

# INJEÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO *IN OVO* PRÉ-INCUBAÇÃO SOBRE PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO E HEMATOLÓGICOS RESPIRATÓRIOS<sup>1</sup>

EFFECT OF ASCORBIC ACID INJECTED IN PRE-INCUBATION EGG ON INCUBATION  
AND RESPIRATORY HEMATOLOGICAL PARAMETERS

S. SGAVIOLI<sup>2\*</sup>; M. THIMOTHEO<sup>2</sup>; M. F. F. M. PRAES<sup>2</sup>; V. K. SILVA<sup>2</sup>;  
M. F. R. ALVES<sup>2</sup>; I. C. BOLELI<sup>2</sup>

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da injeção de ácido ascórbico em ovos férteis sobre parâmetros de incubação e sanguíneos. Oitocentos ovos férteis de matrizes de frango de corte (Cobb®) com 36 semanas de idade foram pesados e distribuídos homogeneamente em quatro incubadoras, com controle automático de temperatura, giro e umidade. Durante o período de incubação utilizou-se uma temperatura de 37,5°C e 60% de umidade relativa até a transferência (19 dias de incubação) e 70% de umidade relativa nos dois últimos dias de incubação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos aplicados antes da incubação: ovos não perfurados e, portanto não injetados; ovos injetados com 100 µl de água no albúmem, com as seguintes concentrações: 0, 2, 4 e 6% de ácido ascórbico. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS<sup>®</sup>. Os dados mostraram que os tratamentos utilizados não prejudicaram o desenvolvimento *in ovo* sob condições termoneutras, exceto a eclosão, a qual foi influenciada por falta de habilidade na execução da técnica de injeção. Além disso, a injeção de 6% de ácido ascórbico aumentou o teor de hemoglobina, com melhora no potencial de transporte de gases no sangue destes pintainhos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Eclodibilidade. Intra ovo. Perda de massa. Vitamina C.

## SUMMARY

The present study evaluates the effect of ascorbic acid injection into fertile eggs on incubation and blood parameters. Eight hundred fertile eggs from broiler (Cobb®) breeders aged 36 weeks were weighed and homogeneously distributed in four incubators with automatic control of temperature, humidity and turning. The eggs were incubated at 37.5°C while relative humidity was kept at 60% until transfer (19 days incubation) and, then, increased to 70% on the last two days of incubation. The experimental design was completely randomized with five treatments, applied before incubation: eggs without holes and therefore not injected; eggs injected in the albumen with 100 µL of water plus 0, 2, 4 and 6% ascorbic acid. Statistical analysis was performed by SAS<sup>®</sup>. The data shows that the treatments did not compromise the development *in ovo* under thermoneutral conditions, except for the hatching, which was influenced by lack of skill in performing the injection technique. Furthermore, injection of 6% ascorbic acid increased hemoglobin content, improving the transport of gases in the blood of these chicks.

**KEY-WORDS:** Hatchability. Intra egg. Loss of mass. Vitamin C.

<sup>1</sup> Pesquisa financiada pela Fapesp. Processos n°: 2010/15280-0 e 2010/01923-7.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.

## INTRODUÇÃO

A partir da bicagem externa, os pintos se tornam expostos a condições adversas, como novos antígenos, estresse térmico e desafios sanitários, contra os quais age na linha de frente seu sistema imune inato. Injeção de nutrientes *in ovo* pode ser um método alternativo para aumentar a eclodibilidade, a qualidade das aves na eclosão e melhorar o sistema imune inato (OHTA et al., 2001). O uso de ácido ascórbico (vitamina C), como aditivo nutricional durante a fase fetal tem mostrado efeitos positivos dose-dependentes dessa vitamina sobre a eclodibilidade e o peso corporal na eclosão (GHONIM et al., 2009; MOHAMMED et al., 2011; NOWACZEWSKI et al., 2012). No entanto, os relatos da literatura, se referem à injeção de vitamina C intra ovo em fases mais adiantadas do desenvolvimento embrionário. Faltam dados na literatura sobre os efeitos da injeção de vitamina C *in ovo* pré-incubação, sobre parâmetros de incubação e características hematológicas dos pintos eclodidos de ovos incubados sob condições termoneutra. Portanto, do ponto de vista fisiológico e zootécnico, é muito importante o desenvolvimento de manejo que possibilite maximizar a obtenção de pintos de melhor qualidade. Considerados como pintos normais, aqueles com maior potencial para expressar seu desempenho geneticamente determinado e com maior potencial de defesa imunológica inata.

Diante disso, o presente estudo analisou os efeitos da injeção pré-incubação de ácido ascórbico *in ovo* sobre a qualidade da incubação (condutância, porcentagem e espessura da casca, perda de massa dos ovos, taxa de eclosão e mortalidade), a qualidade dos pintos (peso corporal e peso absoluto e relativo da bursa de Fabricius e temperatura da superfície corporal) e os parâmetros hematológicos respiratórios de pintainhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental (n° 7377/10), do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Oitocentos ovos férteis de frango de corte (Cobb®) provenientes de matrizes com 36 semanas de idade, foram pesados e utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 tratamentos (sem injeção -controle, com injeção de 0, 2, 4 e 6% de ácido ascórbico em 100µl de água intra ovo, armazenados em quatro incubadoras, cada uma com 40 ovos/tratamento, sendo o peso médio dos ovos por repetição e tratamento de 67±2g. As incubadoras (Premium Ecológica, IP200), com controle automático de temperatura e giro dos ovos a cada 2h, foram mantidas com 60% de umidade relativa até a transferência (19 dias de incubação) e com 70% nos dois últimos dias de incubação.

A injeção da solução foi realizada antes do início da incubação. Após a limpeza do local a ser injetado na casca do ovo com etanol 100%, a casca dos ovos foi perfurada, com uma agulha estéril (Injex, 13 x 0,38 (27,5 G1/2")). A solução com ácido ascórbico (Synth, 99% de pureza) foi injetada no albúmen a aproximadamente, 6 mm abaixo da casca. Os ovos foram posicionados de modo horizontal, e a solução foi aplicada no polo mais fino do ovo (contrário à câmara de ar). Após a injeção, o orifício foi fechado com etiqueta de identificação do tratamento e da repetição. O ácido ascórbico foi diluído em água Mili-Q, autoclavada e mantida em ambiente escuro devido sua foto sensibilidade.

As variáveis analisadas foram: taxa de eclosão e de eclodibilidade, mortalidade embrionária, porcentagem e espessura da casca, condutância, perda de massa, temperatura superficial corporal, peso relativo corporal, peso absoluto e relativo da bursa de Fabricius, valores de hematócrito (HCT), teor de hemoglobina (HGB), número total de hemácias (RBC), volume corpuscular médios de hemácias (MCV).

### Taxa de eclosão/eclodibilidade

Avaliou-se a eclosão (número de pintainhos nascidos/número de ovos incubados) e a eclodibilidade (número de pintainhos nascidos/número de ovos férteis incubados).

### Porcentagem e espessura da casca, perda de massa, condutância e temperatura superficial corporal

A porcentagem e espessura das cascas ao final da incubação foram obtidos a partir da análise de 10 ovos por tratamento, ambos após a remoção das membranas interna e externa e a cutícula, realizada seguindo metodologia de Rahn et al. (1981), mantendo fragmentos da casca em solução aquosa fervente de NaOH 0,5%. Em seguida, as cascas foram lavadas em água destilada e mantidas à temperatura ambiente durante 72 horas para secagem e posterior análises. O peso das cascas foi dado em % com relação ao peso do ovo pré-incubação. A espessura de casca foi obtida a partir da mensuração de fragmentos da região equatorial das cascas, utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo – resolução 0,001 mm).

A perda de massa foi calculada em porcentagem, a partir da diferença entre o peso do ovo antes do início da incubação e aos 18 dias de incubação. A condutância da casca foi calculada pela perda de massa (g) até a transferência/pressão de saturação de vapor (23,86 mm/Hg à 25°C).

Registraram-se as temperaturas de pintainhos machos da asa, cabeça, canela e dorso por meio de um termômetro infravermelho, para obter-se a temperatura (T) superficial corporal média, que foi calculada pela fórmula: temperatura superficial média = (0,12 x Tasa) + (0,03 x Tcabeça) + (0,15 x Tcanela) + (0,70 x Tdorso), descrita por Richard (1971).

### Qualidade dos pitainhos

O peso e índice peso do órgão/peso corporal da bursa de Fabricius foram obtidos após a eclosão, a

partir de oito pintainhos fêmeas/tratamento, após a morte por deslocamento cervical seguido de decapitação. O peso relativo do órgão foi calculado em relação ao peso corporal dos respectivos pintainhos. A partir do peso corporal absoluto (g) dos pintainhos recém-eclodidos, obtido após a secagem da penugem, foi calculado o peso relativo (%) dos mesmos em relação ao peso dos ovos (g).

### Parâmetros sanguíneos

Para as análises sanguíneas (HCT, HGB, RBC, MCV) foram utilizados oito pintainhos fêmeas por tratamento. O sangue foi coletado da veia jugular e mantidos em tubos plásticos tipo “ependorf” contendo 15µl de anticoagulante/1 ml de sangue (Glistab, cat. 29, Labtest Diagnóstica) em gelo para serem utilizados nas análises em um contador de células sanguíneas (Celm, Mod. 550), sendo realizadas duas leituras por ave.

### Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS® (SAS Institute, 2002). Em caso de efeito significativo (probabilidade de 5%), a comparação de médias foi realizada pelos contrastes ortogonais e polinomiais: contraste 1 – comparação entre o tratamento controle versus a média dos tratamentos com 0, 2, 4 e 6% de ácido ascórbico; contrastes 2, 3 e 4 - foram utilizados três modelos de regressão: modelo linear, modelo quadrático e modelo cúbico, com a finalidade de verificar efeitos polinomiais quanto aos níveis de aplicação de ácido ascórbico. Para a eclosão e a eclodibilidade as frequências foram comparadas pelo teste do qui-quadrado, ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de eclosão/eclodibilidade foram influenciadas de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) pelos tratamentos (Tabela 1). Observou-se que os ovos injetados, independente se com ácido ascórbico ou não, apresentaram menores taxas de eclosão/eclodibilidade.

Segundo Uni & Ferket (2003), altas concentrações das soluções podem interferir no equilíbrio osmótico e afetar o desenvolvimento do embrião, e descreveram como limite máximo 800 mOsm. A solução aplicada *in ovo* no presente estudo tem uma osmolaridade inferior a este limite (113 mOsm), o que indica que a causa da menor eclosão dos ovos injetados com ácido ascórbico não envolveu alteração excessiva em equilíbrio osmótico dos ovos. Os resultados do presente trabalho diferem dos obtidos por Pires et al. (2011), que observaram aumento na taxa de eclosão com injeção de 1% de ácido ascórbico *in ovo* pré-incubação. Efeito porcentagem-dependente de ácido ascórbico sobre a taxa de eclosão também registrado por Zakaria & Al-anezi (1996), Elibol et al. (2001), Ipek et al. (2004) e Nowaczewski et al. (2012), os quais observaram melhora na eclodibilidade dos ovos com injeção de 3 e 6 mg de ácido ascórbico, no entanto realizaram o procedimento em fases mais adiantadas da incubação, isso mostra que o efeito dessa vitamina sobre o desenvolvimento *in ovo* varia com a concentração da solução e com a fase do desenvolvimento embrionário na qual a injeção é realizada.

Jochemsen & Jeurissen (2002) citam que a idade em que é feito o procedimento de inoculação pode afetar o local onde o produto é aplicado. Ohta et al. (1999) observaram redução na eclosão quando da inoculação de aminoácidos *in ovo* antes da incubação. Segundo Ohta & Kidd (2001), a injeção de produtos *in ovo* deve ser feita na cavidade extra embrionária ou no saco da gema para evitar a redução da eclosão, entretanto, os autores trabalharam com injeção aos sete dias de incubação e não pré-incubação como no presente estudo.

Os dados do presente estudo indicam que o método de inoculação da solução não foi adequado, ou seja, os embriões podem ter sido perfurados, devido à localização que foi feita a injeção (no meio do ovo). Isso sugere a necessidade de maior treinamento no processo e na localização da injeção de soluções *in ovo*, pois no momento da injeção a movimentação do ovo pode deslocar o saco de vitelo, podendo a injeção perfurar o saco de vitelo, ou até mesmo o embrião.

**Tabela 01** - Efeito da injeção de ácido ascórbico sobre a frequência da eclodibilidade e a eclosão.

Tratamentos	Eclodibilidade (%)	Eclosão (%)
Controle	90,20	88,46
Ácido Ascórbico-0%	67,35	65,35
Ácido Ascórbico-2%	67,00	65,69
Ácido Ascórbico-4%	66,34	64,42
Ácido Ascórbico-6%	72,28	70,19
Probabilidade	0,0004*	0,0005*

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste qui-quadrado.

**Tabela 02** - Efeito da injeção de ácido ascórbico sobre a percentagem de casca, perda de massa, condutância, espessura de casca, peso corporal e temperatura superficial corporal dos pintainhos na eclosão.

Tratamentos	Percentagem de casca (%)	Perda de massa (%)	Condutância	Espessura da casca (mm)	Peso corporal realtivo (%)	Temperatura superficial corporal (°C)
Controle	7,74	8,12	0,21	0,460	74,80	32,28
Ácido Ascórbico-0%	7,88	8,20	0,21	0,480	74,95	32,20
Ácido Ascórbico-2%	8,19	8,08	0,20	0,494	73,63	32,69
Ácido Ascórbico-4%	7,89	7,88	0,20	0,482	76,00	32,47
Ácido Ascórbico-6%	7,78	7,64	0,19	0,481	75,31	31,80
Probabilidade	0,4745	0,8294	0,8263	0,1417	0,1669	0,1180
Coefficiente de variação	7,04	16,03	17,01	6,01	7,53	1,73

Como mostrado na Tabela 2 a porcentagem e a espessura da casca dos ovos ao final da incubação não foram afetadas pelos tratamentos ( $p>0,05$ ). As trocas gasosas entre meio interno e externo dos ovos depende do número total e tamanho dos poros e da espessura da casca, bem como das condições de temperatura, umidade e ventilação do ar da incubadora e da velocidade, ângulo e frequência de giro dos ovos, que interferem na perda de calor e na condutância (MORITA et al., 2010). Portanto, a espessura da casca é um fator que tem influência sob as trocas gasosas da casca (ANCEL & GIRARD, 1992) e perda de água pelo ovo. Os dados obtidos indicam que independente da injeção de ácido ascórbico, mesma proporção de casca foi utilizada para o desenvolvimento embrionário e fetal ao longo da incubação. Considerando que da casca provém o cálcio necessário para o desenvolvimento embrionário e fetal (TUAN, 1983; GRIZZLE et al., 1992), quanto menor a espessura da casca no final da incubação, maior a quantidade de cálcio utilizado para o desenvolvimento *in ovo*.

A porcentagem de redução de peso até o momento da transferência é um parâmetro utilizado comercialmente para determinar o grau de desenvolvimento do embrião (SANTOS et al., 2009) e a condutância é a capacidade de troca de gases entre o ovo e o ambiente, e está relacionada com a perda de água (CAMPOS & SANTOS, 2003) e de calor metabólico (HAMIDU et al., 2007). Os tratamentos aplicados não influenciaram significativamente ( $p>0,05$ ) a perda de massa e a condutância, portanto, a injeção *in ovo* das soluções não afetou o desenvolvimento dos embriões e as trocas gasosas durante a incubação.

Não houve efeito significativo ( $p>0,05$ ) dos tratamentos sob a temperatura superficial corporal, indicando, portanto, ausência de efeito dose-dependente do ácido ascórbico sobre o controle da temperatura corporal.

Os efeitos de agentes estressores ou moduladores sobre os órgãos linfóides das aves podem ser avaliados pelo peso e índice peso do órgão/peso corporal (WYATT et al., 1986; ROSALES et al., 1989; REVIDATTI et al., 2002). No presente trabalho, a injeção de ácido ascórbico *in ovo* não influenciaram o peso corporal e o índice bursal ( $p>0,05$ ) (Tabela 4), estes dados corroboram com Selim et al. (2012), que não observaram alterações no peso da bursa de patos quando os ovos foram injetados com ácido ascórbico. O peso de órgãos linfóides reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante uma resposta imune (RIBEIRO et al., 2008) e, juntamente com o peso relativo da bursa de Fabricius, nos possibilita avaliar o potencial de defesa da ave. Os valores encontrados para a relação entre o peso do ovo e o peso corporal dos pintos no presente estudo estão dentro do intervalo de 73 a 80% considerado por Henry & Burke (1997) como normal para pintos. Alloui et al. (2005) classificaram o índice bursal de frangos de corte como excelente ( $> 0,20\%$ ), bom ( $0,18\% < x \leq 0,20\%$ ), médio ( $0,15\% < x \leq 0,18\%$ ) e ruim ( $se \leq 0,15\%$ ). De acordo com os dados deste trabalho, o índice bursal na eclosão não atingiu 0,15%,

o que, segundo a classificação de Alloui et al. (2005), pode ser considerado um índice ruim para frango de corte. Esse baixo índice bursal mostra que, independentemente da injeção de ácido ascórbico, os pintinhos recém-eclodidos possuem baixa habilidade de proteção decorrente de imunidade adquirida, o que pode estar relacionado com o fato do desenvolvimento desse órgão linfóide ocorrer após a eclosão (PARAMITHIOTIS & RATCLIFFE, 1994; GLICK, 2000).

#### Parâmetros sanguíneos

Os valores de HGB foram influenciados significativamente ( $p<0,05$ ) devido às injeções (Tabela 4). Pelos contrastes, observou-se efeito linear para os níveis de solução de ácido ascórbico aplicados *in ovo* antes da incubação. A segunda metade da incubação dos ovos de aves é caracterizada por intenso crescimento fetal, que envolve aumento do metabolismo (TULLETT, 1990, FRENCH, 1997, MEIJERHOF, 1999; TAZAWA & WHITTOW, 2000) e, conseqüentemente, aumento na demanda por trocas gasosas (obtenção de  $O_2$  e eliminação  $CO_2$ ). Considerando que o ácido ascórbico está relacionado com aumento nos valores de RBC, HCT e HGB, segundo Moura & Pedroso (2003), o presente estudo investigou se injeção de ácido ascórbico *in ovo* influenciaria tais variáveis hematológicas respiratórias. Considerando-se que hemoglobina está relacionada com o transporte de gases, esses dados sugerem que o aumento da concentração da solução de ácido ascórbico inoculada aumentou a taxa respiratória, resultando, conseqüentemente, em aumento no processo hematopoiético e potencial respiratório, apesar de não ter alterado a condutância da casca.

O aumento do valor de HGB pode estar relacionado com a desidratação (CAMPBELL, 1994). Entretanto, não foi observado influencia dos tratamentos sobre o peso relativo dos pintos na eclosão e nem a presença de pintos com características de desidratação, o que nos leva a descartar esta possibilidade. Embora a eclodibilidade dos ovos injetados com ácido ascórbico tenha sido menor que os ovos do tratamento controle, não se pode deixar de considerar que valores maiores HGB concedem maior potencial de trocas gasosas aos pintinhos.

As demais características hematológicas – HCT, RBC, MCV - não foram influenciadas de maneira significativa ( $p>0,05$ ) pelos tratamentos aplicados. Estes dados corroboram com os de Ghonim et al. (2009), que não registraram efeito da injeção de ácido ascórbico sobre os parâmetros eritrocitários de pintinhos de corte; no entanto, os autores só analisaram os efeitos dessa vitamina em pintinhos provenientes de ovos injetados no 14º dia de incubação.

#### CONCLUSÃO

Os dados mostram que as injeções de soluções de ácido ascórbico ou não (tratamento controle) não prejudicaram o desenvolvimento *in ovo* sob condições

**Tabela 03** - Efeito da injeção de ácido ascórbico sobre o peso corporal, peso absoluto e relativo da bursa de Fabricius de pintainhos fêmeas na eclosão.

Tratamentos	Peso corporal (%)	Peso absoluto (g)	Peso relativo (%)
Controle	74,80	0,056	0,124
Ácido Ascórbico-0%	74,95	0,051	0,110
Ácido Ascórbico-2%	73,63	0,049	0,109
Ácido Ascórbico-4%	76,00	0,048	0,105
Ácido Ascórbico-6%	75,31	0,048	0,107
Probabilidade	0,1669	0,6842	0,7621
Coefficiente de variação (%)	7,53	23,48	24,08

**Tabela 04** - Efeito da injeção de ácido ascórbico sobre valores de hematócrito (HCT), teor de hemoglobina (HGB), número total de hemácias (RBC), volume corpuscular médios de hemácias (VCM) de pintainhos fêmeas na eclosão

Tratamentos	HCT (%)	HGB (g/dl)	RBC ( $10^6/\text{mm}^3$ )	VCM ( $\mu\text{m}^3$ )
Controle	31,35	11,22	2,34	137,57
Ácido Ascórbico-0%	32,70	9,50	2,47	135,18
Ácido Ascórbico-2%	27,35	9,22	1,95	140,70
Ácido Ascórbico-4%	15,25	5,70	1,16	131,38
Ácido Ascórbico-6%	30,90	13,22	2,33	129,50
Probabilidade	0,0548	0,0430*	0,0837	0,8107
Coefficiente de variação (%)	37,65	40,85	40,40	9,85
Efeito linear	-	0,0307*	-	-

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Hemoglobina =  $0,3817x + 8,2633$  ( $R^2 = 0,1029$ ).

termoneutras, exceto a eclosão e a eclodibilidade, as quais foram influenciadas por falta de habilidade na execução da técnica de inoculação. A injeção de 6% de ácido ascórbico aumentou o teor de hemoglobina, com melhora no potencial de transporte de gases no sangue destes pintainhos.

## REFERÊNCIAS

ALLOUI, M. N.; SELLAOUI, S.; DJAABA, S. Morphometrical and anatomo-pathological survey of the bursa of fabricius in broiler chickens. **International Society for Animal Hygiene**, v.2, p.52-55, 2005.

ANCEL, A.; GIRARD, H. Eggshell of the domestic guinea fowl. **British Poultry Science**, v.33, p.993-1001, 1992.

CAMPBELL, T. W. Hematology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian**

**Medicine: Principles and application**. Fort Worth-FL: Wingers Publishing, 1994. p.177-198.

CAMPOS, E. J.; SANTOS, J. E. C. O efeito de linhagens sobre o desenvolvimento embrionário. In: MACARI, M., GONZALES, E. (Ed) **Manejo da Incubação**. ed. Jaboticabal: FACTA, 2003. p.353-360.

ELIBOL, O.; TÜRKÖGLÜ, M.; AKAN, M.; EROL, H. Inkubasyon sırasında Agr Yumurtalara Askorbik Asit Enjeksiyonunun Kulucka zelliklerine Etkisi. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v.25, p.245-248, 2001.

FRENCH, N. A. Modeling incubator temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. **Poultry Science**, v.76, p.124-133, 1997.

GHONIM, A. I. A.; AWAD, A. L.; FATTOUH, M. H. A.; EL-SHHAT, A. M. Comparative study of ascorbic acid treatment methods on hatchability traits and growth performance of ducklings. **Egypt Poultry Science**, v.29, p.1085-1099, 2009.

- GLICK, B. Immunophysiology. In: **Sturkie's Avian Physiology**, 5 ed. San Diego: USA, 2000, 685p.
- GRIZZLE, J.; IHEANACHO, M.; SAXTON, A.; BROADEN, J. Nutritional and environmental factors involved in egg shell quality of laying hens. **British Poultry Science**, v.33, p.781-794, 1992.
- HAMIDU, J. A.; FASENKO, G. M.; FEDDES, J. J. R.; O'DEA, E. E.; OUELLETTE, C. A.; WINELAND, M. J.; CHRISTENSEN, V. L. The Effect of Broiler Breeder Genetic Strain and Parent Flock Age on Eggshell Conductance and Embryonic Metabolism. **Poultry Science**, v.86, p.2420-2432, 2007.
- HENRY, M. H.; BURKE, W. H. Sexual Dimorphism in broiler chick embryos and embryonic muscle development in late incubation. **Poultry Science**, v.77, p.728-36, 1997.
- IPEK, A.; SAHAN, U.; YLMAZ, B. The effect of *in ovo* ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. **Archives wur Geflügelk**, v.68, p.132-135, 2004.
- JOCHEMSEN, P.; JEURISSEN, S. H. M. The localization and uptake of *in ovo* injected soluble and particulate substances in chickens. **Poultry Science**, v.81, p.1811-1817, 2002.
- MEIJERHOF, R. Embryo temperature is the key factor in incubation. **World's Poultry Science Journal**, v.15, p.42-43, 1999.
- MOHAMMED, K. A.; EL-BOGHADY, A.; SOLIMAN, M. A. H.; ABD AL-GALIL, M. A.; ABD AL-ALEEM, N. M. The effect of both pre-incubation dipping eggs in vitamin C and cooling eggs during incubation period on embryonic and hatchability parameters in two local chicken strains. **Egypt Poultry Science**, v.31, n.2, p.379-392, 2011.
- MORITA, V. S.; BOLELI, I. C.; OLIVEIRA, J. A. Hematological and incubation parameters of chicks from young breeders eggs: variation with sex and incubation temperature. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.6, p.606-612, 2010.
- MOURA, L. C.; PEDROSO, M. A. Anemia ferropriva na gestação. **Revista de Enfermagem da Unisa**, v.4, p.70-75, 2003.
- NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSZTIANIAK, S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. **Folia Biologica (Krakow)**, v.60, p.93-97, 2012.
- OHTA, Y.; KIDD, M. T. Optimum site for *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v.80, n.10, p.1425-1429, 2001.
- OHTA, Y.; KIDD, M. T.; 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.
- OHTA, Y.; TSUSHIMA, N.; KOIDE, K.; KIDD, M. T.; ISHIBASHI, T. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1493-98, 1999.
- PARAMITHIOTIS, E.; RATCLIFFE, M. J. H. Survivors of bursal B cell production and emigration. **Poultry Science**, v.73, n.7, p.991-997, 1994.
- PIRES, D. L.; SGAVIOLI, S.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. C. Acido ascórbico in ovo sobre a eclodibilidade de ovos. In: XXII REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL - ALPA, 2011, Montevideo, Uruguai. **Anais...** XXII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal - ALPA, 2011.
- RAHN, H.; CHRISTENSEN, V. L.; EDENS, F. W. Changes in shell conductance, pore, and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens. **Poultry Science**, v.60, p.2536-254, 1981.
- REVIDATTI, F. A.; FERNANDEZ, R. J.; TERRAES, J. C.; SANDOVAL, G. L.; LUCHI, P.E. Modificaciones del peso corporal y indicadores de estrés em pollos parrilleros sometidos a inmovilización y volteo. **Revista Veterinária Argentina**, v.12, n.1, 2002.
- RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L. K.; CANAL, C. W.; LAGANÁ, C.; STRECK, A. F. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.636-644, 2008.
- RICHARDS, 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, p.1-10, 1971.
- ROSALES, A. G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P. D.; MOHAMED, A. M.; BROWN, J. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal Virus. **Avian Diseases**, v.33, n.1, p.35-41, 1989.
- SANTOS, J. E. C.; GOMES, F. S.; BORGES, G. L. F. N.; SILVA, P. L.; CAMPOS, E. J.; FERNANDES, E. A.; GUIMARÃES, E. C. Efeito da linhagem e da idade das matrizes na perda de peso dos ovos e no peso embrionário durante a incubação artificial. **Bioscience Journal**, v.25, p.163-169, 2009.
- SAS. INSTITUTE. **SAS<sup>®</sup> user' guide: statistics**. Cary, NC, 2002.

SELIM, S. A.; GAAFAR, K. M.; EL-BALLAL, S. S. Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.24, n.3, p.264-271, 2012.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G. C. Incubation physiology. In: **Sturkey's Avian Physiology**. 5ed. Academic Press, 2000. p.617-634.

TUAN, R. Supplemented eggshell restores calcium transport in chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. **Journal Embryology experimental Morphology**, v.74, p.119-131, 1983.

TULLET, S. G. Science and art of incubation. **Poultry Science**, v.69, p.1-15, 1990.

UNI, Z.; FERKET, R. P. **Enhancement of oviparous species by in ovo feeding**. US Patent 6.592.878 B2. North Carolina State University, Raleigh, NC; and Yissum Research Development Company of Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem. 31 Jul. 2001, 15 Jul. 2003.

WYATT, C. L.; WEAVER, W. D.; BEANE, W. L.; DENBOW, D. M. Influence of hatcher holding times on several physiological parameters associated with the immune system of chickens. **Poultry Science**, v.65, p.2156-2164, 1986.

ZAKARIA, A. H.; AL-ANEZI, M. A. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality and the body weights of broiler chickens. **Poultry Science**, v.75, p.1204-1209, 1996.