corporais quando doses a partir de 30mg/kg foram administradas. Outros efeitos observados em pintos que receberam 40 mg e 50 mg/kg de gentamicina foram o aumento da mortalidade (cerca de 20%), fígado congestionado e hemorragias na superfície deste órgão, além de necrose tubular aguda nos rins.

Magenis (2015) relatou que na utilização *in ovo*, a gentamicina é administrada durante a transferência junto com a vacina de Marek, com o objetivo profilático contra infecções durante o alojamento, para aumentar a imunidade e diminuir a mortalidade principalmente nas fases iniciais de crescimento dos frangos. A autora pesquisou a utilização *in ovo* da substância aos 18 dias de incubação em uma dose de 0,22 mg/ovo de sulfato de gentamicina e comparou com outro tratamento onde só foi utilizado a vacina de Marek. Foram avaliados a condição corpórea, peso, comportamento, postura, respiração, apetite, excreta, penas, e parâmetros laboratoriais que compreenderam análises bioquímicas e hemograma completo dos frangos durante a criação. O estudo

teve como conclusão que a administração conjunta de gentamicina e vacina de Marek não causa alterações físicas e clínicas nos frangos. Entretanto, foi observado que a gentamicina tende a se acumular no fígado e principalmente no rim. Além desses órgãos, essa substância proporciona concentrações terapêuticas no baço, pulmões, linfa, bile e líquido sinovial. Porém, considerando-se o período de abate de frangos de corte no Brasil, entre 35 e 42 dias, a utilização da gentamicina *in ovo* na dose proposta no estudo de Magenis (2015) não ocasionou a presença de resíduos significativos nos tecidos ao abate.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em duas fases experimentais:

Primeira fase: Efeito da inoculação de antibiótico *in ovo* sobre o rendimento de incubação.

Segunda fase: Efeito da inoculação de antibiótico *in ovo* sobre a qualidade e parâmetros fisiológicos de pintos recém-eclodidos.

Os protocolos experimentais utilizados estão de acordo com as diretrizes da Universidade Federal da Bahia e do Comitê de Ética do Uso de Animais – CEUA.

3.1. Primeira fase experimental

3.1.1. Local

A primeira fase experimental foi conduzida no incubatório da Granja Asa Branca, localizada no Município de São Cristovão/SE, e a segunda fase, no Núcleo de Incubação Artificial de Ovos (NUPIA – UFBA), na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade Federal da Bahia – UFBA, durante o período de janeiro a março de 2017.

3.1.2. Ovos

Foram adquiridos 1536 ovos de matrizes pesadas da linhagem Cobb®, com idade de 35 semanas, originários do matrizeiro da Granja Asa Branca. Utilizaram-se ovos de dois galpões, provenientes da segunda coleta do mesmo dia. Imediatamente

após a coleta, ainda na granja, os ovos destinados à incubação foram desinfetados através do método de fumigação com paraformaldeído concentração de 10g/m³, e em seguida, transportados para o incubatório em veículo climatizado a uma temperatura abaixo do ponto zero fisiológico (aproximadamente 21 a 24°C).

No incubatório foi realizada a seleção dos ovos, eliminando aqueles que eram considerados não incubáveis (sujos, trincados, quebrados, pequenos e deformados). Em seguida, os ovos incubáveis foram colocados em bandejas de incubação com capacidade para 96 ovos cada. Trinta bandejas foram selecionadas e identificadas ao acaso, sendo 15 bandejas identificadas como tratamento V (Vacinação *in ovo*) e 15 bandejas identificadas como tratamento P (vacinação *in ovo* + antibiótico). Uma bandeja de cada tratamento foi selecionada ao acaso para as análises dos ovos, e as demais foram destinadas para a incubação. Os ovos dos respectivos tratamentos foram armazenados por 3 dias em uma sala destinada para este fim, com médias de temperatura e umidade do ar de 20°C e 80% respectivamente (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição dos ovos incubáveis de acordo com os tratamentos. Tratamento V (Vacina - etiqueta Azul) correspondente aos embriões que receberam vacinação *in ovo* contra a doença de Marek.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.2.1. Características dos ovos

As variáveis analisadas nos ovos foram: peso específico, peso absoluto e de seus componentes e espessura da casca. Para estas análises, foram selecionados 40 ovos de uma bandeja por tratamento. Tais análises foram realizadas com o objetivo de averiguar a homogeneidade dos ovos incubados em ambos os tratamentos e assegurar que as características estruturais eram compatíveis com a idade da matriz.

3.1.2.2. Peso específico dos ovos

O peso específico dos ovos foi determinado utilizando-se cinco soluções com diferentes densidades, de acordo com Olsson (1934). Para isso, cinco baldes graduados com 10 L de água em temperatura ambiente receberam cloreto de sódio, em quantidades suficientes para se obter soluções com densidades de 1.070, 1.075, 1.080, 1.085 e 1.090. As densidades das soluções foram confirmadas com um densímetro de massa específica (Incoterm® 1,000/1,100:0,001) e monitoradas a cada 10 minutos. Os dados de peso específico foram registrados em números absolutos e em termos percentuais, de acordo com as quantidades de ovos obtidas em cada densidade em relação ao total de ovos da amostra (Figura 3).

Figura 3 – Avaliação do peso específico de acordo com cada densidade.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.2.3. Peso dos ovos e seus componentes

Os ovos e seus componentes (gema, albúmen e casca) foram pesados em uma balança analítica digital (0,001g) marca Mater® e modelo AY200. Após a quebra dos ovos, os componentes foram separados manualmente e pesados individualmente, de modo que na separação da gema e da clara foi utilizado papel absorvente para remover os resíduos. As cascas foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente por cerca de 24h. O peso do albúmen foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Peso do albúmen} = \text{Peso do ovo inteiro} - (\text{Peso da gema} + \text{Peso da casca})$$

Figura 4 - Peso do ovo e seus componentes.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.2.4. Espessura de casca

A espessura da casca foi aferida com o auxílio de um micrômetro digital (Digimess® resolução 0.001mm, 0-25mm) nas regiões apical, equatorial e basal, para que fosse obtida uma média por ovo. Os ovos utilizados nesta análise foram os mesmos utilizados nas análises anteriores (Figura 5).

Figura 5 – Medição da espessura da casca.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.3. Pré-incubação e incubação dos ovos

Logo após o período de armazenamento e antes do início da incubação, os ovos foram submetidos a um período de pré-aquecimento por 5 horas em uma sala com temperatura média de 28°C e umidade relativa (UR) média de 55%. Após este período e antes da entrada dos ovos na incubadora, cada bandeja com 96 ovos foi pesada de acordo com os tratamentos.

Para a incubação foi utilizada uma máquina incubadora modelo CASP® CM 125 HD, de estágio múltiplo, com capacidade para 124.416 ovos e controle digital de temperatura, umidade, ventilação e viragem. A máquina foi regulada para manter a temperatura do bulbo seco em 37,8°C (100,04°F) e temperatura do bulbo úmido em 28,9°C (84 °F).

A distribuição das bandejas dentro da incubadora ocorreu conforme a imagem (figura 6). Foi preconizado que todas as bandejas de todos os tratamentos fossem distribuídas aleatoriamente somente do lado esquerdo da máquina para que todas as bandejas recebessem as mesmas condições ambientais. As bandejas dos tratamentos foram colocadas na parte superior, no meio, e inferior, desprezando as duas primeiras e as duas últimas fileiras da máquina. Os demais espaços da máquina foram preenchidos com ovos que não fizeram parte do experimento.

Figura 6 – Distribuição das bandejas dentro da máquina incubadora.



Fonte: Arquivo pessoal.

Para o controle da temperatura embrionária, entre o 10^o e o 18^o dia de incubação, foram realizadas mensurações diárias da temperatura da casca dos ovos, após a confirmação da fertilidade dos mesmos por meio de ovoscopia, com o auxílio de um termômetro (Thermoscan® Braun modelo IRT 4520). Os ovos utilizados nesse procedimento, foram os localizados no centro das bandejas. As leituras foram realizadas no mesmo horário, posicionando o termômetro na região equatorial de acordo com a figura abaixo (Figura 7).

Figura 7 – Mensuração da temperatura da casca do ovo.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.4. Ovos inférteis e mortalidade embrionária observada na ovoscopia

No 12º dia de incubação, todos os ovos foram colocados em um ovoscópio para confirmação da fertilidade. Os ovos claros foram retirados e quebrados, sendo identificados os ovos inférteis e aqueles com embriões mortos. Os dados foram registrados para posteriormente serem incluídos na análise final de mortalidade embrionária e fertilidade.

3.1.5. Vacinação *in ovo*

No 18º dia de incubação, todas as bandejas foram novamente pesadas, e depois foram dirigidas para a sala de vacinação *in ovo*. Nas bandejas identificadas como tratamento V, o processo de vacinação *in ovo* ocorreu conforme rotina normal do incubatório (Figura 8) e nas bandejas identificadas como tratamento P foi adicionado antibiótico. Foi utilizada uma máquina de vacinação *in ovo* (Embrex® Inc NO. IOM. 007) de porte médio sem ovoscópio. Antes de iniciar a vacinação *in ovo*, a máquina foi limpa e desinfetada em quatro etapas diferentes: na primeira etapa, foi usado com detergente neutro para remoção de resíduos, e em seguida, o desinfetante; posteriormente, a máquina foi enxaguada com água e álcool, e por último, com água destilada para remover qualquer resíduo dos produtos utilizados. Após o processo de limpeza e desinfecção, foi realizado o teste das injetoras, para garantir que todos os bicos de injeção estivessem funcionando normalmente.

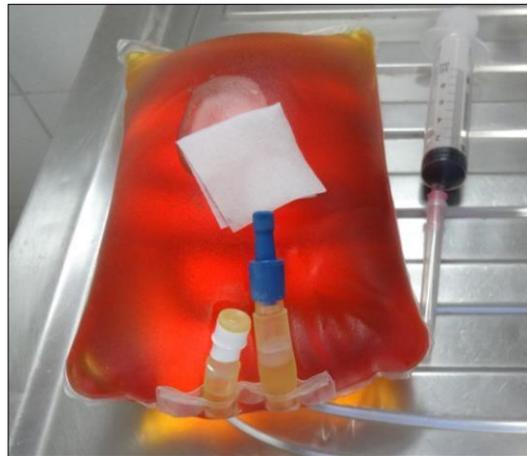
Figura 8 – Teste de injeção realizado por 15 minutos.



Fonte: Arquivo pessoal.

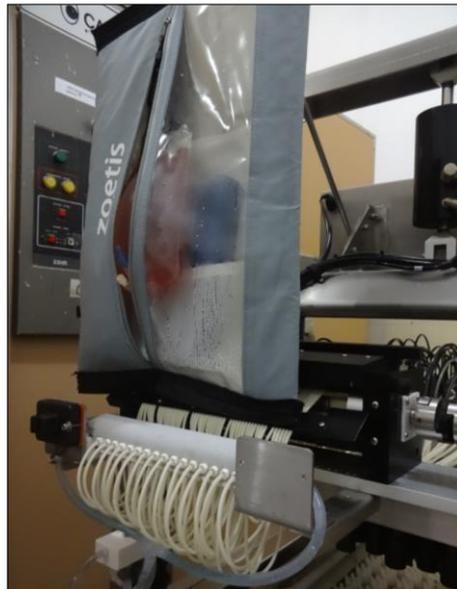
Após o teste de injeção, as vacinas foram preparadas com um diluente especial de 1L da marca Biovet® composto por soluções de minerais e açúcar. As vacinas foram armazenadas à temperatura de -180°C em nitrogênio líquido. As ampolas das vacinas, antes de serem injetadas no diluente, ficaram em banho-maria até atingirem a temperatura ambiente. Foram utilizadas 8 ampolas de Vacina de Marek (HVT) associada com Gumboro da Biovet®. Ao atingir temperatura ambiente, as vacinas foram injetadas no diluente com uma seringa e em seguida transportadas para a sala de vacinação *in ovo* em uma bolsa térmica contendo gelo (Figura 9 e 10).

Figura 9 – Preparação da vacina.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 – Bolsa térmica contendo gelo para preservação da qualidade da vacina.



Fonte: Arquivo pessoal.

Ao iniciar a vacinação, foram desprezados os primeiros jatos, com o intuito de eliminar qualquer resíduo de produtos na máquina, a fim de impedir a contaminação nos ovos a serem vacinados. Através de uma agulha acoplada em cada bocal injetor, cada ovo recebeu a solução (Diluyente + Vacina) em quantidade de 0,05 ml/dose, a qual foi programada para ser injetada diretamente na cavidade amniótica (Figura 11).

Figura 11 – Processo de vacinação in ovo.



Fonte: Arquivo pessoal.

Logo após o processo de vacinação, os ovos foram transferidos para bandejas de eclosão identificadas com o tratamento V. Os ovos das bandejas de incubação que foram identificados com o tratamento P receberam a adição do antimicrobiano gentamicina (Gentatec®) da empresa CHEMITEC AGRO-VETERINÁRIA LTDA. Foi administrada a dose de 0,20mg/ovo, inserida na solução (Diluyente + Vacina + Antibiótico), no qual foi retirada a mesma quantidade de diluyente da bolsa antes de inserir a solução e assim substituir o volume. Da mesma forma que o tratamento V, a solução do tratamento P foi programada para ser injetada diretamente na cavidade amniótica na quantidade de 0,05ml em cada ovo.

Após o processo de inoculação, um ovo por bandeja foi coletado em todos os tratamentos para averiguação do estágio de desenvolvimento embrionário (entre 18 e 19 dias). Também foi possível confirmar que a inoculação estava corretamente depositada no fluido amniótico e que não houve punção nos tecidos.

As bandejas permaneceram na sala de vacinação por igual período, onde foram transferidas para as bandejas de eclosão previamente identificadas (Figura 12).

Figura 12 – Transferência dos ovos vacinados das bandejas de incubação para as bandejas de eclosão.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.6. Transferência para o nascedouro

No nascedouro, as bandejas de eclosão foram distribuídas aleatoriamente conforme os tratamentos. Os ovos foram colocados em um nascedouro (CASP® 125 HT 21), com capacidade para 20.736 ovos. O termostato do nascedouro foi programado para manter a temperatura do bulbo seco em 36,8°C (98,2°F) e a temperatura do bulbo úmido em 25,8°C (78,4°F), correspondendo ao teor de UR em 65%. A temperatura média da sala de nascedouro foi mantida a 24,9°C e a UR em 67,7%.

3.1.7. Avaliação de janela de nascimento

O momento em que os ovos foram colocados na incubadora foi denominado hora zero. A partir de 462 horas de incubação, com intervalo de 6 em 6 horas, os pintos nascidos em cada bandeja foram registrados para posterior avaliação da janela de nascimento, que compreendeu o momento entre os primeiros e os últimos pintos nascidos (Figura 13).

Figura 13 - Contagem dos pintinhos para avaliação de janela de nascimento.



Fonte: Arquivo pessoal

3.1.8. Nascimento dos pintos

A retirada dos pintos nos nascedouros ocorreu com 516 horas (21 dias) de incubação. No final da incubação, as aves foram colocadas em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e todas foram encaminhadas para sala de pintos, onde foi contabilizado o total de pintos mortos, o escore de umbigo, presença de canela vermelha, ponto vermelho no bico, desidratado, balofo, aleijado, caixa craniana aberta e cavidade abdominal aberta. Após a contagem de pintos nascidos, foram retirados ao acaso uma amostra de 28 pintos por tratamento (2 pintos por bandeja) para as análises posteriores.

3.1.9. Análises de rendimento de incubação – primeira fase experimental

3.1.9.1. Perda de peso dos ovos durante o período de incubação

A perda de peso dos ovos foi determinada por pesagem individual de todas as bandejas (menos a tara) de cada tratamento antes das mesmas serem colocadas na incubadora e no momento em que foram transferidas para os nascedouros. O percentual de perda de peso dos ovos foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Perda de peso} = \frac{(\text{Peso dos ovos na incubação} - \text{Peso dos ovos na transferência}) \times 100}{\text{Peso dos ovos no início da incubação}}$$

3.1.9.2. Mortalidade embrionária e fertilidade (%)

O número de ovos não eclodidos de cada máquina foi registrado, sendo os mesmos examinados para se determinar o percentual de ovos inférteis, ovos bicados (pintos que não conseguiram eclodir) e a fase em que ocorreu a mortalidade embrionária, incluindo a observação sobre mau-posicionamento e anormalidades morfológicas e conformacionais, de acordo com Barbosa (2011). A caracterização dos ovos não eclodidos foi a seguinte:

- Ovos inférteis;
- Ovos com embriões mortos no início da incubação (0 a 7 dias);
- Ovos com embriões mortos entre 8 a 18 dias de incubação;
- Ovos com embriões que morreram entre 19 a 21 dias;
- Ovos bicados com embriões vivos ou mortos;
- Ovos contaminados (nos quais os embriões morreram devido à contaminação bacteriana ou fúngica);
- Ovos desidratados (devido a trincas da casca ocorridas durante o processo).

Após esta análise, os dados de mortalidade inicial e infertilidade obtidos aos 12 dias de incubação na ovoscopia foram somados, e então, o percentual total de mortalidade embrionária foi calculado sobre o número de ovos férteis. A fertilidade do lote foi obtida através da fórmula (100% - % de ovos inférteis). As alterações observadas nos embriões mortos, como por exemplo, mal posicionamento, caixa craniana aberta, duplicação de membros posteriores e inferiores foram registradas.

3.1.9.3. Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis (%)

Os ovos inférteis foram identificados no momento da ovoscopia e no embriodiagnóstico. A taxa de eclosão em relação ao número de ovos férteis foi determinada dividindo-se o número total de pintos nascidos pelo número de ovos férteis, expressa em percentual.

4.1. Segunda fase experimental

4.1.1. Variáveis Analisadas

4.1.1.1. Peso dos pintos no momento da eclosão

Os pintos eclodidos foram colocados em caixas devidamente identificadas, de acordo com os tratamentos e repetições. Dois pintos de cada caixa (repetição por tratamento) foram selecionados aleatoriamente e pesados individualmente em balança eletrônica, com sensibilidade de 0,001kg (Toledo® 9094) para obtenção do peso médio.

4.1.1.2. Comprimento do pintinho (cm)

Todos os pintinhos de cada tratamento foram mensurados por meio de uma régua, considerando-se o comprimento da ponta do bico até o dedo do membro inferior direito (a escolha do membro inferior é de acordo com o avaliador, portanto, todos os animais tiveram as medidas pela perna esquerda) desconsiderando a unha (HILL, 2001) (Figura 15).

Figura 14 – Comprimento de pintinho.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.1.1.3. Escore de umbigo

Os pintinhos de cada tratamento foram classificados quanto à cicatrização do umbigo de acordo com Tona et al. (2003), onde receberam os seguintes escores: escore 1- umbigo fechado e área do umbigo limpa; escore 2- botão negro até 2 mm no umbigo ou presença de fio negro; escore 3- botão negro maior que 2 mm ou umbigo aberto (Figura 15).

Figura 15 - Escore de umbigo. Ordem decrescente de qualidade.



Fonte: provimi.magzmaker.com

4.1.1.4. Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia

Para avaliar o status fisiológico dos pintos de um dia, as mesmas amostras de 28 pintos por tratamento foram utilizadas. Os pintinhos foram eutanasiados por deslocamento cervical e as amostras de sangue coletadas. Imediatamente após a coleta, para a separação de plasma, as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos tipo Vacutaner® heparinizados. Em seguida as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 3000rpm. As alíquotas com plasma foram transferidas através de micropipetas para microtubos devidamente identificados de acordo com os tratamentos e foram conservadas a -20°C até ser iniciado o processamento das amostras.

As determinações de glicose¹, lactato², e ácido úrico³ foram realizadas em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca GlobalTechnology®, utilizando-se kits comerciais em comprimento de onda apropriados.

¹ Glicose K082. Biolclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

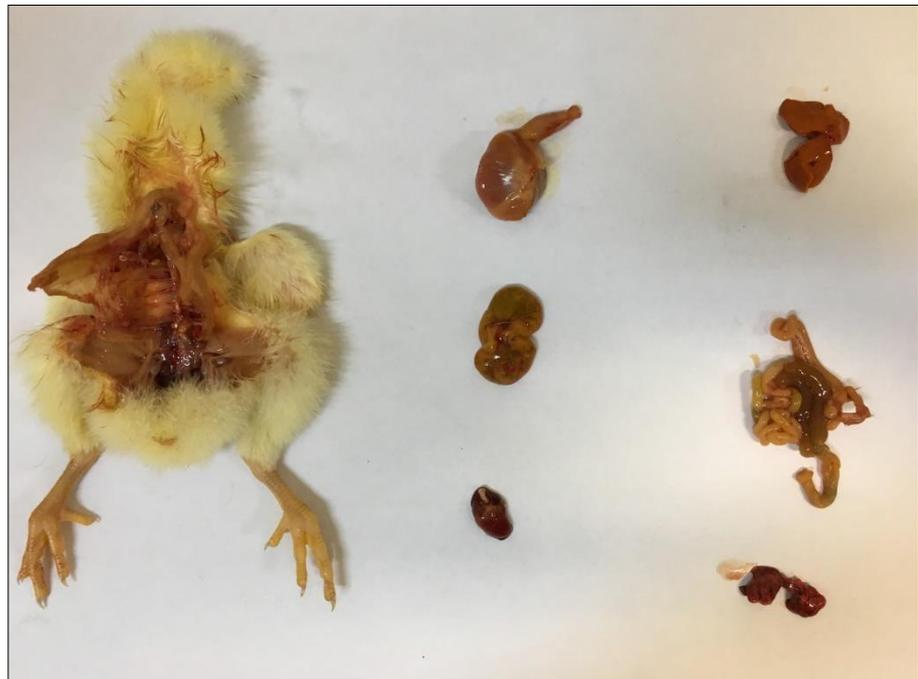
² Lactato K084. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: UV enzimático.

³ Ácido úrico K139. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

4.1.1.5. Peso dos órgãos e Peso do pinto sem o saco vitelino

Os mesmos pintos que foram amostrados para análises sanguíneas, tiveram seus órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago, intestinos, bursa, baço e saco vitelino) coletados para que pudessem ser pesados individualmente em balança analítica de 0,001g (Shimadzu AY-220) (Figura 16). A abertura da cavidade abdominal se iniciou pelo orifício umbilical com exposição de todos os órgãos. Inicialmente retirou-se o saco residual da gema. Os órgãos abdominais foram retirados em conjunto e depois coletados o fígado, o proventrículo, moela e os intestinos. O coração também foi coletado, finalizando-se com a retirada dos pulmões e bursa. Esses órgãos tiveram seus pesos obtidos em gramas (peso absoluto) e em relação ao peso do corpo sem o saco vitelino (peso relativo), foi obtido pela subtração entre o peso do pinto e o peso do saco vitelino residual. O percentual de saco vitelino residual foi obtido em relação ao peso corporal.

Figura 16 – Órgãos separados para pesagem individual.



Fonte: Arquivo pessoal

5. Análise Estatística

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, onde na incubação as bandejas com 96 ovos foram consideradas as repetições. Para as análises de bioquímica sérica (glicose, ácido úrico, lactato) foram utilizadas 20 repetições por tratamento, sendo o pinto a repetição. Nas análises de qualidade dos ovos foram considerados a repetição. Para as análises de peso dos órgãos foram utilizados 28 animais por tratamento.

Os dados normais e homogêneos foram submetidos às análises de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de F. Dados não normais foram analisados pelo teste Kruskal Wallis. As variáveis foram analisadas com o procedimento MIXED do pacote de software SAS 9.2 (SAS Institute, 2009). O modelo utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu_i + \text{TRAT}_j + e_{ijkl},$$

Onde μ é a média geral, TRAT_i é o tratamento usado (VACINA e VACINA + ANTIBIÓTICO) e e_{ijkl} , é o erro. As medias foram obtidas por meio do LSMEANS. Para todas as variáveis foi considerado efeito significativo com o valor de probabilidade em $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados relativos ao peso dos ovos e seus componentes, seu peso específico e espessura da casca encontram-se na Tabela 3. Não foram encontradas diferenças significativas nas variáveis analisadas nesta tabela, o que já era esperado pois neste momento os ovos não haviam sido submetidos à incubação. Estes resultados confirmam a padronização da amostra que foi retirada nos galpões das matrizes, o que é indispensável em experimentos que objetivam avaliar o processo de produção de pintos de um dia, visto que uma desuniformidade nas características da casca, no peso do ovo e na proporção de seus componentes influenciariam diretamente o desenvolvimento embrionário e a eclosão entre os tratamentos. O horário da coleta dos ovos do experimento é outro fator que deve ser considerado, pois quando a mesma é a primeira do dia, há risco de que a amostra contenha ovos que foram postos no dia anterior e conseqüentemente, que tenham o desenvolvimento embrionário modificado pelo tempo e temperatura dos ovos nos galpões. Desta forma, para garantir a uniformidade da amostra também é necessário padronizar o momento da obtenção da mesma e assegurar que seja feita a partir da segunda coleta do dia.

Tabela 3 - Composição, peso específico e espessura da casca de ovos provenientes de matrizes pesadas Cobb® com 35 semanas de idade, utilizados em ambos os tratamentos do experimento.

Variáveis	Ovos a serem vacinados <i>in ovo</i>	Ovos a serem vacinados <i>in ovo</i> + antibiótico	SEM	P-valor
Peso ovo (g)	64.91	64.81	0.34	0.888
Peso da gema (g)	17.53	17.10	0.11	0.070
% Gema	26.90	26.66	0.14	0.422
Peso do albumen (g)	42.13	42.13	0.27	0.996
% Albumen	65.00	64.97	0.15	0.921
Peso da casca (g) ¹	5.34	5.40	0.04	0.561
% Casca	8.15	8.36	0.07	0.146
Gema:Albumen	0.41	0.41	0.003	0.611
Peso específico (g/ml H ₂ O)	1.081	1.081	0.05	0.356
Espessura da casca (mm) ¹	367.83	380.19	4.11	0.134

n= 40 por tratamento. Sem membranas¹.

Em relação natureza da matéria prima empregada no experimento, os valores encontram-se semelhantes aos encontrados na literatura para essa linhagem e idade de matriz (ROCHA et al., 2008; BARBOSA et al., 2012; NANGSUAY et al., 2015, 2016). No que se refere à avaliação da qualidade da casca do ovo, as análises de peso específico, percentual de casca e espessura são comumente utilizadas para esta finalidade (ROQUE; SOARES, 1994), sendo que na prática dos incubatórios industriais somente o peso específico é realizado periodicamente. A meta de peso específico dos ovos ≥ 1.080 preconizada nestas indústrias correspondem aos valores constatados na presente pesquisa.

Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) nos parâmetros de rendimento de incubação entre ovos que foram vacinados *in ovo* e àqueles que além da vacinação *in ovo* receberam o antibiótico (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros do rendimento de incubação de ovos submetidos ao processo de vacinação *in ovo* com e sem antibiótico.

Variáveis (%)	Incubação com vacinação <i>in ovo</i>	Incubação com vacinação <i>in ovo</i> + antibiótico	SEM	P-valor
Perda de peso (0-18d)	11.42	11.51	0.08	0.646
Fertilidade	98.43	99.17	0.23	0.113
Eclosão de ovos férteis	91.40	92.55	0.62	0.365
Mortalidade embrionária total ¹	8.59	7.44	0.62	0.364
Mort. embrionária inicial (0 - 7d) ¹	3.49	4.48	0.45	0.280
Mort. embrionária média (8 - 18d) ¹	2.06	1.44	0.27	0.273
Mort. embrionária final (19 - 21d) ¹	1.44	1.28	0.09	0.853
Bicados ¹	1.58	0.98	0.09	0.354
Mort. embrionária final + bicados ¹	3.03	2.27	0.29	0.203

¹Expressos em percentagem de ovos férteis (n= 14 bandejas com 96 ovos incubados por tratamento).

Meijerhof e Van Beek (1993) afirmaram que, ovos que perdem cerca de 11 a 12% de seu peso inicial têm melhores índices de eclosão e os valores obtidos neste experimento estão de acordo com os indicados por estes autores. A perda de peso dos ovos foi mensurada antes que as vacinações fossem aplicadas, entretanto a adequação deste parâmetro é um indicativo de que os ovos foram incubados em ambiente controlado e homogêneo, principalmente relativo à umidade relativa do ar.

Após a aplicação *in ovo* da vacina e vacina + antibiótico, variáveis como: mortalidade embrionária final, número de ovos bicados e conseqüentemente a mortalidade embrionária total poderia ter sido influenciada, principalmente devido à adição do antibiótico, que poderia alterar a osmolaridade da solução inoculada. Segundo Uni e Ferket (2003), substâncias a serem aplicadas *in ovo* devem ter a osmolaridade mantida entre 100 a 600 mOsm, pois valores fora desta faixa provocam desequilíbrio hidroeletrólítico e ácido básico no embrião. Nas fases finais de incubação, onde ocorrem

eventos críticos como a bicagem da membrana interna e externa da casca, as alterações fisiológicas citadas possivelmente provocariam queda de eclosão. Desta forma, apesar da osmolaridade das soluções inoculadas e do sangue dos embriões não terem sido analisadas, pode-se inferir que a adição do antibiótico não alterou de forma significativa a solução a ponto de causar danos ao processo de nascimento.

A ausência de efeitos significativos no processo de nascimento dos pintos que receberam a adição de antibiótico na vacina in ovo é evidenciada ao observar-se a curva de eclosão de ambos os tratamentos (Gráfico 1 e 2), pois o tempo médio de nascimento dos pintos e a dispersão do nascimento foram semelhantes.

Gráfico 1- Dispersão de eclosão de acordo com os tempos de nascimento para tratamento controle.

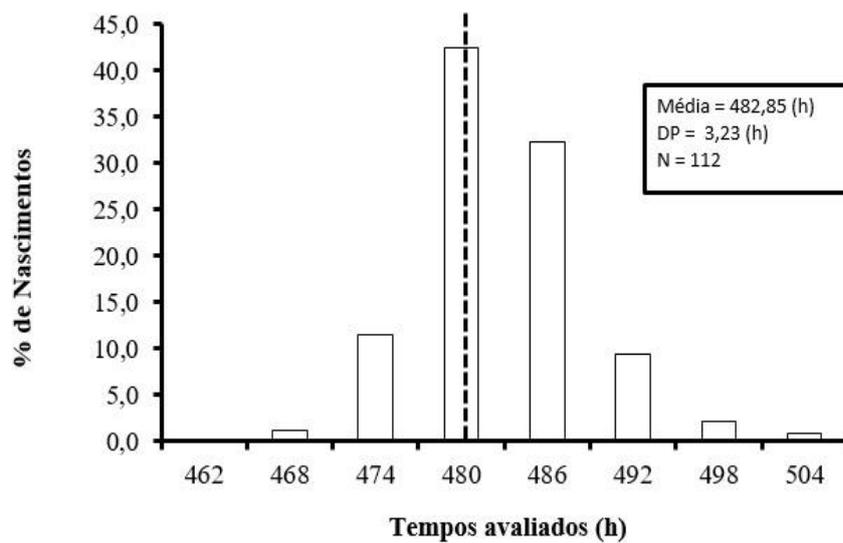
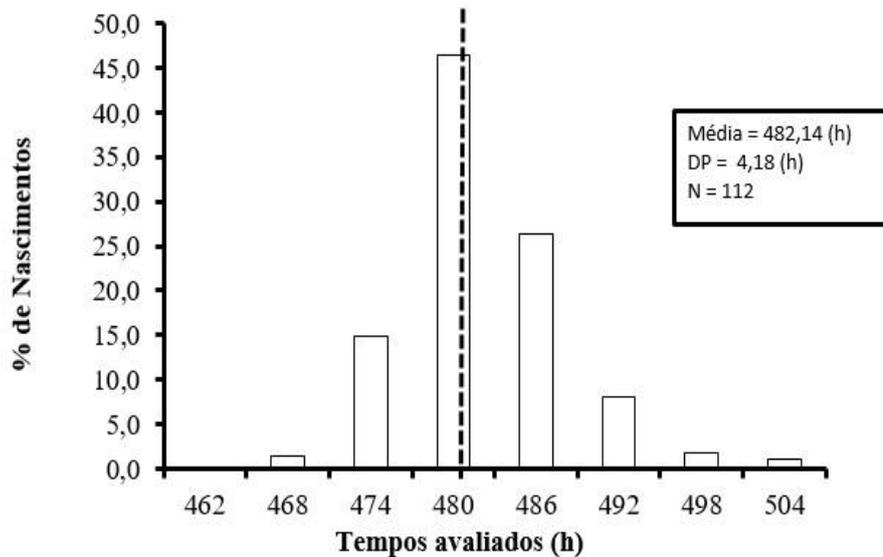


Gráfico 2 - Dispersão de eclosão de acordo com os tempos de nascimento para o tratamento vacinação *in ovo* + antibiótico.



Os resultados da avaliação dos parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos vacinados *in ovo* com ou sem antibiótico encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5- Parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos vacinados *in ovo* com ou sem antibiótico.

Variáveis	Pintos vacinados <i>in ovo</i>	Pintos vacinados <i>in ovo</i> + antibiótico	SEM	P-valor
Peso médio do pinto (g)	39.10b	41.36a	0.33	0.004
YFBM (g)	37.19b	38.90a	0.28	0.001
SV (g)	1.89b	2.36a	0.10	0.027
Comprimento (cm)	18.84b	19.15a	0.05	0.003
Escore de umbigo ¹	1.57	1.82	0.06	0.067

YFBM (peso do pinto sem o saco vitelino – yolk free body mass); SV (saco vitelino residual). ¹ Condição de umbigo, onde: 1= boa, 2= moderada, 3= ruim.

Na associação do antibiótico com a vacina *in ovo*, as variáveis peso médio do pinto, peso do pinto sem o saco vitelino (YFBM), peso de saco vitelino residual e comprimento foram maiores ($P < 0,05$) quando comparados àqueles oriundos da vacinação *in ovo* sem antibiótico. A variável escore de umbigo não sofreu influência dos tratamentos ($P > 0,05$).

O YFBM é um parâmetro mais genuíno quando comparado ao peso bruto do pintinho, pois representa o que realmente foi convertido de nutrientes pelo embrião em massa corporal a partir do saco vitelino (NANGSUAY et al., 2015) e o comprimento do pintinho está relacionado positivamente à massa corporal livre de gema na ocasião do nascimento (MEIJERHOF, 2006). Molenaar et al. (2008) demonstraram que a vantagem de 1 cm a mais no comprimento do pintinho no dia do nascimento pode resultar em 264 gramas a mais em peso corporal, com 45 gramas a mais na produção de carne de peito ao 38º dia de idade.

O uso do antibiótico promoveu melhor qualidade dos pintos eclodidos, principalmente devido aos resultados de YFBM e comprimento. Segundo Boelter (1998) um dos motivos pelo qual se espera melhora do desempenho zootécnico com o uso dos antibióticos promotores de crescimento é devido ao aumento da absorção de nutrientes causada pela mudança no ambiente intestinal (BOELTER, 1998), em que ocorre uma diminuição na parede do intestino delgado assim impulsionando o aumento da irrigação sanguínea e por sequência uma maior oferta de oxigênio para a mucosa o que melhora a absorção dos nutrientes (MAGALHÃES et al., 1998; HAESE; SILVA, 2004).

Tabela 6- Peso de órgãos em valores absolutos (g) e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino (%) de recém-eclodidos que foram submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem antibiótico.

Variáveis	Pintos vacinados <i>in ovo</i>	Pintos vacinados <i>in ovo</i> + antibiótico	SEM	P-valor
Coração (g)	0.300b	0.320a	0.006	0.011
Coração (%)	0.008	0.007	1.080	0.258
Fígado (g)	1.110b	1.190a	0.010	0.020
Fígado (%)	0.030	0.030	0.001	0.870
Estômago (g)	3.080	3.130	0.037	0.509
Estômago (%)	0.083	0.080	0.001	0.104
Intestino (g)	2.250	2.200	0.030	0.471
Intestino (%)	0.060	0.050	0.001	0.300
Pulmão (g)	0.320b	0.350a	0.005	0.003
Pulmão (%)	0.009	0.008	0.001	0.154
Baço (g)	0.014	0.015	0.001	0.407
Baço (%)	0.043	0.048	0.001	0.109
Bursa (g)	0.043	0.048	0.001	0.109
Bursa (%)	0.001	0.001	0.001	0.297

n=28. Pesos relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino.

Na tabela 6 encontram-se os resultados de peso de órgãos em valores absolutos e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino de recém-eclodidos. Assim como as variáveis de rendimento de incubação e qualidade dos pintos, não foram encontrados na literatura experimentos semelhantes ao presente estudo que avaliaram o desenvolvimento de órgãos durante a incubação. O peso absoluto do coração, fígado e pulmão foram estatisticamente superiores ($P < 0,05$) no tratamento com antibiótico. De acordo com Maatjens et al. (2016), o peso maior de órgãos vitais indica maior metabolismo e desenvolvimento corporal. Porém, os pesos relativos destes órgãos foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os tratamentos, demonstrando que a organogênese de embriões de ambos os tratamentos foi semelhante no que diz respeito aos órgãos avaliados. As demais variáveis referentes aos órgãos dos pintinhos também não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$).

Tabela 7- Parâmetros sanguíneos de recém-eclodidos que foram submetidos à vacinação *in ovo* com ou sem antibiótico.

Variáveis	Pintos vacinados <i>in ovo</i>	Pintos vacinados <i>in ovo</i> + antibiótico	SEM	P-value
Glicose (mmol/l)	7.12a	5.10b	0.18	0.001
Lactato (mmol/l)	0.49b	0.73a	0.04	0.002
Ácido úrico (mmol/l)	0.31a	0.21b	0.01	0.005

De acordo com a tabela 7, os valores de glicose foram menores ($P < 0,05$) no tratamento de vacinação *in ovo* + antibiótico. Na fase final da incubação, quando o embrião rompe a membrana interna e externa da casca, o suprimento de oxigênio no ovo é limitado. Em contrapartida, a necessidade de energia para a eclosão é suprida pela glicólise e gliconeogênese (CHRISTENSEN et al., 2001; MORAN, 2007). Os níveis de glicose reduzidos no tratamento com antibiótico podem ter ocorrido por uma maior demanda energética, pois estes pintos apresentaram maior peso corporal e peso de órgãos vitais, como fígado, coração e pulmão.

Na análise de lactato observou-se um nível maior ($P < 0,05$) no tratamento vacinação *in ovo* + antibiótico. O aumento do lactato é comum durante o processo de

eclosão, quando há baixa disponibilidade de oxigênio para a realização da beta-oxidação. Desta forma o embrião utiliza glicólise anaeróbia, além da quebra do glicogênio armazenado principalmente nos músculos e no fígado, que é a maior fonte de lactato. Além disso, o lactato é considerado indicador de esforço físico, situação na qual os embriões enfrentam ao final da incubação, quando grande quantidade de energia é utilizada em atividades musculares, como nos movimentos para rotação do corpo e quebra da casca (CHRISTENSEN et al., 2001; MORAN, 2007). Maatjens et al. (2016) relataram que o aumento dos níveis de lactato indica aumento do metabolismo da glicose pela via glicolítica e pode ser causado pelo aumento da taxa metabólica, fato passível de ter ocorrido nos pintos que receberam adição de antibiótico na vacina.

Apesar dos níveis de glicose terem sido menores ($P < 0,05$) e de lactato terem sido maiores ($P < 0,05$) nos pintos do tratamento vacina + antibiótico, os níveis de ácido úrico foram significativamente menores, o que sugere que a energia exigida pela maior atividade metabólica nestas aves foi obtida por outras vias, preservando a mobilização de proteínas e permitindo menor degradação muscular. Esta hipótese é apoiada pelo resultado de maior ($P < 0,05$) YFBM obtido nestas aves. Segundo Haese e Silva (2004), o uso de antibióticos como promotores de crescimento aumenta as reservas de glicogênio. Analisando os resultados do presente estudo, é possível que esta tenha sido a via energética principal utilizada pelos embriões que receberam adição de antibiótico *in ovo*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do antibiótico gentamicina associado à vacinação *in ovo* na dose de 0,20mg/ovo não altera o rendimento da incubação e produz pintos de um dia de maior comprimento, peso e YFBM (peso do pinto livre de gema).

O estudo entretanto, não avaliou se esta prática associada a vacinação *in ovo* altera os títulos vacinais, o que deve ser fortemente considerado.

Estudos aprofundados sobre o uso de antibióticos *in ovo* devem ser realizados na fase de criação e abate das aves para elucidar os impactos zootécnicos e de segurança alimentar desta prática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-BASHA, E. A.; IDAIDEK, N. M.; AL-SHUNNAQ, A. F. Comparative pharmacokinetics of gentamicina after intravenous, intramuscular, subcutaneous and oral administration in broiler chickens. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 765 – 773, 2007.
- ALMENARA, F. S.; RIBEIRO, L.; MATSUNO, R. M. S.; LOPES, R. M. G.; OLIVEIRA, T. S.; PEREIRA, D. M.; Ototoxicidade do aminoglicosídeo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, 2008.
- AVAKIAN, A.; SINGBEIL, B.; POSTON, R.; GROSSE, D.; KLEIN, D.; WHITFILL, C.; TRIPATHY, D. Safety and efficacy of foal and pigeon pox vaccines administered in ovo to SPF and broiler embryos. **Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference**, p. 56-60, 1999.
- BANERJEE, S.; MUKHOPAADHAYAY, S. K.; GANGULY, S. Phyto-genic growth promoter as replacers for antibiotic growth promoter in poultry birds. **Journal of Animal Genetic Research**, v. 1, p. 6 – 7, 2014.
- BARBOSA, F. H. F.; SILVA, A. M.; DUARTE, R.; NICOLE, J. R.; Perfil de Susceptibilidade antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.1, 2001.b
- BARBOSA, V. M. Desenvolvimento embrionário. In: BARBOSA, V. M. **Fisiologia da Incubação e Desenvolvimento Embrionário**.1.ed., Belo Horizonte: FEP - MVZ, 2011. 124p. cap. 5 p. 85-124.a
- BARBOSA, V. M.; MENDES, P.M. M.; ROCHA, J. S. R.; POMPEU, M. A.; LARA, L. J. C.; MARTINS, N. R. S.; NELSON, D. L.; MIRANDA, D. J. A.; CUNHA, C. E.; CARDOSO, D. M.; CARDEAL, P. C.; Avaliação da qualidade da casca de ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1036 – 1044, 2012.
- BENÍCIO, L. A. S. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão da indústria. In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 1996. Curitiba, Paraná. Brasil. p.17-26.

BERNADINO, A.; DAGA, M. Vacinação “in ovo”. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NAAS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da incubação**. 3. ed., Campinas: FACTA, 2013. 465p. cap. 37 p.397-408.

BOELTER, R. Resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal. In: **Farmacologia Veterinária - Temas Escolhidos** MAGALHÃES, H.M. (org) Ed. Agropecuária LTDA, Guaíba, Rio Grande do Sul, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – **Portaria 448 de 10 de setembro de 1998**. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana.

BRASIL, **Instrução Normativa MA n.º 42, de 20 de dezembro de 1999** – Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP.

BROWN, S. A.; RIVIERE, J. E. Comparative pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 14, p. 1 – 35, 1991.

BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutrime**, v.6, p. 953 – 959, 2009.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 1 ed. Campinas: CNBA, 2002. p. 430.

CHAMBRES, H. F.; Antimicrobianos: considerações gerais. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **GOLDMAN & GILMAN - As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap. 43 p. 859 – 876.

CARVALHAL, M. L.; ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia Trabulsi**. 5 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. cap. 2 p. 7 – 20.

- CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth promotion antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 159-161, 2003.
- COLOMER-LLUCH, M.; IMAAMOVIC, L.; JOFRE, J.; MUNIESA, M.; Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 4908 – 4911, 2011.
- COLUSI, A. D. Uso racional de antibióticos y quimioterápicos en avicultura. In: **Conferência FACTA 1993 de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 1993; Santos, São Paulo. Brasil. p. 67-81.
- CHRISTENSEN, V. L.; WINELAND, M. J.; FASENKO, G. M.; DONALSON, W. E. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, p. 1729-1735, 2001.
- DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E.; Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 201, 2009.
- EMEA. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines – report and qualitative risk assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**, United Kingdom, 1999.
- FERNANDES, P. Antibacterial Discovery and development – the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, p.1497 – 1503, 2006.
- FERKET, P., UNI, Z. Early feeding-in ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. **In conference European poultry**, 2006.
- GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T.; BROWN, B. C. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. **Avian Diseases**, v. 45, p. 144-148, 2001.

GILDERSLEEVE, R. P.; HOYLE, C. M.; MILES, A. M.; MURRAY, D. L.; RICKS, C. A.; SECREST, M. N.; WILLIAMS, C. J.; WOMACK, C. L. Developmental performance of an egg injection machine for administration of Marek's disease vaccine. **Journal of Applied Poultry Science**, p. 337-346, 1993.

GILDERSLEEVE, R. P.; FLUKE, D. R. K. In ovo technology for vaccine delivery. **The North Central Avian Disease Conference**, v. 46, p. 35-41, 1995.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T.; Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 677 – 679, 2010.

HAESE, D.; SILVA, B. A. N. Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. **Revista Eletrônica Nutrime**, v. 1, p. 07-19, 2004.

HASAN, B.; FARUQUE, R.; DROBNI, M.; WALDENSTROM, J.; SADIQUE, A.; AHMED, K. U.; ISLAM, Z.; PARVEZ, M. B. H.; OLSEN, B. High Prevalence of Antibiotic Resistance in Pathogenic Escherichia coli from Large and Small-Scale Poultry Farms in Bangladesh. **Avian diseases**, v. 55, p. 689-692, 2011.

HILL, D. Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality? **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 12, p.188, 2001.

ISLAM, A. F. M. F.; WALKDEN-BROWN, S.W.; WONG, C.W.; GROVES, P. J.; BURGESS, S. K.; ARZEY, K. E., YOUNG, P. L. Influence of vaccine deposition site on post-vaccinal viraemia and vaccine efficacy in broiler chickens following in ovo vaccination against Marek's disease. **Avian Pathology**, v. 30, p. 525-533, 2001.

JAWETZ, E.; Aminoglycosides and polymyxins. **In Basic and Clinical Pharmacology**, 2 ed. Los Altos: Lange Medical Publications, p. 538-545, 1984.

JOCHEMSEN, P.; JEURISSEN, S. H. M. The localization and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. **Poultry Science**, v. 81, p. 1811-1817, 2002.

JOHNSTON, P. A.; LIU, H.; O'CONNELL, T.; PHELPS, P.; BLAND, M.; TYCZKOWSKI, J.; KEMPER, A.; HARDING, T.; AVAKIAN, A.; HADDAD, E.;

WHITFILL, C.; GILDERSLEEVE, R.; RICKS, C. A. Applications in in ovo technology. **Poultry science**, v. 76, n. 1, p. 165-178, 1997.

KHALIL, S.; HAMED, E.; HASSINI, O. Residue withdrawal of florfenicol from the serum and edible tissues of broiler chickens. **Journal of American Science**, V.8, P. 514-524, 2012.

MAATJENS, C. M.; VAN ROOVERT-REIJRINK, I. A. M.; ENGEL, B.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic development. **Poultry Science**, v. 95, p. 956-965, 2016.

MAGALHÃES, H. M., et al. **Farmacologia veterinária**. Rio Grande do Sul: Editora Agropecuária, p. 191- 213, 1998.

MCCAPES, R. H.; YAMAMOTO, R.; GHAZIKHANIAN, G.; DUNGAN, W. M.; ORTMAYER, H. B. Antibiotic egg injection to eliminate disease: Effect of injection methods on turkey hatchability and *Mycoplasma meleagridis* infection. **Avian Diseases**, v. 21, p. 57 - 68, 1976.

MCDONALD, J. M.; WANG, S. L. Foregoing sub-therapeutic antibiotics: the impact on broiler grow-out operations. **Applied Economic Perspectives and Policy**. V.33, p. 79-98, 2011.

MAGENIS, G. B.; **Avaliação da gentamicina aplicada em ovos de aves reprodutoras pesadas e seu efeito residual nos tecidos**. 2015. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2015.

MEIJERHOF, R.; VAN BEEK, G. Mathematical modelling of temperature and moisture loss of hatching eggs. **Journal of Theoretical Biology**, v. 165, p. 27-41, 1993.

MEIJERHOF, R. Chick size matters. **World's Poultry Science Journal**, v. 22, p. 30-31, 2006.

MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN BRAND, H. Relationship between hatchling length and weight on later productive performance in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 4, p. 599–604, 2008.

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

MOSSALLANEJAD, S. S.; TAVAKKOLI, H. DERAKHSHANFAR, A.; SALANDARI, S. An experimental study of the system alteration of nitroimidazoles in the middle stage of embryonic development. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. V.2, p. 1468-1474, 2014.

MOSSALLANEJAD, S. S.; TAVAKKOLI, H. DERAKHSHANFAR, A.; SALANDARI, S. Efficiency of the injection trimethoprim/sulfamethoxazole solution on game bird embryonated-egg during the late stage of development. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, p. 1553 – 1561, 2014.

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B. A.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C.; Uso racional de antimicrobianos. **In: Simpósio Condutas em enfermagem de clínica médica de hospital de média complexidade**, 2010; Ribeirão Preto, São Paulo. Brasil. p. 164 – 172.

NANGSUAY, A.; MOLENAAR, R.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN ANKER, I.; HEETKAMP, M. J. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND. Differences in egg nutrient availability, development, and nutrient metabolism of broiler and layer embryos. **Poultry Science**, v. 94, p. 415-423, 2015.

NANGSUAY, A. **Are all eggs equal? Embryonic development and nutrient metabolism in chicken eggs of different origins**. 2016. 213f. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen, NL, 2016.

NASCIMENTO, E. R.; NASCIMENTO, M. G. F.; SANTOS, M. W.; DIAS, P. G. O.; RESENDE, O. A.; SILVA, R. C. F.; Eradication of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* from a chicken flock by antimicrobial injections in eggs and chicks. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 33, p.119 – 124, 2005.

- OLIVEIRA, J. A.; DEMARCO, R. C.; RASSATO, M. Regeneração de células ciliadas após ototoxicidade com aminoglicosídeos na cóclea em aves. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 66, p. 24-29, 2000.
- PATRICK, G. L. **Introduction to Medicinal Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2005, cap.16.
- PEDERSEN, K. B; EDQVIST, L. E. Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense. **Late lessons from early warnings: the precautionary principle**, 2001.
- ROCHA, J. S. R.; LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C.; CANÇADO, S. V.; BAIÃO, L. E. C.; SILVA, T. R. Efeito da classificação dos ovos sobre o rendimento de incubação e os pesos do pinto e do saco vitelino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.979-986, 2008.
- ROQUE, L.; SOARES, M. C. Effects of eggshell quality and broiler breeder age on hatchability. **Poultry Science**, v.73, p.1838-1845, 1994.
- ROSTAGNO, M. H.; Impacto da restrição de antimicrobianos na indústria avícola. **In: XII Simpósio Sul da Avicultura e III Brasil Sul Poultry Fair, 2011**; Chapecó, Santa Catarina. Brasil. p. 121 – 132.
- SALEEMI, M. K.; KHAN, M. Z.; JAVED, I.; KHAN, A. Pathological effects of gentamicin administered intramuscularly to day-old broiler chicks. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, p. 425 – 432, 2009.
- SAPKOTA, A. R.; HULET, R. M.; ZHANG, G.; MCDERMONT, P.; KINNEY, E. L.; SCHWAB, K. J.; JOSEPH, S. W.; Lower prevalence of antibiotic-resistant enterococci on U. S. conventional poultry farms that transitioned to organic practices. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 1622 – 1628, 2011.
- SARMA, G.; GREER, W.; GILDERSLEEVE, R. P.; MURRAY, D. L.; MILES, A. M. Field safety and efficacy of *in ovo* administration of HVT and BS-1 bivalent Marek's disease vaccine in commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 39, p. 211-217, 1995.

SHARMA, J. M.; BURMESTER, B. R. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Diseases**. v. 26, p. 134 – 149, 1982.

SILVA, C.H.P.M., **Bacteriologia: um texto ilustrado**, Teresópolis: Eventos, p. 107-119, 1999.

SINGROHA, R.; SRIVASTAVA, S.K.; CHHIKARA, P. **European Journal of Anatomy** Effect of Gentamicin on kidney in developing chicks. p. 119-126, v.16, 2012.

SINGROHA R.; SRIVASTAVA, S.K.; CHHIKARA, P. Effect of gentamicin on proximal convoluted tubules of kidney in developing chicks. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 62, p. 17–22, 2013.

SMIT, T.; J. HOEKSTRA. Treatment of hatching eggs against Myco-plasma infection by injecting tylosin tartrate into the air cell. **Tijdschr voor Diergeneeskunde**, v. 92, p. 1190-1194, 1967.

SOARES, L. L. P.; Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão do fabricante. **In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 1996. Curitiba, Paraná. Brasil. p.27-36.

SOUZA, F. M. Basic aspects of in-ovo injection in commercial hatcheries. **Hatchery Expertise Online**, n. 20, 2008.

SPOO, J. R.; RIVIERE, J. E. Antibióticos Aminoglicosídeos. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2003. cap. 43 p. 703 - 719.

SPINOSA, H. S; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3.ed., Rio de Janeiro, 2002.

STOKSTAD, E. L. R.; JUKES, T. H. Further observations on the animal protein factor, **Proceedings of the Society of Biological and Experimental Medicine**, v. 73, p. 523-528, 1949.

TAVAKKOLI, H.; DERAKHSHANFAR, A.; GOOSHKI, S. N. A short preliminary experimental study on teratogenic effect of methenamine in embryonic model.

International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research. V.1, p. 1523-1528, 2013.

TAVAKKOLI, H.; DERAKHSHANFAR, A.; GOOSHKI, S. N. The effect of florfenicol egg-injection on embryonated chicken egg. **International Journal of Advanced**

Biological and Biomedical Research. v. 2, p. 496-503, 2014.

TAVAKKOLI, H.; DERAKHSHANFAR, A.; GOOSHKI, S. N. Toxicopathological lesions of Fosfomycin in embryonic model. **European Journal Biology.** V.4, p. 63-71, 2014.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu, p. 792, 1990.

TONA, K.; BAMELIS, F.; DE KETELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; MORAES, V. M. B.; BUYSE, J.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of Egg Storage Time on Spread of Hatch, Chick Quality, and Chick Juvenile Growth. **Poultry Science,** v. 2, p. 736–741, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. **In: Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap. 4 p. 76 – 112.

UNI, Z.; FERKET, R. P. **Enhancement of oviparous species by in ovo feeding.** USA n. 6592878 B2, 2003.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; BRUINSMA, N.; STOBBERINGH, E. E. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in the Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 46, p. 146-7, 2000.

WAKENELL, P. S.; BRYAN, T.; SCHAEFFER, J.; AVAKIAN, A.; WILLIAMS, C. e WHITFILL, C. Effect of in ovo vaccine delivery route on herpes virus of turkeys/sb-1 efficacy and viraemia. **Avian Diseases,** v. 46, n. 2, p. 274-280, 2002.

WHO. 'The medical impact of the use of antimicrobials in food animals', Report of a WHO meeting, Berlin, 1997.

WHO. 'Global principles for the containment of antimicrobial resistance due to antimicrobial use in animals intended for food', 2000.

WILLIAMS, C. J. In-ovo vaccination and chick quality. **International Hatchery Practice**, v. 19, p. 7-13, 2005.

WILLIAMS, C. J. In ovo vaccination for disease prevention. **International Poultry Production**, v. 15, p. 233-243, 2009.

WILLIAMS, C. J.; ZEDEK, A. S. Comparative field evaluations of in-ovo applied technology. **Poultry Science**, v. 89, p. 189 -193, 2010.

WINANS, R.; NEWMAN, L. Reporto field safety study for infectious bursal disease vaccine when administered by in ovo and/or via drinking water to broiler chicks. By **Schering-Plough Animal Health**. Elkhorn Research Center, Technical article. 1997.