

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estímulos sonoros na incubação artificial de ovos: efeitos na  
eclosão, desempenho produtivo e comportamento pós-eclosão  
de pintos de corte**

**Ana Carolina Donofre**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências. Área de concentração:  
Engenharia de Sistemas Agrícolas

**Piracicaba  
2018**

**Ana Carolina Donofre  
Zootecnista**

**Estímulos sonoros na incubação artificial de ovos: efeitos na eclosão,  
desempenho produtivo e comportamento pós-eclosão de pintos de corte**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **IRAN JOSÉ OLIVEIRA DA SILVA**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciências. Área de concentração:  
Engenharia de Sistemas Agrícolas

**Piracicaba  
2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Donofre, Ana Carolina

Estímulos sonoros na incubação artificial de ovos: efeitos na eclosão, desempenho produtivo e comportamento pós-eclosão de pintos de corte / Ana Carolina Donofre. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

130 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Bioacústica 2. Eclodibilidade 3. Nível de pressão sonora 4. Zootecnia de precisão I. Título

## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) por me acolher como uma de suas “filhas” ao longo do meu mestrado e doutorado;

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Sistemas Agrícolas e a todos os envolvidos nele que com seriedade formam mestres e doutores capacitados e respeitados;

Ao meu orientador Professor Iran José Oliveira da Silva pelos sete anos de parceria. Pelos ensinamentos que mediaram meu crescimento pessoal/profissional. Agradeço por confiar em mim e em meu trabalho;

Às agências de fomento que financiaram a pesquisa. À FAPESP (em especial), CAPES e CNPQ, que ainda acreditam e defendem a pesquisa científica nacional, mesmo em tempos incertos;

Ao incubatório da Flamboiã Alimentos® que mais uma vez, com confiança, abriu suas portas auxiliando grandemente em nosso trabalho;

À minha família. Meus pais Ricardo e Rosa, minha irmã Laura, minhas avós Ruth e Celeste (*in memoriam*), ao meu avô Geraldo (*in memoriam*) e a minha sogra Neuza, pela base e amor incondicional;

Aos meus companheiros de trabalho do NUPEA (2011 - 2018), com os quais dividi uma sala, os almoços, experiências, sonhos e parte da minha vida nestes últimos anos. Agradeço a todos por estarem comigo nessa trajetória a tornando mais prazerosa. Aos antigos: Ariane, Fernanda, Ilze, Maria, Patrycia, Paulo e Dani; e aos de agora: Miguel, Serginho, Aérica, Simone e Giovanni.

Às muitas pessoas que em algum momento me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial: aos professores Vicente e Antônio pelos conselhos e soluções, ao Áureo e Juarez, aos estagiários do Treina Nupea 2017 e aos estagiários do NUPEA (Ana Paula, Bárbara, Jean e Joana);

Por fim, deixo um agradecimento especial ao meu marido Iuri. Meu companheiro de muito tempo. Obrigada pelo amor, paciência e dedicação na construção da nossa família. Obrigada pelo apoio estatístico e emocional na elaboração deste trabalho. Obrigada por estar ao meu lado mais uma vez.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
Referências .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1. A incubação artificial .....	15
2.1.1. Premissas .....	15
2.1.2. A indústria imitando a natureza .....	16
2.1.3. Além da temperatura, umidade e viragem dos ovos .....	18
2.2. Estímulos sonoros na incubação de ovos férteis .....	20
2.2.1. O porquê da estimulação sonora .....	20
2.2.2. O sistema auditivo das aves .....	21
2.2.3. Aspectos físicos da audição.....	22
2.2.4. A estimulação sonora na incubação de ovos férteis .....	24
Referências .....	32
<b>3. SENSOR PARA ESTIMAR O NÍVEL DE PRESSÃO SONORA EM OVOS</b> .....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1. Introdução .....	41
3.2. Material e Métodos.....	43
3.2.1. Desenvolvimento do sensor .....	43
3.2.2. Calibração e conversão dos sinais elétricos do sensor.....	45
3.2.3. Aplicação do sensor desenvolvido .....	46
3.3. Resultados e Discussão.....	48
3.3.1. Calibração e conversão dos sinais elétricos do sensor.....	48
3.3.2. Aplicação do decibelímetro miniaturizado em testes com ovos .....	51
3.4. Conclusões .....	54
Referências .....	54
<b>4. ESTÍMULOS SONOROS NA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL: EFEITOS NO CRESCIMENTO EMBRIONÁRIO E NA ECLOSÃO DE PINTOS DE CORTE</b> .....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
4.1. Introdução .....	58
4.2. Material e Métodos.....	59
4.2.1. Tratamentos e delineamento experimental .....	59
4.2.2. Incubações experimentais.....	61
4.2.3. Variáveis resposta.....	62
4.2.4. Análise estatística .....	65
4.3. Resultados e Discussão.....	66
4.3.1. Respostas pré-eclosão .....	66

4.3.2. Respostas da eclosão.....	69
4.3.3. Discussão geral .....	79
4.4. Conclusões .....	81
Referências.....	81
<b>5. ESTÍMULOS SONOROS NA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL E OS EFEITOS NO DESEMPENHO DE PINTOS DE CORTE .....</b>	<b>87</b>
Resumo .....	87
Abstract.....	87
5.1. Introdução.....	88
5.2. Material e Métodos .....	89
5.2.1. Tratamentos, incubações e alojamento dos pintos.....	89
5.2.2. Variáveis resposta .....	92
5.2.3. Análise estatística .....	92
5.3. Resultados e Discussão .....	92
5.4. Conclusões .....	97
Referências.....	97
<b>6. COMPORTAMENTO DE PINTOS DE CORTE: OS REFLEXOS DA ESTIMULAÇÃO SONORA DA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL.....</b>	<b>101</b>
Resumo .....	101
Abstract.....	101
6.1. Introdução.....	102
6.2. Material e Métodos .....	103
6.2.1. A estimulação sonora na incubação artificial .....	103
6.2.2. Testes comportamentais.....	104
6.2.3. Análise estatística .....	108
6.3. Resultados e discussão .....	109
6.3.1. Teste de imobilidade tônica (IT).....	109
6.3.2 Teste de isolamento social (IS).....	113
6.3.3 Teste de campo aberto (CA).....	117
6.5. Conclusões .....	119
Referências.....	119
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>

## RESUMO

### **Estímulos sonoros na incubação artificial de ovos: efeitos na eclosão, desempenho produtivo e comportamento pós-eclosão de pintos de corte**

Os fatores físicos que envolvem a incubação artificial são determinantes no desenvolvimento embrionário, eclosão e desempenho das aves. Muitos deles são bem-conceituados, mas acredita-se que ainda existem questões que possam prover melhorias ou adaptar este processo as novas demandas da produção animal. Nesta pesquisa, a bioacústica é colocada como uma dessas questões, motivando a investigação da estimulação sonora na incubação artificial, dados os efeitos do ruído dos incubatórios comerciais e a adição de vocalizações da espécie em respostas fisiológicas, produtivas e comportamentais de pintos de corte. Inicialmente, o Capítulo 3 apresenta a mensuração do nível de pressão sonora (NPS) no interior dos ovos. Para isso, desenvolveu-se um sensor de tamanho reduzido (decibelímetro-miniaturizado) utilizando a plataforma Arduino®. O sensor foi calibrado e testado, o que forneceu informações como o isolamento da onda sonora pela casca dos ovos e valores de NPS próximos aos embriões. Em sequência realizaram-se incubações experimentais com a aplicação de tratamentos determinados pela associação de dois NPS do ruído de incubadoras [70 ou 90 dB (A)] com ou sem a adição de vocalizações da espécie (estímulos naturais). Estes tratamentos foram avaliados no crescimento embrionário e em respostas da eclosão (Capítulo 4) e no desempenho de pintos de corte na primeira semana (Capítulo 5). Diferente do esperado, a exposição ao maior NPS, que simulava o ruído de incubatórios comerciais, adiantou o tempo para o início das eclosões, aumentou a eclodibilidade e a qualidade do umbigo e jarretes dos pintos. Todavia, as vocalizações da espécie só se mostraram influentes se associadas ao NPS de 70 dB (A). Nas respostas de desempenho a exposição ao NPS inferior resultou em um maior consumo de ração e em uma pior conversão alimentar, com melhores resultados na exposição a 90 dB (A) ou na presença das vocalizações. Por fim, no Capítulo 6, testes comportamentais como o de imobilidade tônica, isolamento social e campo aberto foram realizados com os pintos eclodidos dos tratamentos de incubação descritos anteriormente. Na realização destes testes consideraram-se três períodos no pós-eclosão (24, 72 e 120 horas) e duas condições (testes em silêncio ou com vocalizações ao fundo). Os efeitos da estimulação sonora foram verificados somente em 24 horas pós-eclosão, de modo que a exposição às vocalizações no desenvolvimento embrionário reduziu a movimentação e o nível de vocalização dos pintos, o que foi associado ao menor estresse. Conclui-se que a estimulação sonora na incubação artificial é capaz de alterar respostas produtivas e o comportamento de pintos após a eclosão.

Palavras-chave: Bioacústica; Eclodibilidade; Nível de pressão sonora; Zootecnia de precisão

## ABSTRACT

### **Sound stimuli in artificial egg incubation: their effects on the hatching, productive performance and post-hatch behavior of broiler chicks**

The physical factors that involve artificial incubation are determinant to the embryonic development, hatching and performance of chicks. Although many of them are highly regarded, there are other issues capable of improving or adapting the process to new animal-production demands. The current research addresses the bioacoustics as one of such issues, which motivated the investigation of the sound stimuli in artificial incubation, relating the noise of the commercial hatcheries and the addition of vocalizations of the species with physiological, productive and behavioral of chicks. Initially, the Chapter 3 presents the measuring the sound pressure level (SPL) inside eggs. To do so, a small sensor (miniaturized decibel meter) was developed in the Arduino® platform. The sensor was calibrated and tested under specific conditions to collect information, such as sound wave isolation by egg shells and SPL values close to the embryos. Experimental incubations with treatments based on the association between two noise SPLs of the hatcheries [70 or 90 dB (A)] with, or without, the addition of species-specific vocalizations (natural stimulus). These treatments were evaluated on embryo growth and hatch responses (Chapter 4) and chicks performance in the first week of life (Chapter 5). Against all expectations, egg exposure to the highest SPL, which simulated the noise of commercial hatcheries, reduced the time necessary for hatching, besides increasing the hatchability, as well as the quality of the navel and hocks, of chicks. On the other hand, species-specific vocalizations were only influential when they were associated with 70 dB SPL (A). The exposure to lower NPS resulted in higher feed intake and lower feed conversion with better results in exposure to 90 dB (A) or in the presence of vocalizations. Finally, in Chapter 6, behavioral tests such as tonic immobility, social isolation and open field tests applied to chicks hatching from the incubation treatments described above. The tests comprised three post-hatching periods (24, 72 and 120 hours) and two conditions (silence or species-specific vocalizations in the background). The effects of incubation treatments were just observed in some responses and 24 hours after hatching. The exposure to the vocalizations during embryonic development reduced chicks' movement and vocalization level, which was associated with lower stress. It is concluded that sound stimulation in hatcheries can alter productive responses and behavior of chicks after hatching.

Keywords: Bioacoustics; Hatchability; Sound pressure level; Precision livestock



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelos de incubadoras comerciais do século XX. Fonte: SUTCLIFFE (1909) .	16
<b>Figura 2.</b> Princípios do estudo da estimulação sonora na incubação de ovos férteis .....	21
<b>Figura 3.</b> Fisiologia adaptativa dos embriões de aves sob condições anormais. Adaptado de GUSTIN (2003): Manejo da Incubação – 2ª Edição .....	27
<b>Figura 4.</b> Tipos de chamadas maternas. Adaptado de Collias e Joos (1953), Gill; Bierema (2013) e Edgar et al. (2016).....	29
<b>Figura 5.</b> Robô com movimentos e fonte de calor simulando a mãe (A). franjas utilizadas em um aviário comercial para simular o escuro e o calor da mãe (B).....	31
<b>Figura 6.</b> Organograma do projeto do sensor desenvolvido para esta pesquisa .....	43
<b>Figura 7.</b> Arduino® UNO R3. Fonte: Hjort; Holmberg (2015); Arduino® (2017) .....	44
<b>Figura 8.</b> Sensor desenvolvido: (1) microfones, (2) circuito amplificador, (3) placa Arduino® (A); ferramenta PLX-DAQ® utilizada na coleta dos dados (B) .....	44
<b>Figura 9.</b> Teste de aplicação do sensor para a obtenção do nível de pressão sonora no interior de ovos (A); detalhes de um ovo com microfone (B); fechamento com massa sintética (C) .....	47
<b>Figura 10.</b> Registros dos dados coletados pelos microfones do sensor desenvolvido e registros do decibelímetro comercial frente às variações de volume do som ambiente .....	48
<b>Figura 11.</b> Diagrama de dispersão para os sinais dos microfones 1 e 2 com coeficiente de correlação (r) de postos de Kendall .....	49
<b>Figura 12.</b> Ajuste do modelo polinomial de 5º grau para relacionar o sinal do sensor desenvolvido com o decibelímetro comercial, em que y é o sinal médio dos dois microfones (adimensional) e x é a medida do decibelímetro comercial em dB (A).....	50
<b>Figura 13.</b> Comparação das dimensões do microfone do sensor com o do decibelímetro comercial.....	51
<b>Figura 14.</b> Diferencial de NPS e valores percentuais de isolamento entre o ambiente externo e interno (i), considerando somente a casca (A); e entre o ambiente externo e a parte superior dos ovos integrais (B). Ambos para os dois NPS testados de 70 e 90 dB (A) .....	52
<b>Figura 15.</b> Incubadoras isoladas acusticamente (A); vista interna de uma incubadora com a caixa amplificadora (B); ovos incubados (C); controle da temperatura e umidade (D) .....	61
<b>Figura 16.</b> Resumo das variáveis resposta obtidas no experimento.....	63
<b>Figura 17.</b> Respostas pré-eclosão. Nesta imagem exemplifica-se uma coleta no 12º dia de incubação .....	63
<b>Figura 18.</b> Porcentagem de eclosões dos tratamentos de incubação a partir do 20º dia de incubação e em intervalos de 12 horas .....	71
<b>Figura 19.</b> Comparação das janelas de eclosão dos tratamentos com estimulação sonora .....	72
<b>Figura 20.</b> Conjunto de boxes de alojamento (A); detalhes para o círculo de proteção (B); separação pintos para o alojamento e pesagem na eclosão (C).....	91
<b>Figura 21.</b> Boxplot das respostas peso na eclosão (PE; g) (A) e peso final (PF; g) (B) para avaliação da uniformidade dos pintos em função dos tratamentos de incubação .....	94
<b>Figura 22.</b> Médias obtidas para o CMR (A) e para a CA (B), barras de erros-padrão e comparações realizadas pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os dois NPS e letras minúsculas entre a presença/ausência das vocalizações.....	95

<b>Figura 23.</b> Teste de imobilidade tônica (A); teste de isolamento social (B); teste de campo aberto (C) .....	104
<b>Figura 24.</b> Esquematização do aparato de realização do teste de campo aberto.....	107
<b>Figura 25.</b> Curvas de sobrevivência da primeira movimentação (A); retorno a posição de pé (B); e primeiro piado (C). Os períodos (dias) são apresentados em parcelas separadas. ....	110
<b>Figura 26.</b> Médias do tempo da primeira movimentação (TPM; s) dos tratamentos de incubação nos períodos 1,2 e 3, considerando a condição “S” (A) e a condição “C” (B)..	112
<b>Figura 27.</b> Médias e erros-padrão para o nível de vocalização (NV) nos períodos e tratamentos de incubação. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em períodos diferentes e letras minúsculas comparam os tratamentos em um mesmo período (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$ ).....	114
<b>Figura 28.</b> Médias e erros-padrão para o nível de vocalização (NV) nos períodos e condições de teste. Letras maiúsculas comparam as condições em períodos diferentes e letras minúsculas comparam as condições em um mesmo período (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) .....	115
<b>Figura 29.</b> Médias e erros-padrão para o nível de movimentação (NM) nos períodos e tratamentos de incubação. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em períodos diferentes e letras minúsculas comparam eles em um mesmo período (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) .....	115
<b>Figura 30.</b> Médias e erros-padrão para a comparação das condições, letras minúsculas comparam as mesmas (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) .....	116
<b>Figura 31.</b> Médias e erros-padrão da raiz quadrada da distância total (DT) nos períodos e tratamentos de incubação. Letras maiúsculas comparam um fator em períodos diferentes e letras minúsculas comparam os fatores em um mesmo período (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) .....	117
<b>Figura 32.</b> Médias e erros-padrão para a distância total percorrida (DT) nos períodos e condições de teste. Letras maiúsculas comparam as condições em períodos diferentes e letras minúsculas comparam as condições em um mesmo período (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) .....	118
<b>Figura 33.</b> Planta baixa do incubatório com destaque para as salas em que estavam as incubadoras caracterizadas (A); aferição do nível de pressão sonora (B).....	127
<b>Figura 34.</b> Caracterização do nível de pressão sonora dos tratamentos de incubação S1, S2, S3 e S4. As linhas finas indicam os valores de NPS obtidos na câmara de ar dos ovos com o sensor miniaturizado .....	129
<b>Figura 35.</b> Exemplos de anomalias que caracterizaram os pintos como descarte (PD; %): membros comprometidos (A); vísceras expostas (B).....	130
<b>Figura 36.</b> Escores da avaliação da qualidade do umbigo – QU (A); escores de avaliação da qualidade dos jarretes - QJ (B) .....	130

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Artigos que trataram da estimulação sonora na incubação artificial de espécies avícolas comerciais .....	25
<b>Tabela 2.</b> Estatísticas descritivas (médias e desvios-padrão) referentes a calibração do sensor desenvolvido utilizando um decibelímetro comercial.....	49
<b>Tabela 3.</b> Estimativas, erros-padrão e teste e para os coeficientes do polinômio de quinto grau ajustado aos dados do sensor desenvolvido e decibelímetro comercial .....	51
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos tratamentos experimentais .....	59
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos tratamentos nas incubadoras em cada repetição (bloco).....	61
<b>Tabela 6.</b> Informações referentes as repetições de incubações .....	62
<b>Tabela 7.</b> Resumo da análise de variância (teste F e valores p) das respostas: perda de peso dos ovos (PPO; g), comprimento do embrião (CE; mm), peso do embrião (PE; g), peso relativo do embrião (PRE; %), peso do encéfalo (PEnc; g) e peso relativo do encéfalo (PREnc; %).....	67
<b>Tabela 8.</b> Médias do pré-eclosão, erros-padrão e comparações pelo teste t.....	67
<b>Tabela 9.</b> Médias e desvios-padrão do tempo de eclosão dos tratamentos.....	69
<b>Tabela 10.</b> Resumo da análise de variância <i>two way</i> não-paramétrica (teste F e valores p) para o início da eclosão (IE; h), término da eclosão (TE; h) e janela de eclosão (JE; h) ....	70
<b>Tabela 11.</b> Médias obtidas para os tempos de início de eclosão IE (h), erros-padrão e comparações pelo teste de Friedman.....	70
<b>Tabela 12.</b> Número de eclosões (E) e não eclosões (NE), chances de eclosão (CE), razão de chance (RC), estatística $\chi^2$ para o teste de independência entre o fator experimental e o evento de eclosão e probabilidade de significância (p).....	73
<b>Tabela 13.</b> Análise de deviance para o modelo binomial logístico ajustado aos dados de eclosão, com teste $\chi^2$ para a diferença de deviances .....	74
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros que explicam a não eclosão dos ovos nos tratamentos avaliados	74
<b>Tabela 15.</b> Resumo da análise de variância (teste F e valores p) para as respostas fisiológicas temperatura cloacal (TClo; °C) e nível de corticosterona plasmática (CORT; ng/mL) .....	75
<b>Tabela 16.</b> Total de anomalias (pintos de descarte) para as oito repetições realizadas ....	77
<b>Tabela 17.</b> Resumo da análise de variância (teste F e valores p) para os escores médios de qualidade de umbigo (QU) e qualidade dos jarretes (QJ) .....	78
<b>Tabela 18.</b> Médias obtidas para os escores de qualidade do umbigo e jarretes, erros-padrão e comparações realizadas pelo teste de Tukey .....	78
<b>Tabela 19.</b> Informações referentes às repetições experimentais .....	90
<b>Tabela 20.</b> Resumo da análise de variância (teste F e valores p) das respostas de desempenho peso na eclosão (PE; g), peso final (PF; g), ganho de peso (GP; g), consumo de ração (CR; g) e conversão alimentar (CA) .....	93
<b>Tabela 21.</b> Quantificação dos testes comportamentais e quantidade de aves, para cada situação de avaliação (A e B), dentro de cada período (1, 2, 3).....	105
<b>Tabela 22.</b> Padrões de resposta adotados no teste de isolamento social.....	107
<b>Tabela 23.</b> Análise do tempo para as respostas latência até a primeira movimentação, retorno à posição de pé e primeiro piado.....	111
<b>Tabela 24.</b> Caracterização do nível de pressão sonora em dB (A)* das incubadoras comerciais, nas posições: porta (P), meio (M) e fundo (F).....	128

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura de corte é uma das cadeias mais desenvolvidas da produção animal. Sem fronteiras tecnológicas e com um forte dinamismo entre as etapas produtivas, em menos de 45 dias um lote de frangos estará pronto e abrindo espaço para o início de um novo ciclo. Toda a evolução da avicultura fez sua história a partir da década de 60 e a produção de frangos, então, ganhou impulso. Surgiram novas tecnologias, ampliaram-se os cuidados quanto à nutrição e à sanidade animal e a importação de linhagens comerciais aprimorou o plantel avícola. O sistema se segregou e se organizou em setores ressaltando, por exemplo, a importância dos matrizeiros e incubatórios.

Os incubatórios serão o cerne deste estudo. Tal setor cumpre o seu papel de receber e transformar ovos férteis no material de partida para um novo ciclo de produção, ou seja, os pintos de corte. Cerca de bilhões de frangos são produzidos por ano, com a exclusiva dependência da produção de pintos “chocados” artificialmente. A produção de frangos tende a crescer cada vez mais e a produção de pintos de um dia também, exigindo capacidade e eficiência dos incubatórios.

O potencial brasileiro de produção de pintos de corte em 1989 era de cerca de 1,5 bilhões e em 20 anos atingiu a marca de 6 bilhões. Em 2015, a produção de pintos registrou 6,5 bilhões de cabeças, com um crescimento de 4,5% em relação a 2014. Em 2016, esse setor cresceu ainda mais, decorrente da manutenção da demanda por carne de frango que chegou a 13,14 milhões de toneladas (UBABEF, 2011; ABPA, 2016).

O período de 21 dias representa 40% do tempo de vida total de um frango que hoje é abatido com um pouco mais de um mês. Disto, conclui-se que o desenvolvimento embrionário das aves seja extremamente rápido e tudo o que ocorre na incubação está estreitamente relacionado com este processo e com a manutenção do embrião, cujas consequências podem induzir às respostas na eclosão afetando a viabilidade e a produtividade das novas aves.

A técnica da incubação artificial não é nova, desde muito tempo manipula-se este processo para a obtenção de muitas aves em um curto intervalo de tempo, de modo que um dos aspectos mais importantes é o controle do ambiente físico. Partira-se do princípio de que todo e qualquer estímulo do ambiente pode

influenciar no desenvolvimento embrionário das aves. Portanto, ressalta-se que todos os fatores inerentes à incubação devem ser explorados de forma integral. Têm-se o conhecimento dos claros efeitos que a temperatura, a umidade e a concentração de gases podem exercer, mas isso ainda é pouco para o futuro da produção zootécnica que busca novas respostas e novas maneiras de produzir.

Desde o início, a ideia desta pesquisa foi ir mais além e abordar um efeito além dos já conhecidos na incubação. Dentre os vários fatores, o escolhido foi o som. Já é bem documentado que o ruído é uma fonte de estresse e que os sons rítmicos são fisicamente e mentalmente favoráveis para muitos dos seres vivos, incluindo os animais de produção em sua fase pré-natal. Embriões de mamíferos, por exemplo, são capazes de responder a uma música ainda no ventre materno e isso ocorre também para as aves, que, além de tudo, se desenvolvem em um ovo.

Os embriões de aves desenvolvem precocemente seu sistema auditivo e são capazes de processar sons externos antes de eclodirem. Na presença de uma galinha, os sons emitidos por ela têm um papel importante nos aspectos comportamentais das crias, como a capacidade de adaptação e melhores respostas após a eclosão. Entretanto, a incubação, em seu processo industrial, trocou esses sons naturais da mãe chocando seus ovos pelo “barulho” intenso e constante das incubadoras, que garantem a manutenção da temperatura para o desenvolvimento embrionário das aves.

Assim surgiram algumas questões: a incubação artificial que conhecemos hoje poderia ser remodelada com a inclusão do som como uma nova variável? O ruído dos incubatórios comerciais poderia ser reduzido, caso efeitos negativos fossem comprovados? Vocalizações da espécie poderiam ser adicionadas como uma proposta de melhoria do bem-estar no pós-eclosão das aves?

Acreditamos que a exposição pré-eclosão ao som possa decorrer em efeitos relevantes no desenvolvimento embrionário e vida pós-eclosão dos pintos de corte. Chega-se ao objetivo principal deste estudo: investigar os efeitos da estimulação sonora na incubação artificial de ovos, relacionando o ruído dos incubatórios comerciais e a adição de vocalizações da espécie com respostas fisiológicas, produtivas e comportamentais de pintos de corte.

Como objetivos específicos pretende-se:

1. Desenvolver um sensor para mensurar o nível de pressão sonora no interior de ovos destinados à incubação e obter informações sobre o isolamento da casca e magnitudes de NPS próximas ao embrião (Capítulo 3);
2. Avaliar o crescimento embrionário e respostas relacionadas à eclosão de pintos de corte que em sua vida embrionária foram expostos à diferentes estímulos sonoros (Capítulo 4);
3. Avaliar o desempenho na primeira semana de pintos de corte que em sua vida embrionária foram expostos à diferentes estímulos sonoros (Capítulo 5);
4. Avaliar o comportamento pós-eclosão, por meio de testes específicos, de pintos de corte considerando os efeitos residuais dos estímulos sonoros que estes receberam no desenvolvimento embrionário (Capítulo 6).

A presente tese é estruturada em seis Capítulos, os quais originarão os artigos científicos a serem publicados.

### **Referências**

ABPA. **Relatório Anual de 2016**. p. 136; 2016. Disponível em <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016>>. Acesso em 20 de junho de 2016.

UBABEF. **A saga da avicultura brasileira – como o Brasil se tornou o maior exportador de carne de frango**. Rio de Janeiro: insight; São Paulo: UBABEF, p.120, 2011.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A incubação artificial

#### 2.1.1. Premissas

Os incubatórios comerciais produzem diariamente milhares de pintos de um dia que são destinados às granjas de criação. Neste contexto, a busca por índices produtivos cada vez melhores é incessante e inclui a maximização da eclodibilidade e a produção de aves de qualidade (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2007; KING'ORI, 2011; BERGOUG et al., 2013).

Tullet (1990), em “Science and the Art of Incubation”, retrata a incubação artificial como um processo cuidadoso e extraordinário por resultar com grande eficiência no nascimento de um animal, utilizando-se de meios não naturais. Para iniciar esta discussão três princípios descritos por Brake (1997) e Ricks et al. (2003) são imprescindíveis: (1) o desenvolvimento embrionário de uma ave ocorre fora do corpo materno; (2) o tempo de incubação é extremamente rápido, de apenas 21 dias; (3) e o ambiente físico exerce grande influência na incubação.

O ovo fértil é protegido por uma casca e internamente possui uma grande quantidade de albúmen e uma gema rica em nutrientes (BRAKE et al., 1997; PERUZZI et al., 2012; RIDEOUT, 2012). Mesmo isolado, o meio interno do ovo está sujeito às variações do ambiente, sendo passível de alterações que podem comprometer os aspectos que regem o desenvolvimento embrionário. Basicamente, enquanto o ovo fornece suporte para o embrião, o ambiente pode alterar as trajetórias fisiológicas e regulatórias do desenvolvimento (DECUYPERE et al., 2001; TONA et al., 2005a; KING'ORI, 2011; TZSCHENTKE, 2012).

Em tese, o ambiente físico não seria um problema para a produção de pintos de corte, visto que este é cuidadosamente controlado pelo processo de incubação artificial. De acordo com Decuypere et al. (2001) e Bergoug et al. (2013), os incubatórios possuem máquinas capazes de fornecer condições ideais para o desenvolvimento embrionário de espécies avícolas comerciais. Há o controle da temperatura, umidade, viragem dos ovos, concentração de gases, etc.

Conhecer os fatores que influenciam a produção de pintos de corte é determinante na lucratividade dos incubatórios. Neste contexto, é importante frisar

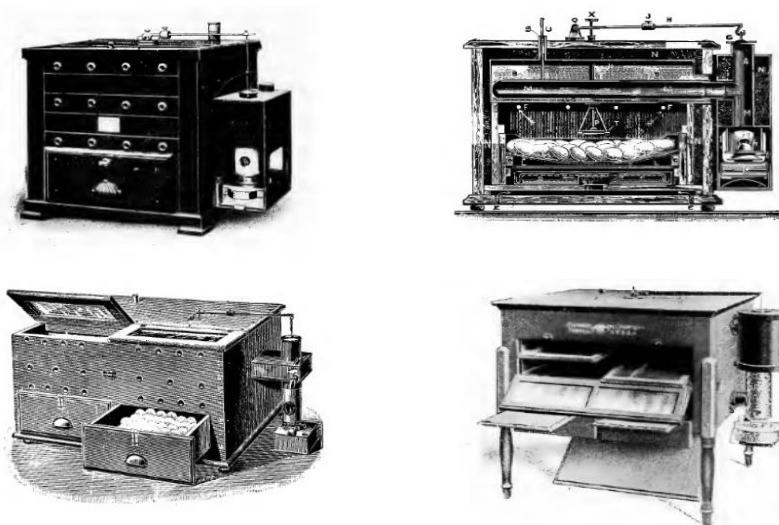


que os resultados da incubação não dependem somente das taxas de eclosão e mortalidade, mas da qualidade das aves recém-eclodidas também (TONA et al., 2005a; DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2007). Considera-se que todos os padrões de desempenho na granja, saúde, viabilidade, produtividade e qualidade física e microbiológica das aves tragam reflexos dos pintos recebidos dos incubatórios (OVIEDO-RONDÓN, 2013; SOZCU; IPEK, 2015).

Na incubação artificial se trabalha com o intuito de otimizar a eclosão e a qualidade dos pintos. Cabe a este trabalho continuar com essa linha e adentrar mais afundo neste processo, em busca de outros fatores que também possam influir no desenvolvimento embrionário.

### 2.1.2. A indústria imitando a natureza

A prática de produzir aves artificialmente data de 3.000 anos, iniciada pelos egípcios e chineses. Os ovos eram colocados em esterco, que, com o processo de fermentação aquecia os mesmos e garantia a eclosão. Já as primeiras incubadoras são citadas como grandes edifícios de tijolos de barro, subdivididos em pequenos quartos aquecidos por meio de fornos de carvão (SUTCLIFFE, 1909; PANIAGO, 2005; DECUYPERE et al., 2013). Com o passar do tempo, elas evoluíram e no século XX já era possível encontrar diferentes modelos, descritos por Sutcliffe (1909) como modernos e eficientes para a época (Figura 1).



**Figura 1.** Modelos de incubadoras comerciais do século XX. Fonte: SUTCLIFFE (1909)

A primeira incubadora elétrica foi desenvolvida pelo engenheiro norte-americano Peter Sime em 1922 e o advento de termostatos auxiliou demasiadamente neste processo (DECUYPERE et al., 2013). Posteriormente, grandes máquinas acrescidas de tecnologia no controle do ambiente físico e da capacidade de incubar de uma única vez milhares de ovos começaram a ser projetadas (RICKS et al., 2003; PANIAGO, 2005; MOLENAAR et al., 2010).

A evolução da incubação artificial pode ser remetida ao progresso da indústria avícola, que ocorreu a partir de 1960. A produção de carne de frango aumentou e as consequências foram refletidas na capacidade das incubadoras que tiveram que se adaptar para suportar este crescimento (UBABEF, 2011).

Segundo Virgini (2013), as incubadoras comerciais são classificadas em: prateleira de estágio múltiplo; carrinho de estágio múltiplo; e carrinho de estágio único. Peruzzi et al. (2012) e Oviedo-Rondón (2013) mencionam que o estágio múltiplo, com diferentes lotes de ovos entrando e saindo simultaneamente, é o mais utilizado nos incubatórios comerciais. Ademais, no estágio múltiplo, aos 18 ou 19 dias de incubação, os ovos são transferidos das incubadoras para os nascedouros. As condições dos nascedouros são similares e um dos principais motivos desta transferência baseia-se no aumento do espaço para a eclosão e em um maior controle sanitário (VIRGINI, 2013; VAN de VEN et al., 2009).

O que esperar do futuro da incubação? Sem dúvidas, a automação que irá assumir a maioria das etapas executadas manualmente, como a vacinação, separação das aves das cascas vazias e dos ovos não eclodidos. Para Oviedo-Rondón (2013), a tendência será a concentração da incubação em centros maiores, com a utilização de equipamentos automatizados para o manejo dos ovos e aves, além de sistemas de climatização mais eficientes. Decuyper et al. (2013) já apontam a utilização de sensores colocados nos embriões para o controle da temperatura das incubadoras, medição automática do peso dos ovos para o controle da umidade e detecção da bicagem para otimização da janela de eclosão.

Independente de toda evolução uma coisa é fato: desde os quartos de tijolos até as grandes e tecnológicas incubadoras/nascedouros, o princípio é o mesmo: fornecer aos ovos condições semelhantes àquelas fornecidas pela galinha no choco (TULLET, 1990). O choco é uma característica herdada, que, segundo Broom e Fraser (2010), resume-se em um período de suspensão da postura e de permanência da galinha no ninho para aquecer e cuidar dos ovos. Para King'ori

(2011), a galinha consegue mediar o que os ovos precisam, espalhando suas asas e penas sobre eles para mantê-los aquecidos. Com o bico e movimentos corporais vira cada um, ora envolvendo alguns com suas penas inferiores, ora envolvendo outros, para que todos possam entrar em contato com o calor do seu corpo.

Na incubação artificial, vários fatores rigidamente controlados na natureza são reproduzidos com mais eficiência. Mas nem todos os componentes naturais estão presentes nas máquinas incubadoras e linhagens comerciais de hoje, o que foi mencionado por Archer et al. (2009), King'ori (2011) e Tefera (2012). Chega-se a um importante ponto de discussão desta pesquisa, que a impulsiona em ir além do que já se sabe sobre a incubação.

### **2.1.3. Além da temperatura, umidade e viragem dos ovos**

A incubação artificial permitiu que a avicultura de corte aumentasse significativamente o seu potencial produtivo. A eficiência deste processo, segundo Peruzzi et al. (2012) e Bergoug et al. (2013), depende de muitos fatores, em especial, do ambiente físico. Uma imensidade de parâmetros ambientais pode afetar o desenvolvimento embrionário e a eclosão dos pintos de corte. Por muito tempo, a grande preocupação da indústria foi o controle da temperatura, umidade relativa, viragem dos ovos e troca de gases nas incubadoras (TONA et al., 2005a; MEIJERHOF, 2003; DIXON et al., 2016; REIJIRINK; VAN der POL, 2016).

A temperatura é descrita como o fator mais importante e não se discorda. A embriogênese das aves está diretamente relacionada a uma faixa que se situa entre 37,5 e 38 °C (DECUYPER et al., 2013; MOLENAAR et al., 2010; BERGOUG et al., 2013). Taxas de mortalidade embrionária, alterações no peso das aves e dos órgãos, qualidade do umbigo e desempenho pós-eclosão podem ser influenciadas por temperaturas de incubação que se situam fora destes valores críticos (MEIJERHOF, 2003; SOZCU; IPEK, 2015).

Paralelamente, a umidade relativa do ar irá determinar a perda de água dos ovos, que deve ser de 12 a 14% (DECUYPERE et al., 2003; MEIJERHOF, 2003). Se a umidade estiver abaixo do ideal, essa perda será excessiva e comprometerá o desenvolvimento embrionário. Ao contrário, no excesso, os poros da casca se fecharão, afetando a respiração e a viabilidade das aves (DECUYPERE et al., 2003; OVIEDO-RONDÓN; MURAKAMI, 1998).

Outros pontos bem determinados na incubação artificial são a viragem dos ovos e a troca de gases. A viragem é um fenômeno natural realizado pelas galinhas, inserido na incubação artificial de forma mecânica. Segundo Decuypere et al. (2003) e Tona et al. (2005b), este mecanismo é fundamental ao desenvolvimento embrionário e está relacionado com a redução do mal posicionamento e incidências de adesão do embrião na casca. Além disso, permite a distribuição equilibrada dos nutrientes do albúmen para o embrião (GONZALES, 2003). Em relação a troca de gases, sabe-se que existe um fluxo de vapor d'água, oxigênio e dióxido de carbono pela casca e que níveis de ventilação e a condição do ar irão manter isso dentro do esperado (MEIJERHOF, 2003).

Os parâmetros físicos apresentados são bem relatados e abordados na incubação artificial. Por ora, não cabe aprofundar-se demasiadamente neles. De acordo com Oviedo-Rondón (2013), novos desafios devem ser abordados e, junto com as informações Decuypere (2003), apontam-se algumas tendências:

- I. Trabalhar com os reflexos da incubação em respostas produtivas no pós-eclosão: viabilidade, crescimento, reprodução e conversão alimentar;
- II. Conhecer mais os processos biológicos que ocorrem durante a embriogênese e manipulação do desenvolvimento;
- III. Adicionar questões relacionadas ao bem-estar e ao comportamento natural das aves na incubação artificial.

Para Molenaar et al. (2010) e Ozkan et al. (2012), outros fatores do ambiente também necessitam de uma investigação mais profunda na incubação. Chega-se a um ponto em que novas hipóteses precisam ser levantadas e testadas, o que motiva essa discussão a ir “além da temperatura, umidade e viragem dos ovos”. Por exemplo, industrialmente os ovos são incubados no escuro, no entanto, alguns resultados têm demonstrado que a estimulação luminosa é capaz de acelerar o desenvolvimento embrionário e melhorar repostas produtivas, fisiológicas e comportamentais das aves recém-eclodidas (ROZENBOIM et al., 2004; ARCHER et al., 2009; ARCHER; MENCH, 2013). Ozkan et al. (2012) e Huth; Archer (2015) descobriram que a luminosidade na incubação pode resultar em

menos estresse e melhor adaptação das aves ao ambiente pós-eclosão. Assim como a luz, o ambiente acústico (bioacústica) é apontado como mais um fator considerável na incubação artificial de ovos, sendo o foco desta revisão e deste estudo como um todo.

## **2.2. Estímulos sonoros na incubação de ovos férteis**

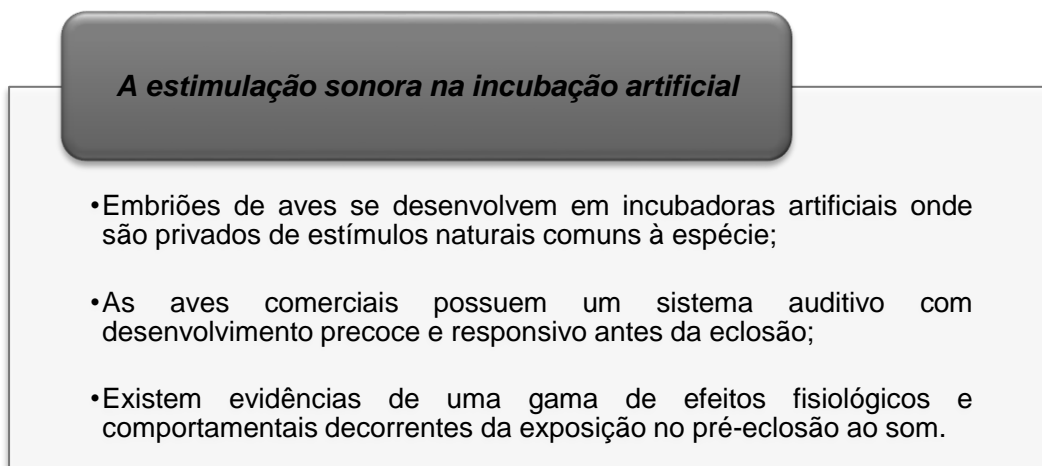
### **2.2.1. O porquê da estimulação sonora**

Segundo Tong et al. (2013), a capacidade de um embrião responder ao ambiente de incubação e ajustar o seu desenvolvimento é fundamental. Assim, partira-se do princípio de que todo e qualquer estímulo possa se relacionar com a formação e integração de seu organismo.

Tzschentke (2012) explica que o desenvolvimento embrionário das aves é um processo complexo e dependente da interação de fatores genéticos e ambientais. O mesmo afirma que para que haja um estado ótimo, as aves precisam da estimulação ambiental, particularmente nos últimos dias de incubação, um período em que muitos mecanismos fisiológicos estão em fase final de formação. Tzschentke (2012) cita como exemplos de estímulos embrionários as variações de temperatura, utilização de ciclos de claro e escuro e a aplicação de sons.

Não são poucos os estudos que trazem o ambiente acústico pré-natal como uma variável importante e influente para os animais, sejam aves ou mamíferos. No caso das aves, a audição é o segundo sentido mais importante, além do fato de que o sistema auditivo delas é desenvolvido precocemente, permitindo que, mesmo na vida embrionária, haja recepção e resposta aos estímulos acústicos (GRIER et al., 1967; ALLADI et al., 2002; DOOLING, 2002; JONES et al., 2006; RUMPF; TZSCHENTKE, 2010; KESAR, 2013).

Para continuar esta discussão na Figura 2 são apresentados os três princípios que ressalvam o “porquê da estimulação sonora na incubação de ovos férteis”, que serão mais desenvolvidos nos próximos tópicos.



**Figura 2.** Princípios do estudo da estimulação sonora na incubação de ovos férteis

### 2.2.2. O sistema auditivo das aves

Para que ocorra a percepção e a comunicação acústica ainda no período de desenvolvimento embrionário das aves comerciais, uma primeira condição é necessária: a sensibilidade auditiva dos embriões. E isso é possível? Sim, visto que estes animais ouvem e são capazes de produzir e perceber sons antes mesmo da eclosão, o que foi provado em pesquisas como a de Jones et al. (2006), que trata propriamente da emergência da audição em *Gallus gallus domesticus*.

As aves possuem dois ouvidos desprovidos de um pavilhão auditivo. As penas ao redor do meato acústico (abertura auditiva) canalizam as ondas sonoras para o ouvido médio, onde está a membrana timpânica. A recepção do som por essa membrana faz vibrar um único ossículo com dois subcomponentes, a columela e a subcolumela, responsáveis por transmitir as vibrações recebidas para a cóclea (ouvido interno). O ouvido interno desencadeia a análise inicial das ondas sonoras, por meio de inúmeras células receptoras ciliadas, ou seja, terminações nervosas que traduzem o som em potenciais de ação para o nervo auditivo do encéfalo (MFILLER; SCHEICH, 1985; KIEFER; 1999; KUBKE; CARR, 2000).

O grande ponto desta discussão é que a audição destes animais se inicie no período embrionário. Em cerca de 48 horas o coração do embrião já está batendo e o sistema nervoso central progride substancialmente até a eclosão. Ao longo disto, os mecanismos sensoriais tornam-se evidentes e funcionais, na sequência: tato, audição, visão e olfato (HAMBURGER; HAMILTON, 1992; MELLOR; DIESCH, 2007; TONG et al., 2013).

Segundo Tong et al. (2013) a diferenciação citológica das células receptoras ciliadas ocorre entre o 8º e o 10º dia de incubação. Lembrando que são estas as células que codificam o sinal sonoro e intermediam o sistema auditivo com o nervoso. Jones; Jones (1995) e Jones et al. (2006) observaram que, apesar do desenvolvimento, a audição efetiva se inicia em torno do 15º dia de desenvolvimento. O que levou Jones et al. (2006) a dividirem o desenvolvimento da audição das aves em dois períodos: o da pré-audição e o de audição já efetiva. Deste modo, sugere-se que a diferenciação e as primeiras atividades nervosas das células ciliadas da cóclea ocorram entre o 10º e o 15º de incubação, o que seria considerado como o primeiro período. Entre 16º e 19º dia, o sistema auditivo estaria pronto para detectar e codificar o som de forma completa, ou seja, o marco da audição verdadeira destes animais (JONES et al., 2006; KESAR, 2013).

### **2.2.3. Aspectos físicos da audição**

Perante o exposto, afirma-se que as aves ouvem antes mesmo de eclodirem. Mas aqui cabe outra questão: o que podemos considerar como audição? Dooling (2002) afirma que ouvir é a capacidade que um organismo vivo tem em perceber um som e responder a ele. Assume-se que o som tenha uma variedade de efeitos nos animais, que, para Cheng et al. (2010) e Brouček (2014) podem mediar padrões físicos e psicológicos destes.

O som é descrito como uma onda longitudinal que culmina com variações de pressão em um meio, como o ar, água, ou um sólido (HALLIDAY et al., 2012). A sensibilidade e a percepção a uma onda sonora por um organismo dependem de propriedades físicas, como a intensidade, frequência, duração da exposição, estado fisiológico, etc. (CASTELHANO; BAUMANS, 2009; BROUČEK, 2014).

A frequência ( $f$ ) é o número de oscilações por segundo do movimento vibratório do som no meio de propagação, cuja unidade é determinada em Hertz (Hz). Os sons são complexos e tratam-se de combinações de várias frequências superpostas. Se designam por sons audíveis aqueles que uma determinada espécie é capaz de ouvir, por exemplo, o aparelho auditivo humano está limitado a ouvir frequências entre 20 Hz e 20.000 Hz (HALLIDAY et al., 2012). Tal limitação é dada pela ativação das fibras nervosas auditivas, associadas às células ciliadas da

cóclea. Resumidamente, para essa espécie não ocorre a vibração das células auditivas para sons abaixo de 20 Hz ou acima de 20.000 Hz (JONES et al., 2006).

Autores como Kiefer (1999), Dooling (2002) e Jain et al. (2004) explicam que as aves, em geral, limitam-se a uma faixa de frequências entre 100 Hz (sons graves) e 6000 Hz (sons agudos), com sensibilidade máxima entre 800 Hz e 2000 Hz (HOU et al., 1973). Ainda, acredita-se que, no período inicial de desenvolvimento, os embriões sejam sensíveis somente às frequências mais baixas (100 a 1600 Hz), tornando-se maduros e aptos às frequências mais altas a partir do 16º dia de incubação (JONES; JONES, 1995; JAIN et al., 2004).

Segundo Fernandes (2002), a intensidade do som é a quantidade de energia contida no movimento vibratório da onda sonora que pode ser quantificada pela pressão que está exerce no meio em que se propaga. Esta medida traz a intensidade que um som é percebido pelo ouvido, definindo se este é fraco ou forte, o que se denomina popularmente por volume. O último autor exemplifica a intensidade do som para a audição dos humanos, os quais são capazes de perceber variações de  $10^{-16}$  W/cm<sup>2</sup> (limiar de audibilidade) a até  $10^{-2}$  W/cm<sup>2</sup> (limiar da dor), uma diferença de cem trilhões de vezes em escala linear.

As demais espécies animais apresentam um limiar de audição semelhante ao dos humanos. Por se tratar de uma faixa muito ampla, a intensidade sonora é convencionalmente empregada em escala logarítmica e passa a ser denominada de nível de intensidade/pressão sonora, cuja unidade é conhecida como decibel (dB) (BROUČEK, 2014). Nesta escala, Brouček (2014) informa que a maioria dos organismos respondem a níveis de 0 dB a até 140 dB. No caso das aves domésticas, Chloupek et al. (2009), em seu estudo levanta uma série de efeitos danosos decorrentes da exposição superior a 80 dB.

Associando-se o nível de pressão sonora com a gama de frequências audíveis de uma espécie, chega-se ao conceito de audibilidade. De acordo com Dooling (2002), eis uma das medidas mais representativas da sensação auditiva de um organismo, que pode ser visualizada por meio de curvas que variam de espécie para espécie. Basicamente, a curva de audibilidade traz que a sensibilidade do ouvido muda em função da frequência do som. Castelhana; Baumans (2009) complementam que aspectos intrínsecos aos próprios organismos (espécie, idade e estado fisiológico) e a experiência prévia influenciam no modo em que um animal percebe o som. Tal fato, naturalmente garante uma certa subjetividade e alguns



desafios na determinação de aspectos relacionados à audição dos animais, como o caso das aves. Isso embarga a necessidade de mais informações e comparações com pesquisas já realizadas.

#### **2.2.4. A estimulação sonora na incubação de ovos férteis**

Há tempos relatou-se uma preocupação de produtores de frangos com as bases aéreas nas proximidades de suas produções, eles acreditavam que o barulho provocado pelos aviões poderia afetar a eclodibilidade de ovos incubados (STADELMAN, 1958). Em sequência, Grier et al. (1967) sugeriram com mais propriedade que a estimulação sonora teria efeitos no desenvolvimento embrionário das aves. A hipótese destes últimos autores teve fundamento e como resultados eles reportaram a “nítida atração” dos pintos recém-eclodidos pelo mesmo estímulo que receberam no período embrionário, provando que as funções do sistema auditivo se desenvolvem antes da eclosão e, talvez mais importante, que estes eventos podem influenciar em muitas questões da vida pós-eclosão.

Neste histórico, cabe apresentar a proposta de Foster et al. (1995) que resultou em na patente, US5383424 – A, com uma sequência de gravações com vocalizações naturais para serem utilizadas na incubação artificial, alegando que isso poderia melhorar a quantidade e a qualidade de pintos eclodidos, além de alterar o tempo de eclosão e reduzir o estresse das aves no início de suas vidas.

O estudo sobre o efeito do ambiente acústico no desenvolvimento embrionário das aves não parou por aí. Recentemente, Mariette; Buchanan (2016) tiveram os resultados de sua pesquisa bastante divulgados. Estes autores provaram que os embriões de mandarim podem receber e codificar sons externos e de que os pais podem usar destas capacidades para alterar trajetórias de desenvolvimento de sua prole. Em uma entrevista à BBC News (Zebra finch “heat song” changes hatching development: JONATHAN WEBB, 2016), enfatizaram que o som pré-eclosão teria mais impacto nas aves do que os mesmos imaginavam.

A Tabela 1 traz as principais referências que avaliaram a estimulação sonora na incubação, seguidas de seus objetivos.

**Tabela 1.** Artigos que trataram da estimulação sonora na incubação artificial de espécies avícolas comerciais

Referência	Local de publicação	Objetivos
WADHWA et al. (1999)	Int. J. Devl. Neuroscience	Avaliar a estimulação sonora no desenvolvimento dos núcleos auditivos do tronco encefálico. Tratamentos: controle, incubadora com som atenuado e grupos com vocalizações da espécie e música sitar - 65 dB (A)
ALLADI et al. (2002)	Neuroscience	Avaliar a estimulação pré-natal na expressão de proteínas sinápticas dos núcleos auditivos do tronco cerebral. Os embriões ( <i>Gallus domesticus</i> ) receberam sons de chamadas da espécie e notas musicais de Sitar – 65 dB (A).
JAIN et al. (2004)	Indian J. Physiol. Pharmacol.	Avaliar as preferências auditivas pós-eclosão, em diferentes períodos (12 a 96 horas, pós-eclosão). Estimulação auditiva com chamadas maternas e música - 65 dB (A).
ALLADI et al. (2005)	Int. J. Devl. Neuroscience	Avaliar o efeito da estimulação sonora na morte celular apoptótica e expressão de Bcl-2 usando. Os embriões ( <i>Gallus domesticus</i> ) receberam sons de chamadas da espécie e notas musicais de Sitar – 65 dB (A).
VETERÄNY et al. (2005)	Journal of Agricultural Sciences	Estudo da utilização de som na incubação artificial considerando o peso do ovo. Utilização de um som artificial produzido por um gerador com variação de 10 a 20 dB (A)
CHAUDHURY et al. (2009)	Synapse	Investigar a densidade sináptica nas regiões dorsais e ventrais do hipocampo de pintos ( <i>Gallus domesticus</i> ) com estimulação auditiva pré-natal. Os tratamentos foram chamados da espécie e música sitar – 65 dB (A)
HARSHAW; LICKLITER (2011)	Devl. Psychobiology	A exposição de embriões de codorna ( <i>Coturnix japonica</i> ) às vocalizações da espécie a 65 dB (A) aumentou significativamente a preferência por estas chamadas após a eclosão das aves
KAUSER et al. (2011)	Devl. Neuroscience	Estudo da estimulação sonora na incubação artificial com música rítmica - 65 dB - na aprendizagem espacial, memória e estresse ao isolamento de pintos de corte ( <i>Gallus domesticus</i> ).
SOLDATOVA (2011)	Russian J. of Devl. Biology	Avaliar a influência acústica em processos metabólicos no período final de incubação com sons de embriões no momento da eclosão a 80 dB (A).
KESAR (2013)	J. Anatomical S. of Índia	Investigar o efeito do ruído crônico - 110 dB - no crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso na vida embrionário de pintos de corte ( <i>Gallus domesticus</i> ).
SANYAL et al. (2013a)	Plos One	Avaliar os efeitos de níveis sonoros elevados - 110 dB – de música rítmica e ruído nos níveis de noradrenalina plasmática, expressão de proteínas sinápticas no hipocampo e comportamento espacial dos pintos ( <i>Gallus domesticus</i> ) após a eclosão.
SANYAL et al. (2013b)	Int. J. Devl. Neuroscience	Determinar os efeitos da estimulação pré-natal ( <i>Gallus domesticus</i> ) com sons de buzina (ruído) e música sitar, a níveis elevados de pressão sonora - 110 dB - no número total de neurônios, área nuclear neuronal e volume de tronco cerebral.

Continuação Tabela 1

ROY et al. (2013)	Devl. Neurobiology	Avaliar a estimulação auditiva na modulação pós-eclosão e desenvolvimento do sistema auditivo e visual de pintos de linhagem comercial.
ROY et al. (2014)	J. Bioscience	Avaliar os efeitos da estimulação pré-natal com música na remodelação do córtex auditivo e no campo visual de pintos ( <i>Gallus domesticus</i> ). Tratamentos: música sitar -65 dB
TONG et al. (2015)	British Poultry Science	Investigar os efeitos da estimulação sonora com vocalizações da espécie - 72 dB - no desenvolvimento dos embriões, desempenho pós-eclosão e parâmetros sanguíneos.

Uma gama de pesquisas já foi desenvolvida abordando precisamente os efeitos da estimulação sonora no desenvolvimento de ovos incubados artificialmente. Muitos dos artigos apresentam um cunho mais fisiológico/anatômico, sobretudo, voltado para a neurologia. Sendo a espécie *Gallus gallus domesticus* utilizada como modelo de estudo, em função de seu rápido desenvolvimento embrionário e facilidade de manipulação dos embriões, como o explicado por Wadhwa et al. (1999), Alladi et al. (2002) e outros.

Percebe-se que foram testados diferentes tratamentos, que incluem tipos de estímulo sonoros (música rítmica, ruídos, e vocalizações da própria espécie) e combinações com níveis de pressão sonora “aceitáveis” ou “elevados”. No geral, os resultados retratam efeitos diretos do som no desenvolvimento embrionário de aves domésticas, o que está relacionado com a modulação do sistema auditivo e nervoso, com o comportamento, aprendizagem e preferências após a eclosão.

A pesquisa de Tong et al. (2015) foi a única que visou a aplicação deste estímulo na avicultura comercial, com a justificativa de que na incubação artificial componentes maternos foram eliminados. Estes avaliaram o efeito da adição de vocalizações naturais no tempo de eclosão, eclodibilidade, massa corporal, peso dos órgãos e parâmetros sanguíneos foram avaliadas, mas poucos efeitos significativos foram encontrados, o que foi contra a expectativa dos pesquisadores.

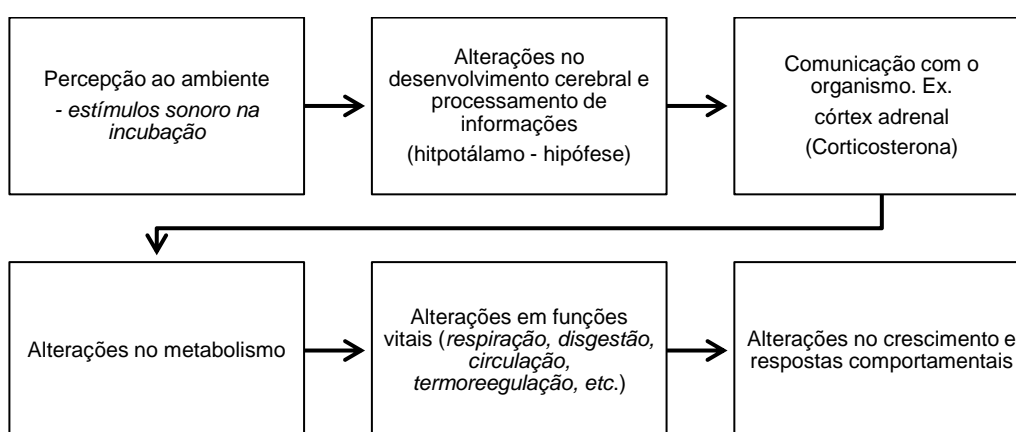
Outros trabalhos, como os de Jain et al. (2004), Harshaw; Lickliter (2011), Kauser et al. (2011) e até mesmo de Sanyal et al. (2013a) abordaram os efeitos da estimulação sonora recebida no período embrionário no comportamento pós-eclosão das aves. De um modo geral, estes autores concluem que a exposição ao som ainda na vida embrionária desempenha um importante papel no

desenvolvimento de preferências perceptivas e na capacidade do reconhecimento do mesmo som, bem como na redução de comportamentos de medo e fuga.

Kauser et al. (2011) e Roy et al. (2014) explicam que os efeitos da estimulação sonora na incubação dependem de fatores como o tipo de som, intensidade e frequência, além do tempo de estimulação. Por exemplo, o ruído é caracterizado como um estímulo negativo por se tratar de um som não periódico e sem harmonia, que muda em termos de frequência e intensidade constantemente. A exposição ao ruído na vida embrionária pode danificar o desenvolvimento cerebral, com a redução na quantidade e tamanho dos neurônios (KESAR, 2013).

Do ponto de vista fisiológico, qualquer mudança ambiental afeta criticamente o desenvolvimento do cérebro na vida embrionária dos animais, visto que, a atividade neural é impulsionada pelas experiências sensoriais que regulam e refinam os circuitos nervosos durante este desenvolvimento. Por isso, efeitos no pós-eclosão como a facilidade de aprendizado, melhor coordenação e orientação espacial são mencionados (CHAUDHURY et al., 2009; KAUSER et al., 2011).

Autores como Westman; Walters (1981) e Žikić et al. (2011) explicam que, quando o som é processado pelo sistema nervoso central ele altera o equilíbrio fisiológico dos animais, diante disto uma série de consequências podem ser observadas, como alterações cardiovasculares, hormonais e neurológicas, como demonstra a Figura 3, com adaptações do proposto por Gustin (2003).



**Figura 3.** Fisiologia adaptativa dos embriões de aves sob condições anormais. Adaptado de Gustin (2003): Manejo da Incubação – 2ª Edição

O cérebro é responsável por receber sinais internos/externos. Os neurônios recebem, identificam, interagem e interpretam estímulos sensoriais de entrada e em seguida produzem impulsos eletroquímicos que são transmitidos para os

órgãos efetores do corpo (músculos e glândulas), culminando com diferentes respostas (CHENG, 2010). Por mais, é válido reforçar que o sistema nervoso central apresenta uma notável plasticidade e pode ser significativamente alterado em função do ambiente, sobretudo, na fase de desenvolvimento destas estruturas (OLIVA et al., 2009; NAKAMORI et al., 2013). A maioria dos resultados referentes à estimulação sonora demonstra bem isso: os neurônios da área auditiva cerebral são susceptíveis às alterações decorrentes desta exposição (KESAR, 2013).

Wadhwa et al. (1999), Chaudhury et al. (2009), Sanyal et al. (2013a), Sanyal (2013b) e Roy et al. (2014) provaram que muitos padrões neuronais são alterados perante a exposição sonora no desenvolvimento embrionário das aves, como o caso do aumento do tamanho de neurônios e expressão de proteínas sinápticas. De acordo com Wright et al. (2007), essas alterações relacionam-se ao desempenho cognitivo e comportamental dos animais. Por isso, são também realizados testes comportamentais com as aves, incluindo o isolamento social, a percepção ao ambiente e reações de medo (JAIN et al., 2004).

Estes resultados, apesar de direcionados para a neurociência, são válidos para as pesquisas de interesse animal. Entretanto, questões que regem a incubação artificial do ponto de vista produtivo e que poderiam estar sujeitas aos efeitos da estimulação sonora foram pouco vistas, como o caso da sincronização das eclosões, taxas de eclosão e posterior viabilidade das aves, justamente, em função de alterações nas capacidades cognitivas.

### **2.3. A estimulação sonora embrionária e as relações com o comportamento pós-eclosão e o bem-estar de aves domésticas**

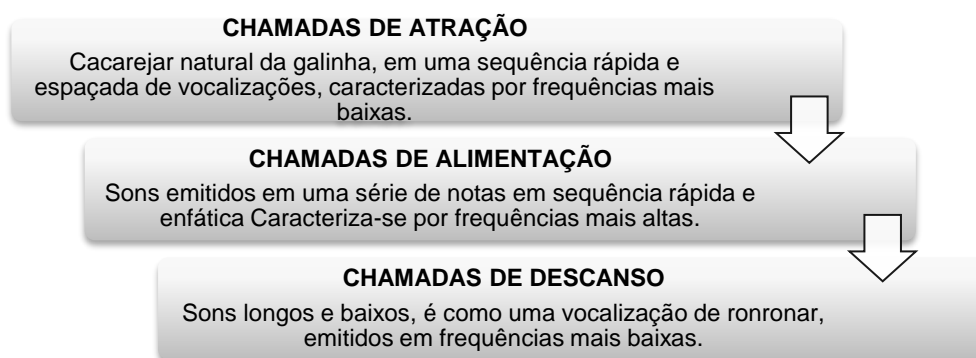
As linhagens comerciais de aves são descendentes das espécies vermelhas da selva (*red junglefowl*) e ainda possuem comportamentos inatos a elas. Por exemplo, as crias caracterizam-se por sua precocidade, com capacidades motoras e sensoriais bem desenvolvidas na eclosão (KONISHI, 1973; AL-NASSER et al., 2007; BROOM; FRASER, 2010). Segundo Savory; Hughes (2010), quando saem dos ovos, os pintos já possuem o corpo coberto por penugens e os olhos abertos, estando aptos a procurarem alimento e uma fonte de calor.

Para a avicultura, as características descritas anteriormente são de grande vantagem, visto que, nos atuais sistemas produtivos, os pintos eclodem em

incubadoras artificiais e são alojados em granjas sem a necessidade de qualquer estímulo/cuidado parental (EDGAR et al., 2016). Nesta discussão há um contraponto: na natureza, as crias de galináceos demandam de estratégias para o reconhecimento da mãe, que segundo Harlow (1958) irá ensinar questões como a localização e escolha de bons alimentos, além de fornecer proteção e calor.

Broom; Fraser (2010) e Tefera (2012) sustentam que as aves, no geral, apresentam um forte vínculo materno-filial pós-eclosão, o que se inicia por meio da comunicação vocal, auditiva e visual, inseridas em um processo de imprinting filial: um tipo de aprendizagem de recém-nascidos. O imprinting baseia-se na fixação da cria pelo primeiro indivíduo/objeto com o qual ela tenha contato (TZSCHENTKE; PLAGEMANN, 2006; TEFERA, 2012; NAKAMORI et al., 2013).

Dos vários estímulos envolvidos no imprinting será focada a comunicação vocal-auditiva entre a galinha e os pintos recém-eclodidos, o que segundo Field et al. (2007), facilita o reconhecimento e a posterior retenção de memória. Assume-se que os galináceos emitam pelo menos 30 tipos diferentes de sons (BROOM; FRASER, 2010; TEFERA, 2012). Collias; Joos (1953) e Edgar et al. (2016) tratam dos sons maternos, emitidos pelas galinhas em choco ou quando estas já estão com os pintos eclodidos. Tais vocalizações são classificadas em chamadas de atração, alimentação e descanso, assim como resume a Figura 4.



**Figura 4.** Tipos de chamadas maternas. Adaptado de Collias e Joos (1953), Gill; Bierema (2013) e Edgar et al. (2016)

Kent (1993) complementa que os pintos seguem os sons da mãe, que são repetitivos, de baixa frequência (600 Hz) e a 65 dB. Por outro lado, os pintos têm como principais sinais sonoros as chamadas de socorro e os chilros de conforto, que determinam o equilíbrio básico de segurança e insegurança que governam o seu comportamento inicial. As chamadas de socorro são mais altas e espaçadas

(repetidas menos vezes por segundo) e os chilros mais baixos, repetidos e emitidos sem a abertura do bico (COLLIAS; JOOS, 1953; BROOM; FRASER, 2010).

Sem dúvidas, a capacidade de identificação, atração e comunicação vocal aparece muito cedo nas aves precociais e atua como uma estratégia evolutiva importante para a sobrevivência dos filhotes. Ademais, atenta-se para o fato de que a comunicação vocal/auditiva entre a galinha e os pintos se inicie antes mesmos da eclosão (GRIER, 1967; KONISHI, 1973; GILL; BIEREMA, 2013). Durante o choco, a mãe produz sons dirigidos para os ovos (RUMPF; TZSCHENTKE, 2010; SOLDATOVA et al., 2011; TEFERA, 2012; TONG et al., 2015).

Mariette e Buchanan (2016) explicam que a presença das chamadas maternas no desenvolvimento embrionário das aves associa-se às alterações fisiológicas dos embriões e isso influenciará no crescimento e viabilidade futura da ninhada. Para Bailey (1983) e Field et al. (2007), a pré-exposição a esses sons sensibiliza os pintos ao que eles irão ouvir após a eclosão, o que pode exercer fortes influências no desenvolvimento pós-eclosão e aprendizagem.

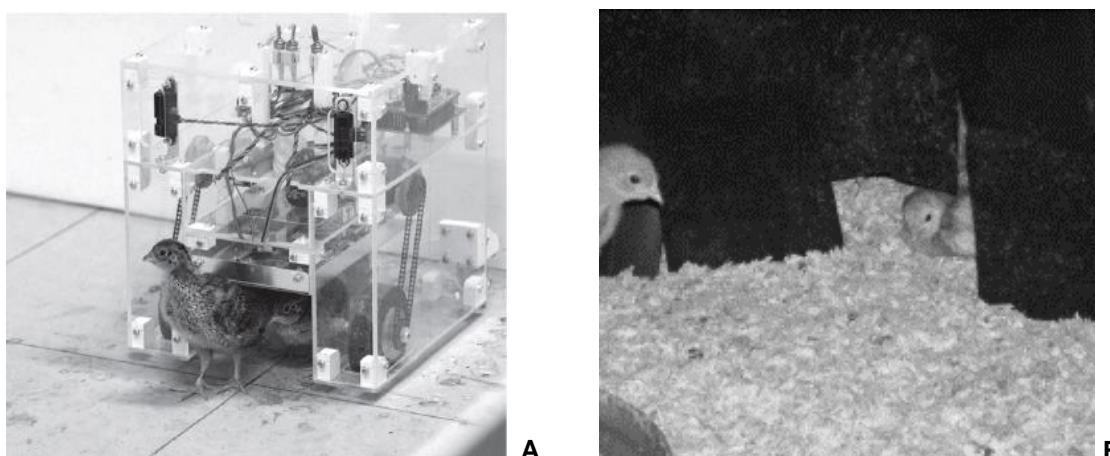
Os próprios pintos vocalizam dentro do ovo na fase final de desenvolvimento, produzindo as primeiras chamadas assim que furam a câmara de ar, o que ocorre simultaneamente ao início da respiração (RUMPF; TZSCHENTKE, 2010; TONG et al., 2013). Essa última informação foi comprovada por Bamelis et al. (2005), os quais inferiram a quantidade de energia do som produzido pelos embriões. Para estes, pelo som é possível detectar exatamente quando os pintos irão eclodir, o que também pode ser utilizado na definição da janela de eclosão.

E como a estimulação sonora embrionária poderia se associar a questões de bem-estar animal? Têm-se claramente que nos atuais sistemas de produção, além dos procedimentos diretos que podem afligir a integridade física/psicológica dos animais, são impostos desvios às condições naturais das espécies, como as altas densidades, perda de contato com companheiros/familiares, exposição a situações desconhecidas e aos seres humanos (CHENG, 2010; SAVORY; HUGHES, 2010; ERICSSON, 2016). A avicultura de corte não foge da regra, vários meios e manejos são identificados como fontes potenciais de estresse, o que também inclui a fase inicial de vida das aves.

Além do estresse imposto pelos processos envolvidos na incubação artificial, como a vacinação, variações de temperatura, tempo de espera, etc. defende-se que os pintos recém-eclodidos também necessitam de condições

relacionadas à sua vida natural (RODEN; WECHSLER, 1998; TZSCHENTKE; PLAGEMANN, 2006; AL-NASSER et al., 2007; CHENG, 2010; JACOBS et al., 2016). Roden; Wechsler (1998) e Broom; Fraser (2010) acentuam que estímulos naturais, como os maternos, são de grande importância para a aprendizagem e sobrevivência das crias, de modo que a ausência destes fatores pode resultar em condições pobres de bem-estar. Neste contexto, métodos de enriquecimento relacionados a natureza das espécies são uma opção (DÁVILA et al., 2011).

A terminologia “enriquecimento ambiental” relaciona-se às modificações do ambiente, que, de acordo com Newberry (1995), implicam em uma melhoria e no aumento da complexidade deste local. Jones (1996) e Leone; Estévez (2008) explicam que o objetivo da utilização de um enriquecimento é suprir as necessidades biológicas, promover e incentivar os comportamentos naturais. Como exemplos, traz-se a Figura 5A/B, com formas de trabalho no ambiente relacionadas diretamente ao comportamento materno-filial dos galináceos.



**Figura 5.** Robô com movimentos e fonte de calor simulando a mãe (A). Fonte: Margerie et al. (2011) franjas utilizadas em um aviário comercial para simular o escuro e o calor da mãe (B). Fonte: Edgar et al. (2016) créditos: Anne-Marie Gilani

Nos exemplos anteriores, Margerie et al. (2011) utilizaram um robô para simular o movimento da galinha, o que para estes é importante no desenvolvimento normal do comportamento espacial das aves jovens. Já na Figura 5B, o ambiente escuro fornecido por meio de cortinas também é um exemplo para suprir a falta materna nas granjas (EDGAR et al., 2016). Em ambos os casos, a mãe substituta fornece aos pintos jovens uma fonte de segurança e conforto (HARLOW, 1958).



Para Jones (2002) a estimulação ambiental em suas diferentes formas (visual, auditiva, olfativa ou tátil) pode melhorar a qualidade de vida das aves de produção. Conjuntamente com Alworth et al. (2013), Jones (2002) explica que, dentre os vários estímulos e estratégias, o som é uma das formas mais práticas e fáceis de enriquecer um ambiente e prover melhorias no bem-estar animal. Field et al. (2007) mencionam que a exposição à estímulos sonoros (rítmicos e sincronizados) pode aprimorar a memória e o aprendizado de pintos, seguindo recomendações como de Chan et al. (2010) e Dávila et al. (2011) que levam em consideração tipos de som e faixas de frequências que as espécies utilizam.

Neste ponto entrelaçam-se as informações do início desta discussão, que levantou o processo de incubação artificial como uma técnica fundamental à avicultura, entretanto, substituindo o ambiente natural (galinha chocando os ovos) pelas máquinas que incubam de uma única vez milhares de ovos férteis, questionando-se: até que ponto isso teria influências sobre as aves?

Segundo Dixon et al. (2016), as experiências na vida pré-natal podem determinar o quão bem um animal se encaixará em seu ambiente após a eclosão. Assim, qualquer forma de estimulação na fase embrionária, se positiva, pode promover condições favoráveis à vida das aves (TZSCHENTKE, 2012). Broom e Fraser (2010) e Harshaw; Lickliter (2011) discorrem que, mesmo durante a incubação as aves domésticas são ativas e essa atividade inclui a audição e a vocalização. Tais autores sugerem que este seja o início do contato materno-filial, no caso, na forma de chamadas dos pintinhos e de reação às chamadas da mãe.

Sem dúvidas manter integralmente uma condição natural às espécies de produção não é viável, por isso, trabalha-se a possibilidade de simular aspectos do cuidado materno utilizando vocalizações, o que levaria a melhores condições de bem-estar aos pintos recém-eclodidos (EDGAR et al., 2015; EDGAR, 2016). Em outras palavras, trata-se aqui sobre enriquecer o ambiente da incubação artificial com sons da espécie como forma de melhorar o bem-estar dos pintos de corte.

## Referências

ALLADI, P. A.; WADHWA, S.; SINGH, N. Effect of prenatal auditory enrichment on developmental expression of synaptophysin and syntaxin 1 in chick brainstem auditory nuclei. **Neuroscience**, v. 114, p. 577 - 590, 2002.

ALLADI, P. A.; ROY, T.; SINGH, N.; WADHWA, S. Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 363 - 373, 2005.

AL-NASSER, A.; AI-KHALAIFA, H.; AL-SAFFAR, A.; KHALIL, F.; ALBAHOUH, M.; RAGHEB, G.; AL-HADDAD, A.; MASHALY, M. Overview of chicken taxonomy and domestication. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, p. 285 - 300, 2007.

ALWORTH, L. C.; BUERKLE, S. C. The effects of music on animal physiology, behavior and welfare. **Laboratory Animals**, v. 42, p. 54 - 61, 2013.

ARCHER, G. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MENCH, J. A. Effect of providing light during incubation on the health, productivity, and behavior of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, p. 29 - 37, 2009.

ARCHER, G. S.; MENCH, J. A. The effects of light stimulation during incubation on indicators of stress susceptibility in broilers. **Poultry Science**, v. 92, p. 3103 - 3108, 2013.

BAILEY, E. D. Influence of incubation calls on post-hatching responses of pheasant chicks. **The Cooper Ornithological Society**, v.85, p. 45 - 49, 1983.

BAMELIS, F.; KEMPS, B.; MERTENS, K.; DE KETELAERE, B.; DECUYPERE, E.; DEBAERDEMAEKER, J. An automatic monitoring of the hatching process based on the noise of the hatching chicks. **Poultry Science**, v 84, p. 1101 - 1107, 2005.

BERGOUG, H.; BUREL, C.; GUINEBRETIEREG, M.; TONG, Q. et al. Effect of pre-incubation and incubation conditions on hatchability, hatch time and hatch window, and effect of post-hatch handling on chick quality at placement. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 312 - 334, 2013.

BRAKE, J.; WALSH, T.J.; BENTON JUNIOR, C.E.; PETITTE, J.N.; MEIJERHOF, R.; PEN'ALVA, G. Egg handling and storage. **Poultry Science**, v. 76, p. 144 - 151, 1997.

BROOM, D. M.; FRASER, A.F. **Comportamento e bem-estar de animais domésticos**. Tradução Carla Forte Maiolino Molento. 4. ed., Barueri, SP: Manole, p. 438, 2010.

BROUČEK, J. Effect of noise on performance, stress, and behaviour of animals. **Slovak Journal Animal Science**, v. 47, p. 111-123, 2014.

CASTELHANO-CARLOS, M J.; BAUMANS, V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. **Laboratory Animals**, v. 43, p. 311 - 327, 2009.

CHAUDHURY, S.; NAG, T. C.; WADHWA, S. Effect of prenatal auditory stimulation on numerical synaptic density and mean synaptic height in the post hatch day 1 chick hippocampus. **Synapse**, v. 63, p.152 - 159, 2009.

CHLOUPEK, P.; VOŠLÁŘOVÁ, E.; CHLOUPEK, J.; BEDÁŇOVÁ, I.; PIŠTĚKOVÁ, V.; VEČEREK, V. Stress in broiler chickens due to acute noise exposure. **Acta Veterinaria BRNO**, v. 78, p. 93 - 98, 2009.

CHENG, H. W. Breeding of tomorrow's chickens to improve well-being. **Poultry Science**, v. 89, p. 805 - 813, 2010.

COLLIAS, N.; JOOS, M. The spectrographic analysis of sound signals of the domestic fowl. **Behaviour**, v. 5, p. 175 - 188, 1953.

DÁVILA, S. G.; CAMPO, J. L.; GIL, M. G.; PRIETO, M. T.; TORRES, O. Effects of auditory and physical enrichment on 3 measurements of fear and stress (tonic immobility). **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2459-66, 2011.

DIXON, L. M.; SPARKS, N. H. C.; RUTHERFORD, K. M. D. Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. **Poultry Science**, v. 00, p. 1 -11, 2016.

DECUYPERE, E.; TONA, K.; BRUGGEMAN, F. The day-old chick: a crucial hinge between breeders and broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p. 127 - 138, 2001.

DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. **Poultry Science**, v. 86, p. 1037 - 1042, 2007.

DECUYPERE, E., MALHEIROS, R. D.; MORAES, V. M. B.; BRUGGEMAN, V. **Fisiologia do embrião**. In: Macari M, Gonzales E, editores. Manejo da incubação. 2. ed. Campinas: FACTA, p. 65 - 94, 2013.

DOOLING, R. Avian hearing and the avoidance of wind turbines. **NREL/TP-500-30844**, p. 84, 2002.

EDGAR, J.; HELD, S.; JONES, C.; TROISI, C. Influences of maternal care on chicken welfare. **Animals**, v. 6, p.12, 2016.

ERICSSON, M. Stress in chickens: effects of domestication and early experience on behaviour and welfare. Linköping Studies in Science and Technology. **Dissertation**. 1755. Department of Physics, Chemistry and Biology Linköping University, SE-581 83, Linköping, Sweden Linköping, p. 57, 2016.

FERNANDES, J.C. **Acústica e ruídos**. Apostila do curso de especialização em engenharia de segurança do trabalho, UNESP, Bauru, p. 51, 2002.

FIELD, S.E.; RICKARD, N.S.; TOUKHSATI, S.R.; GIBBS, M.E. Maternal hen calls modulate memory formation in the day-old chick: The role of noradrenaline. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88, p. 321 - 330, 2007.

FOSTER, M. R.; GREENLEES, B., DUNCAN, I.J.H. **United States Patent**: Method and apparatus for increasing the quantity and improving the quality of hatchlings

incubated and hatched under artificial conditions by exposing the eggs to natural sounds. Patent Number: 5.383.424, 1995.

GILL, S. A.; BIEREMA, A. M. K. On the Meaning of Alarm Calls: A review of functional reference in avian alarm calling. **Ethology**, v.119, p. 449 - 461, 2013.

GONZALES, E. **Qualidade externa e interna do ovo: fatores que afetam os resultados da incubação de linhagens pesadas e leves de aves de produção comercial**, p. 143-159. In: Manejo da incubação, 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013.

GRIER, J.N. Prenatal auditory imprinting in chickens. **Science**, v. 155, p. 1692 - 1693, 1967.

HALLIDAY, D.; WALKER, J.; RESNICK, R. **Fundamentos de Física 2 - Gravitação, Ondas, Termodinâmica**, p. 151 - 167, 9. ed., 2012.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Developmental Dynamics**, v.195, p. 231 - 72, 1992.

HARLOW, H.F. The Nature of Love. **American Psychologist**, v. 13, p. 673 - 685, 1958.

HARSHAW, C.; LICKLITER, R. "Biased embryos: Prenatal experience alters the postnatal malleability of auditory preferences in bobwhite quail. **Developmental Psychobiology**. v. 53, p. 291 - 302, 2011.

HOU, S. M.; BOONE, M. A.; LONG, J. T. An Electrophysiological Study on the Hearing and Vocalization in *Gallus domesticus*, **Poultry Science**, v. 52, n. 1, p. 159 - 164, 1973.

HUTH, J.C.; ARCHER, G.S.; Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. **Poultry Science**, v.94, p. 3052 - 3058, 2015.

IPEK, A.; SAHAN, U.; BAYCAN, S.C.; SOZCU, A. The effects of different eggshell temperatures on embryonic development, hatchability, chick quality, and first-week broiler performance. **Poultry Science**, v.93, p. 464 - 472, 2014.

JACOBS, L.; DELEZIE, E.; DUCHATEAU, L.; GOETHALS, K.; AMPE, B.; LAMBRECHT, E.; GELLYNCK, X. TUYTTENS, F.A.M. Effect of post-hatch transportation duration and parental age on broiler chicken quality, welfare, and productivity. **Poultry Science**, v. 95, p. 1973 - 1979, 2016.

JAIN, S.; SHARMA, R.; WADHWA, S. Effect of prenatal species-specific and music stimulation on the postnatal auditory preference of domestic chick. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 48, p. 174 - 183, 2004.

WEBB, J. Zebra finch 'heat song' changes hatchling development. BBC News - Science & Environment, agosto de 2016. Disponível em: <https://www.bbc.com/news/science-environment-37116728>.

JONES, S. M.; JONES, T. A. Neural tuning characteristics of auditory primary afferents in the chicken embryo. **Hearing Research**, v. 82, p. 139 - 148, 1995.

JONES, R.B. Role of comparative psychology in the development of effective environmental enrichment strategies to improve poultry welfare. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 15, p. 77 - 106, 2002.

JONES, T. A.; JONES, S. M. PAGGETT, K. C. Emergence of Hearing in the Chicken Embryo. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, p. 128 - 141, 2006.

JONES, A. R.; LEWIS, A.; BIZO, T.M.F. Domestic hen chicks' conditioned place preferences for sound. **Behavioural Processes**, v. 89, p. 30 - 35, 2012.

KAUSER, H.; ROY, S.; PAL, A.; SREENIVAS, V.; MATHUR, R.; WADHWA, S.; JAIN, S. Prenatal complex rhythmic music sound stimulation facilitates postnatal spatial learning but transiently impairs memory in the domestic chick. **Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 48 - 56, 2011.

KENT, J. P. The chick's preference for certain features of the maternal cluck vocalization in the domestic fowl (*Gallus gallus*). **Behaviour**, v. 125, n.3/4, p.177 - 187, 1993.

KESAR, A. G. Effect of prenatal chronic excessive sound exposure on auditory filial imprinting area of chick forebrain. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 62, p. 125 - 132, 2013.

KIEFER, C. L. Sensibilidade auditiva de neurônios mesencefálicos em pombos (*Columba livia*). **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.74, 1999.

KING'ORI, A. M. Review of the factors that influence egg fertility and hatchability in poultry. **International Journal of Poultry Science**, v.10, p. 483 - 492, 2011.

KONISHI, M. Development of Auditory Neuronal Responses in Avian Embryos (auditory-vocal behavior/single-unit recording/tonotopic organization/change in threshold). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 6, p. 1795 - 1798, 1973.

KUBKE, M. F.; CARR, C. E. Development of the auditory brainstem of birds: comparison between barn owls and chickens. **Hearing Research**, v.147, p. 1 - 20, 2000.

LEONE, E.H.; ESTE´VEZ, I. Economic and Welfare Benefits of Environmental Enrichment for Broiler Breeders. **Poultry Science**, v. 87, p. 14 - 21, 2008.

MARGERIE, E.; LUMINEAU, S.; HOUDELIER, C.; RICHARD YRIS, M.A. Influence of a mobile robot on the spatial behaviour of quail chicks. **Bioinspiration & Biomimetics**, v. 6, p. 8, 2011.

MARIETTE, M.M.; BUCHANAN, K.L. Prenatal acoustic communication programs offspring for high posthatching temperatures in a songbird. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 812 - 814, 2016.

MELLOR, E.; DIESCH, T.J. Birth and hatching: Key events in the onset of awareness in the lamb and chick. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, n. 2, p. 51 - 60, 2007.

MFILLER, J.S.C.; SCHEICH, H. Functional organization of the avian auditory field L. A comparative 2DG study. **Journal of Comparative Physiology**, v. 156, n.2, 1985.

MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHO, R.; VAN DEN BRAND, H. Meeting Embryonic Requirements of Broilers Throughout Incubation: A Review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.12, p. 137 - 148, 2010.

NAKAMORI, T.; MAEKAWA, F.; SATO, K.; TANAKA, K.; OHKI-HAMAZAK, H. Neural basis of imprinting behavior in chicks. **Development, Growth & Differentiation**, v. 55, p. 198 - 206, 2013.

NEWBERRY, R.C. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environment. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 44, p. 229 - 243, 1995.

OLIVA, A.D; DIAS, G.P.; REIS, R.A.R. Plasticidade Sináptica: Natureza e Cultura Moldando o Self. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 22, n. 1, p. 128 - 135, 2009.

OVIEDO-RONDÓN, E. O.; MURAKAMI, A. E. Fatores que interferem no desenvolvimento embrionário e seus efeitos nos problemas metabólicos pós-eclosão em frangos de corte. **Acta Scientiarum**, v. 10, p. 373 - 382, 1998.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. **Desafios e necessidades para o manejo da incubação**. p. 385 -394. In: Manejo da incubação, 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013

OZKAN, S.; YALCIN, S.; BABACANOĞLU E.; KOZANOĞLU, H.; KARADAŞ, F.; UYSAL, S. Photoperiodic lighting (16 hours of light:8 hours of dark) programs during incubation: 1. Effects on growth and circadian physiological traits of embryos and early stress response of broiler chickens. **Poultry Science**, v.91, p. 2912 - 2921, 2012.

PANIAGO, M. Artificial incubation of poultry eggs - 3,000 years of history. **Ceva Animal Health Ásia Pacific**. v. 2, p. 3, 2005.

PERUZZI, N. J.; SCALA, N. L.; MACARI, M.; FURLAN, R. L.; MEYER, A. D.; FERNANDEZ-ALARCON, M. F.; KROETZ NETO, F. L.; SOUZA, F. A. Fuzzy modeling to predict chicken egg hatchability in commercial hatchery. **Poultry Science**, v. 91, p. 2710 - 2717, 2012.

REIJIRINK, R. I.; VAND DER POL, C. Qualidade superior dos pintinhos: onde e como deveriam os pintinhos eclodir? HATCHTECH. Informe técnico comercial. **A revista do Avesite**, v. 106, p. 36 - 38, 2016.

RICKS, C. A.; MENDU, N.; PHELPS, P. V. The Embryonated egg: a practical target for genetic based advances to improve poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 931 - 938, 2003.

RIDEOUT, B.A. Investigating embryo deaths and hatching failure. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.15, p.155 - 62, 2012.

RODEN, A.; WECHSLER, B. A comparison of the behaviour of domestic chicks reared with or without a hen in enriched pens. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 55, n. 3, p. 317 - 326, 1998.

ROZENBOIM, I.; PIESTUN, Y.; MOBARKEY, N.; BARAK, M.; HOYZMAN, A.; HALEVY, O. Monochromatic light stimuli during embryogenesis enhance embryo development and posthatch growth. **Poultry Science**, v. 83, p.1413 - 1419, 2004.

ROY, S.; NAG, T. C.; UPADHYAY, A. D.; MATHUR, R.; JAIN, S. Repetitive auditory stimulation at a critical prenatal period modulates the postnatal functional development of the auditory as well as visual system in chicks (*Gallus domesticus*). **Developmental Neurobiology**, v. 73, n. 9, p. 688 - 701, 2013.

ROY, S.; NAG, T. C.; UPADHYAY, A. D.; MATHUR, R.; JAIN, S. Prenatal music stimulation facilitates the postnatal functional development of the auditory as well as visual system in chicks (*Gallus domesticus*). **Journal of Biosciences**, v. 39, p. 107 - 117, 2014.

RUMPF, M; TZSCHENTKE, B. Perinatal Acoustic Communication in Birds: Why Do Birds Vocalize in the Egg? **The Open Ornithology Journal**, v. 3, p. 141 - 149, 2010.

SANYAL, T.; KUMAR, V.; NAG, T. C.; JAIN, S.; SREENIVAS, V. Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in one day-old chicks. **PLoS ONE**, v. 8, p. 16, 2013a.

SANYAL, T.; PALANISAMY, P.; NAG, T.C.; ROY, T.S.; WADHWA, S. Effect of prenatal loud music and noise on total number of neurons and glia, neuronal nuclear area and volume of chick brainstem auditory nuclei, field L and hippocampus: A stereological investigation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, p. 234 - 244, 2013b.

SAVORY, C.J.; HUGHES, B.O. Behaviour and welfare. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 13 - 22, 2010.

SOLDATOVA, I. B.; Development and metabolism of chicken embryos in the embryogenesis under acoustic stimulation. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 42, p. 261 - 266, 2011.

SOZCU, A.; IPEK, A. Quality assessment chicks from different hatcher temperatures with different scoring methods and prediction of broiler growth performance. **Journal of Applied Animal Research**, v. 43, p. 409 - 416, 2015.

STADELMAN, W. J. The effect of sounds of varying intensity on hatchability of chicken egg. **Poultry Science**, v. 37, p.166 - 169, 1958.

SUTCLIFFE, J. H. **Incubation natural and artificial**. Cornell University Library, p. 138, 1909.

TEFERA, M. Acoustic signals in domestic chicken (*Gallus gallus*): a tool for teaching veterinary ethology and implication for language learning. **Ethiopian Veterinary Journal**, v.16, p. 77 - 84, 2012.

TONA, K.; BRUGGEMANA, V.; ONAGBESANA, O.; BAMELISA, F.; GBEASSORB, M.; MERTENS, A.K.; DECUYPERE, E. Day-old chick quality: relationship to hatching egg quality, adequate incubation practice and prediction of broiler performance. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v.16, p. 109 - 119, 2005a.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.; BRUGGEMAN, V.; MERTENS, K.; DECUYPERE, E. Effects of turning duration during incubation on embryo growth, utilization of albumen, and stress regulation. **Poultry Science**, v.84, p. 315 - 320, 2005b.

TONG, Q.; ROMANINI, C. E.; EXADAKTYLOS, V.; BAHR, C.; BERCKMANS, D.; BERGOUG, H.; ETERRADOSS, N.; ROULSTON, N.; VERHELST, R.; MCGONNELL, I. M.; DEMMERS, T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 620 - 628, 2013.

TONG, I. M.; MCGONNELL, C. E. B.; ROMANINI, H. BERGOUG, N.; ROULSTON, V.; EXADAKTYLOS, D.; BERCKMANS, C.; BAHRC, M.; GUINEBRETIÈRE, N.; ETERRADOSSID, P. Effect of species-specific sound stimulation on the development and hatching of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 56, p. 143 - 148, 2015.

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

TULLET, S. G. Investigating hatchery practice. **Ross Technology**, 2009. 48 p.

TZSCHENTKE, B.; A. PLAGEMANN. Imprinting and critical periods in early development. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 62, p. 626 - 637, 2006.

TZSCHENTKE, B. Effect of hatching time on poultry behaviour: the impact of incubation environment during the last days of embryonic development. **World's Poultry Congress**, 5 - 9 August – 2012, Salvador - Bahia – Brasil, p. 11, 2012.

UBABEF. A saga da avicultura brasileira – como o Brasil se tornou o maior exportador de carne de frango. Rio de Janeiro: insight; São Paulo: **UBABEF**, p. 120, 2011.



VAN DE VEN, L. J. F.; VAN WAGENBERG, A. V.; DECUYPERE, E.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Perinatal broiler physiology between hatching and chick collection in 2 hatching systems. **Poultry Science**, v. 92, p. 1050 - 1061, 2009.

VETERÄNY, S.; HLUCHÝ, J. ČERVEŇANOVÁ. Effect of the use of synthetic sound during incubation in chicken. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, p.131 - 138, 2005.

VIRGINI, C. E. Equipamentos de incubação: considerações para melhor atender as necessidades das linhagens atuais. p. 283 - 297. In: **Manejo da incubação**, 3. Ed. Jaboticabal: FACTA, 2013.

WADHWA, S.; PHALGUNI, A.; BHOWMICK, D. Quantitative study of plasticity in the auditory nuclei of chick under conditions of prenatal sound attenuation and overstimulation with species specific and music sound stimuli. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 239 - 253, 1999.

WESTMAN, J.C.; WALTERST, J.R. Noise and Stress: A Comprehensive Approach. **Environmental Health Perspectives**, v. 41, p. 291 - 309, 1981.

WRIGHT, A.J. et al. Anthropogenic Noise as a stressor in animals: a multidisciplinary perspective. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 20, n. 2, p. 26, 2007.

ŽIKIĆ, D.; UŠĆEBRKA, G.; GLEDIĆ, D.; LAZAREVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, S. KANAČKI, Z. The influence of long term sound stress on histological structure of broiler's adrenal glands. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 4, p 1613 -1619, 2011.

### **3. SENSOR PARA ESTIMAR O NÍVEL DE PRESSÃO SONORA EM OVOS**

#### **RESUMO**

Antes de avaliar os efeitos da estimulação sonora no desenvolvimento embrionário de aves domésticas uma questão inicial foi levantada: a que nível de pressão sonora (NPS) um embrião no interior de um ovo estaria exposto? Esta pergunta motivou o objetivo desta pesquisa que foi o desenvolvimento de um sensor de tamanho reduzido (decibelímetro miniaturizado) para quantificar o NPS no interior de ovos incubados artificialmente (microambientes). O sensor foi desenvolvido com o microprocessador Arduino®, um circuito amplificador padrão e microfones de eletreto. Calibrações foram realizadas com um decibelímetro comercial, constatando-se a capacidade de resposta do sensor proposto. Todavia, a conversão direta para a escala decibel não foi possível, o que demandou a utilização de modelos matemáticos para isso. A aplicação do sensor em estudos voltados à incubação artificial comprovou a capacidade de isolamento acústico da casca dos ovos. Mas, verificou-se que o NPS interno (câmara de ar), para uma exposição externa de 90 dB (A) é elevado e supostamente perceptível aos embriões, o que é de validade para as pesquisas de bioacústica na incubação.

Palavras-chave: Arduino®; Casca do ovo; Decibelímetro; Isolamento acústico

#### **ABSTRACT**

Before assessing the effects of sound stimuli on the embryonic development of poultry, the current study asked the following question: what sound pressure level (SPL) would embryos inside eggs be exposed to? This question motivated the objective of this research that was developed a reduced-size sensor (miniaturized decibel meter) to help measuring SPL inside artificially-incubated eggs (microenvironments). The sensor was developed by using the Arduino® microprocessor - a standard amplifier circuit and electret microphones. Calibrations were performed in a commercial decibel meter to allow confirming the sensor capacity. However, it was necessary using mathematical models to help converting the sound measures to the decibel scale, since the direct conversion of them was not possible. The use of the sensor in studies focused on artificial incubation confirmed the acoustic insulation capacity of eggshells. However, results showed that the internal SPL (air chamber) in eggs externally exposed to 90 dB (A) remains high and probably perceptible to embryos. Such information is highly relevant to studies focused on investigating bioacoustics during incubation.

Keywords: Arduino®; Eggshell; Sound level meter; Soundproofing

#### **3.1. Introdução**

As incubadoras artificiais dispõem de tecnologia suficiente para garantir condições ideais ao desenvolvimento embrionário das aves domésticas, por meio

de sistemas de ventilação, viragem, umidade e refrigeração. Todavia, o ruído é inevitável com tais procedimentos, pois motores e ventiladores estão constantemente em funcionamento, resultando em níveis de pressão sonora que excedem 95 dB (A) (BROUČEK, 2014; CARVALHO et al., 2015).

Paralelamente, estudos têm demonstrado o efeito do som (música rítmica, vocalizações da espécie e ruídos aleatórios), sob diferentes aspectos no desenvolvimento embrionário das aves, com alterações em respostas relacionadas à maturação de sistemas fisiológicos e à vida pós-eclosão (ALLADI et al., 2005; KESAR, 2013; SANYAL et al., 2013; TONG et al., 2015). Mas se o embrião tem acesso ao som externo, alguns eventos são necessários, como a funcionalidade embrionária do sistema auditivo, comprovada por Jones et al. (2006).

O som é uma onda longitudinal que culmina com variações de pressão em um meio, seja este o ar, a água, ou um sólido. De todas as grandezas, o nível de pressão sonora (NPS) representa a sensação auditiva de volume, cujo medidor é conhecido como decibelímetro (HALLIDAY et al., 2012; DAVID et al., 2013). Segundo David et al. (2013), um decibelímetro é um transdutor eletroacústico capaz de detectar o som e convertê-lo em um sinal elétrico, amplificá-lo e processá-lo. Existem diversas variações destes equipamentos, que influem diretamente na eficiência, precisão e custo (IEC 61672-1, 2002).

Neste contexto, buscou-se pelo desenvolvimento de um sensor, cuja base escolhida foi a plataforma Arduino®, um microcontrolador de código aberto com uma gama de aplicações quando associado a diferentes módulos de sensores e atuadores (SOUZA et al., 2011; HJORT; HOLMBERG, 2015; TORRES et al., 2015). O Arduino® foi criado em 2005, como uma plataforma de fácil aplicação para iniciantes em programação (HAUGEN; MOORE, 2014). D'Ausilio (2012) complementa que este microcontrolador possibilita a utilização de múltiplos complementos de hardware e scripts gratuitos para diferentes propósitos.

Com sua popularização, o Arduino® passou a ser empregado no desenvolvimento de sensores, tanto que é fácil encontrar aplicações na mensuração de temperatura, luminosidade, umidade relativa, precipitação (FERNANDES, 2015; TORRES et al., 2015; JORDÃO et al., 2017), sinais de vibrações mecânicas (HJORT; HOLMBERG, 2015; JABER; BICKER, 2015) e no nível de pressão sonora (CAVALCANTE, 2011; FEITOSA et al., 2014). Nos

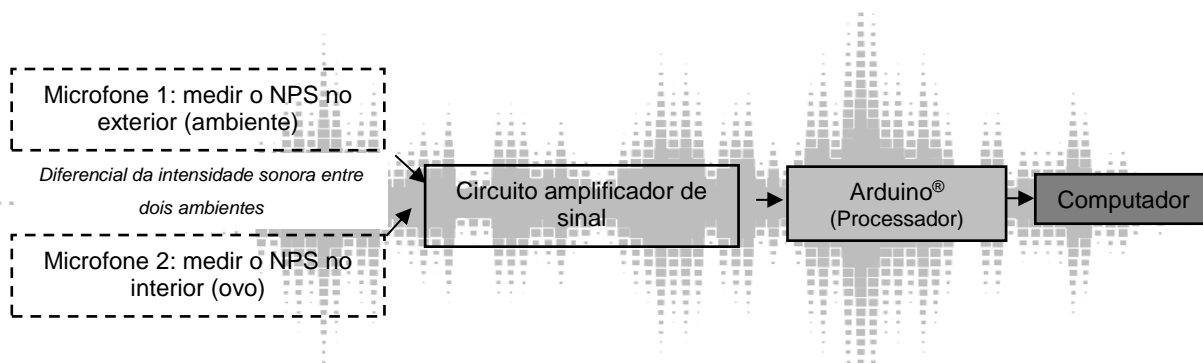
exemplos citados, o Arduino® é dado como uma ferramenta eficiente, apesar de serem necessárias adaptações.

Objetivou-se com este trabalho desenvolver um sensor para estimar os níveis de pressão sonora em microambientes, como o interior de ovos férteis, e assim obter informações como o isolamento acústico da casca dos mesmos.

## 3.2. Material e Métodos


### 3.2.1. Desenvolvimento do sensor

O desenvolvimento de um sensor para mensuração do nível de pressão sonora (NPS) veio da necessidade de estimar o “quanto” de som chegaria a um embrião no interior de um ovo, utilizando-se, portanto, de um equipamento de tamanho reduzido. Esta etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Instrumentação do Departamento de Engenharia de Biosistemas da ESALQ/USP e com o Serviço Social da Indústria - SESI, ambos em Piracicaba/SP. A proposta inicial do decibelímetro proposto encontra-se na Figura 6.



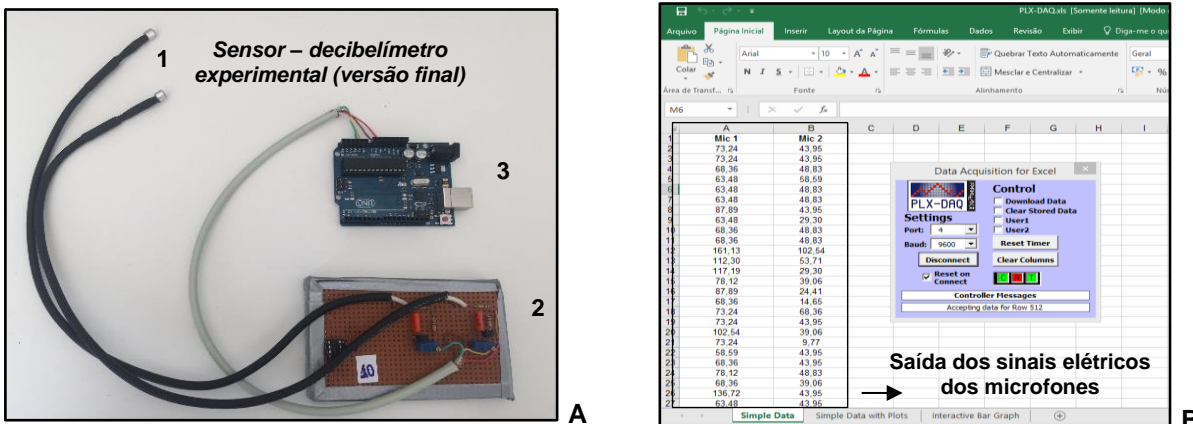
**Figura 6.** Organograma do projeto do sensor desenvolvido para esta pesquisa

Como processador utilizou-se a plataforma Arduino® UNO R3. Este modelo é baseado em um processador ATmega328P e apresenta seis canais de entrada (inputs) e seis canais de saída (outputs), por meio dos quais é possível adicionar diversos tipos de componentes eletrônicos direcionados e programados para uma determinada função. Informações adicionais sobre o microprocessador podem ser vistas em sequência na Figura 7.

Microcontrolador	ATMEL ATmega 328	
Tensão de operação	5V	
Tensão de entrada	7 – 12V	
Tensão de entrada (limites)	6 – 20V	
Pinos de entrada/saída digital	14	
Pinos de entrada analógica	6	
Memória Flash	32 Kb	
Memória SRAM	2 Kb	
Memória EEPROM	1 kb	
Velocidade de Clock	16 MHz	

**Figura 7.** Arduino® UNO R3. Fonte: Hjort; Holmberg (2015); Arduino® (2017)

Foram utilizados dois microfones de eletreto (0,5 cm de diâmetro), denominados de Mic 1 e Mic 2, com o propósito de se obter simultaneamente o nível de pressão sonora em dois ambientes distintos: o interior e o exterior dos ovos. Basicamente, os microfones respondem à variação da intensidade sonora pela vibração de suas membranas internas, transformando-a em um sinal elétrico. Todavia, como este sinal é baixo um sistema amplificador é necessário. Assim, construiu-se um sistema de amplificação com dois capacitores de 100nf; quatro resistores de 10k; dois tripots de 500k; e dois transistores BC 548. Detalhes sobre a versão final do sensor proposto podem ser acompanhados na Figura 8A/B.



**Figura 8.** Sensor desenvolvido: (1) microfones, (2) circuito amplificador, (3) placa Arduino® (A); ferramenta PLX-DAQ® utilizada na coleta dos dados (B)

Na aquisição dos dados, o sensor desenvolvido foi conectado diretamente a um computador por meio da porta USB. A programação foi realizada em um ambiente *opensource processing*, em linguagem C. Trabalhou-se com a ferramenta Parallax Data Acquisition (PLX-DAQ®), que lança os dados diretamente em uma planilha eletrônica do Microsoft Excel®, cuja saída é apresentada na Figura 8B (CAVALCANTE et al., 2014; SOUZA et al., 2014; DWORAKOWSKI et al., 2016).

### 3.2.2. Calibração e conversão dos sinais elétricos do sensor

A calibração foi realizada como o sugerido por Feitosa et al. (2014) e Fernandes (2015), com comparações realizadas a equipamentos comerciais em uma sequência de testes. Neste caso, os testes envolveram a capacidade de resposta do sensor proposto frente às variações do NPS ambiente, comparando os dados obtidos com os de um decibelímetro comercial devidamente calibrado, modelo DEC - 490 da Instrutherm®. Na utilização do decibelímetro, adotaram-se os procedimentos estabelecidos pela NBR 10.152:2000, assim, este foi programado para a ponderação em “A”, com coleta automática (faixa de 30 dB a 130 dB) e modo “slow”, com registros obtidos a cada segundo.

Um ruído branco (100 - 15000 Hz) foi fornecido por uma caixa amplificadora (Mini Speaker® - BT51) com potência nominal de 5W, previamente calibrada em diferentes configurações de volume com valores de NPS estabelecidos pelo decibelímetro comercial. Os microfones do sensor foram posicionados paralelamente ao microfone do decibelímetro comercial, ambos a dez centímetros de distância da fonte sonora. Em primeira instância, testou-se o sistema em uma condição de silêncio. Em seguida, o volume da caixa amplificadora foi aumentado gradativamente (configurações: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30). Ao todo foram realizadas cinco baterias de testes, cada uma com um minuto de duração para cada volume da caixa amplificadora.

Os dados coletados pelo decibelímetro miniaturizado foram sinais elétricos obtidos em uma taxa de dez valores por segundo. Assim, trabalhou-se com médias destes valores para que comparações com o decibelímetro comercial pudessem ser realizadas (um sinal/segundo). Para visualizar a caracterização dos dados brutos do sensor desenvolvido e a comparação com o decibelímetro, utilizou-se de estatísticas descritivas (médias, mediana, desvio-padrão, mínimos e máximos).

O sensor não permitiu obter os registros diretamente em decibéis, assim, buscou-se por uma equação capaz de relacionar as medidas do decibelímetro comercial com as do decibelímetro experimental. A modelagem foi realizada com uma análise de regressão polinomial, sendo o modelo ajustado aos dados por meio da técnica dos quadrados mínimos ponderados (CUSTODIO et al., 1997; DIAS NETO et al., 2016) no software estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

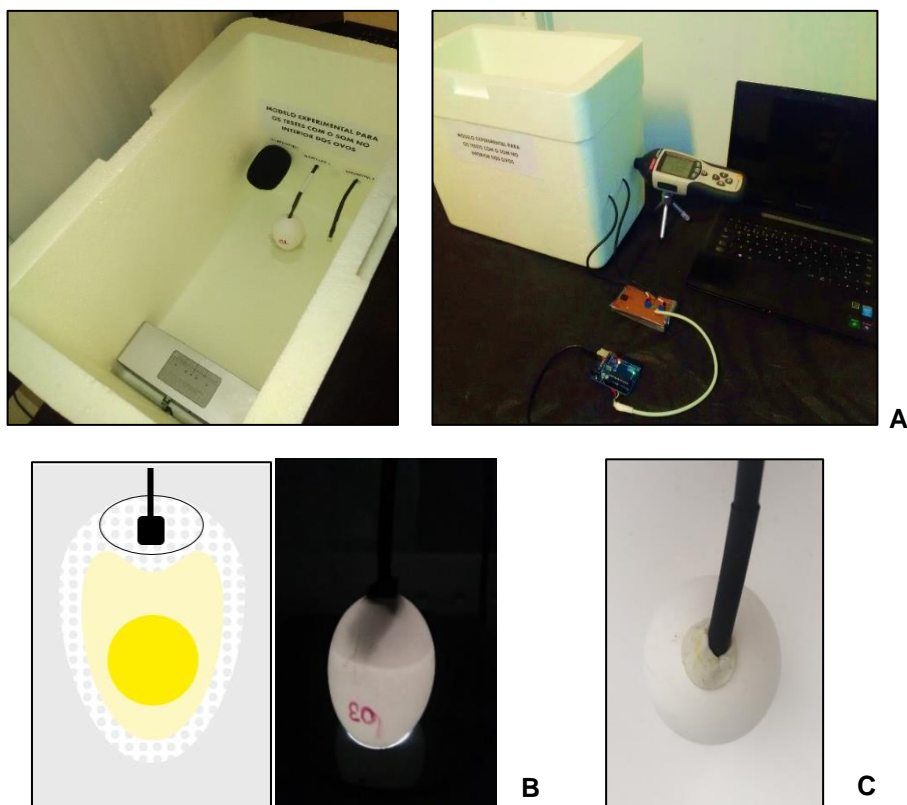
Nos testes iniciais percebeu-se que os sinais elétricos dos microfones (Mic 1 e Mic 2) de um mesmo sensor não eram idênticos, o que levou à necessidade de verificar se estes poderiam ser utilizados para comparações do nível de pressão sonora em diferentes ambientes, como na proposta inicial. Foi assim realizado um teste t não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados (medidos nos mesmos tempos). Enquanto que a correlação entre os sinais elétricos dos microfones foi determinada pelo uso do coeficiente de correlação de postos de Kendall, ambos a 5% de significância e utilizando o software estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

### **3.2.3. Aplicação do sensor desenvolvido**

Na aplicação do sensor proposto, foram consideradas duas situações para mensuração do NPS no interior de ovos: (1) ovos vazios (somente da casca); (2) ovos íntegros (com o conteúdo normal). Em ambos os casos, os ovos utilizados procederam-se de mesma origem (brancos com  $\approx 50$  g). Em cada situação foram utilizadas 15 unidades, consideradas como as repetições experimentais.

Para o estudo somente da casca como um isolante, os ovos foram abertos em aproximadamente um centímetro no polo maior (região da câmara de ar) e o conteúdo interno (gema/albúmen) foi retirado. As cascas foram lavadas com água corrente e secas em estufa por 24 horas e a 60 °C (JONES et al., 2010). A abertura realizada no início foi mantida, pois, pela mesma, foi inserido o microfone do sensor. Os ovos íntegros foram utilizados diretamente realizando-se apenas a abertura de um centímetro no polo maior para a posterior colocação do microfone.

Como nos testes de calibração, trabalhou-se com um ruído branco (100 - 15000 Hz) fornecido por uma caixa amplificadora. Foram testados dois níveis de pressão sonora externos: 70 e 90 dB (A), relacionados com pesquisas voltadas à estimulação sonora na incubação artificial. Estes níveis foram calibrados previamente. Foi utilizada uma caixa de testes, para suportar os microfones nas mesmas alturas. Ao lado externo da caixa, ficaram partes do decibelímetro comercial e do sensor desenvolvido, estando o último conectado a um computador para coleta dos dados, como mostra a Figura 9A.



**Figura 9.** Teste de aplicação do sensor para a obtenção do nível de pressão sonora no interior de ovos (A); detalhes de um ovo com microfone (B); fechamento com massa sintética (C)

Os ovos das duas condições foram testados individualmente e de forma alternada: ora ovos tipo “1” a 70 e 90 dB (A), ora ovos tipo “2” a 70 e a 90 dB (A). Para isso, eles foram posicionados verticalmente em um suporte afixado a 20 cm da caixa amplificadora. Nos dois casos, um dos microfones do sensor desenvolvido foi inserido na câmara de ar (Figura 9B), evitando-se o contato com a parte líquida nos ovos que se encontravam no estado integral. O segundo microfone foi posicionado lateralmente e a mesma altura do primeiro e do decibelímetro. Os espaços excedentes entre a casca dos ovos e o fio foram preenchidos com massa sintética (Figura 9C).

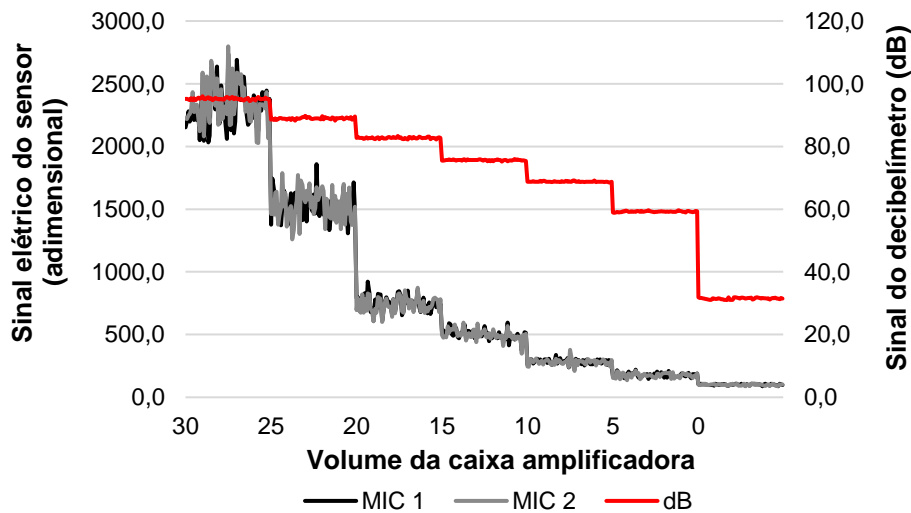
Ao final, cada repetição de ovo das duas situações avaliadas gerou 1000 sinais elétricos, dos quais foram obtidas 100 médias/segundo, convertidas em dB. Neste caso, como os NPS externos foram fixados e comparados ao decibelímetro comercial, optou-se pela apresentação do decibelímetro. Por fim, os níveis de pressão sonora externo e internos foram comparados dentro dos dois níveis avaliados [70 e 90 dB (A)], por meio do teste de Kruskal-Wallis, a 5% de significância. O programa estatístico utilizado foi o R (R CORE TEAM, 2016).



### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Calibração e conversão dos sinais elétricos do sensor

A comparação dos dados (antes da conversão) do sensor desenvolvido com os dados do decibelímetro comercial em dB (A) pode ser observada na Figura 10. Verifica-se que eles apresentaram um comportamento semelhante frente à cada variação de volume da caixa amplificadora.



**Figura 10.** Registros dos dados coletados pelos microfones do sensor desenvolvido e registros do decibelímetro comercial frente às variações de volume do som ambiente

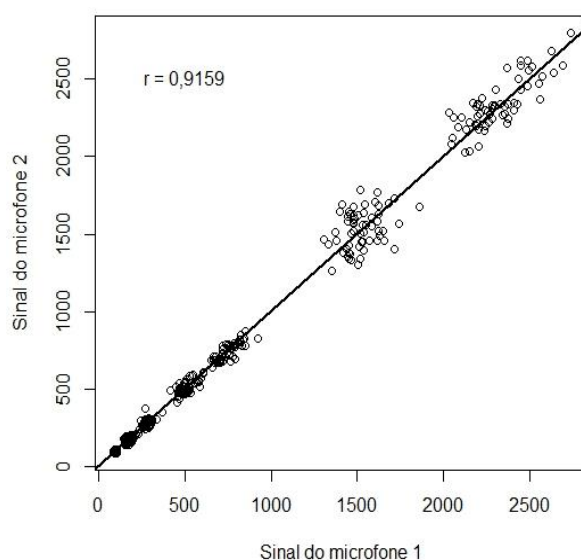
Com o decibelímetro comercial, a variação do NPS foi de  $31,53 \pm 0,25$  dB (A) a  $95,22 \pm 0,32$  dB (A). Enquanto que o sensor respondeu a uma variação de  $100,39 \pm 5,32$  a  $2324,84 \pm 163,12$  (média dos microfones). Observou-se que, com o aumento do volume externo os sinais dos microfones apresentaram-se mais dispersos quando comparados entre si (Tabela 2). Esta última ocorrência pode ser explicada por princípios básicos de acústica: o aumento do volume resulta em uma maior pressão da onda sonora nas membranas dos microfones, o que é chamado de intensidade sonora, condizente com o valor médio do fluxo de energia por unidade de área ( $W/m^2$ ). Os valores numéricos de intensidade sonora variam exponencialmente, por isso as magnitudes do sinal elétrico do sensor foram de 100 a até 2300 unidades, o que conseqüentemente leva a uma maior dispersão destes. Nos decibelímetros comerciais, por convenção, adota-se a unidade decibel, ou

seja, o emprego dos valores de intensidade sonora em uma escala logarítmica de base dez (HALLIDAY et al., 2012; DAVID et al., 2013; FERNANDES, 2015).

**Tabela 2.** Estatísticas descritivas (médias e desvios-padrão) referentes a calibração do sensor desenvolvido utilizando um decibelímetro comercial

Configuração da caixa de som	Decibelímetro comercial – dB (A)	Sensor Microfone 1	Sensor Microfone 2
Silêncio	31,53 ± 0,25	100,38 ± 5,26	100,40 ± 5,47
Volume 5	59,19 ± 0,16	176,51 ± 16,78	175,01 ± 18,40
Volume 10	68,74 ± 0,14	282,83 ± 20,13	281,01 ± 23,46
Volume 15	75,66 ± 0,17	501,72 ± 39,82	499,49 ± 40,74
Volume 20	82,69 ± 0,24	750,38 ± 63,75	738,99 ± 60,49
Volume 25	88,90 ± 0,33	1520,54 ± 106,48	1529,63 ± 124,62
Volume 30	95,22 ± 0,32	2314,44 ± 167,24	2335,24 ± 164,02

Apesar dos valores do sinal dos microfones do sensor não serem exatamente iguais, sobretudo, nos volumes mais elevados, eles não diferiram em distribuição pelo teste de Wilcoxon a 5% de significância e a igualdade entre eles ( $r = 0,9159$ ) permitiu a utilização simultânea dos mesmos (Figura 11).



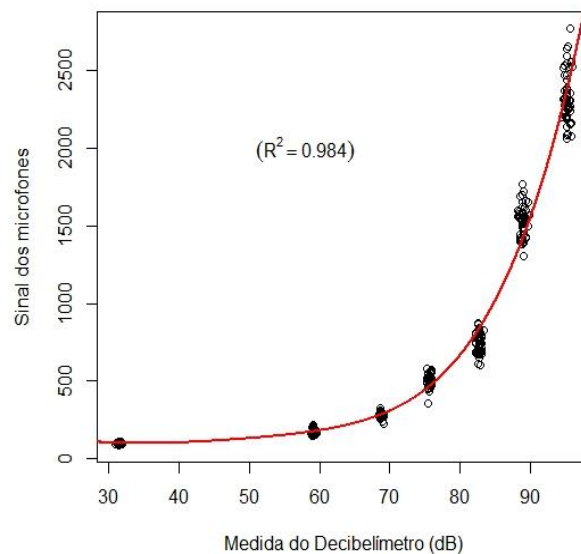
**Figura 11.** Diagrama de dispersão para os sinais dos microfones 1 e 2 com coeficiente de correlação ( $r$ ) de postos de Kendall

A principal implicação do sensor desenvolvido foi a não conversão direta do sinal elétrico para a escala decibel. Em um levantamento de informações sobre a aplicação da plataforma Arduino® na mensuração do NPS, deparou-se com a

metodologia proposta por Feitosa et al. (2014). Estes propuseram como solução a comparação dos dados do sensor desenvolvido por eles com um decibelímetro comercial, seguida por ajustes matemáticos que modelassem essa relação.

Baseando-se nisto, como alternativa para conversão dos sinais elétricos do sensor para a escala decibel, aplicou-se uma regressão polinomial com a técnica dos quadrados mínimos. Em decorrência da maior dispersão dos dados do sensor desenvolvido, no ajuste do modelo estes foram considerados como a variável resposta, enquanto as medidas do decibelímetro comercial caracterizaram a variável explanatória. Como os sinais dos microfones não difeririam entre si, na conversão trabalhou-se com a média deles em cada variação de volume. A função ajustada foi um modelo de 5º grau, apresentado na Figura 12 e expresso por:

$$y = 305,57 - 0,98 x^2 + 4,09 \times 10^{-2} x^3 - 6,28 \times 10^{-4} x^4 + 3,48 \times 10^{-6} x^5$$



**Figura 12.** Ajuste do modelo polinomial de 5º grau para relacionar o sinal do sensor desenvolvido com o decibelímetro comercial, em que y é o sinal médio dos dois microfones (adimensional) e x é a medida do decibelímetro comercial em dB (A)

O coeficiente de determinação foi de 0,984, o que permite afirmar que 98,4% da variação no sinal do sensor desenvolvido pôde ser explicada pelas medidas do decibelímetro comercial, viabilizando a sua utilização como um medidor de pressão sonora. Mesmo com os termos de quarta e quinta ordem apresentando coeficientes aparentemente pequenos, eles foram diferentes de zero de maneira significativa (teste t,  $\alpha = 0,05$ ), por isso foram mantidos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Estimativas, erros-padrão e teste t para os coeficientes do polinômio de quinto grau ajustado aos dados do sensor desenvolvido e decibelímetro comercial

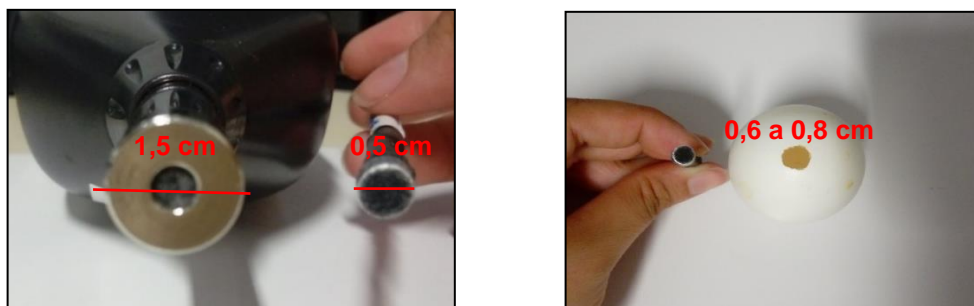
Coeficiente	Estimativa	Erro-Padrão	Valor t	Valor p
Intercepto	305,57	9,00	3,39	<0,001
X <sup>2</sup>	0,98	0,31	-3,17	0,002
X <sup>3</sup>	4,09 x 10 <sup>-2</sup>	0,01	3,94	<0,001
X <sup>4</sup>	-6,28 x 10 <sup>-4</sup>	1,25 x 10 <sup>-4</sup>	-5,01	<0,001
X <sup>5</sup>	3,48 x 10 <sup>-6</sup>	5,20 x 10 <sup>-7</sup>	6,70	<0,001

Um ponto importante, Dias Neto et al. (2016) atentam para o fato de que cada sensor é único e os ajustes são próprios. Por exemplo, na utilização de outros sensores como o proposto, ajustes individuais deveriam ser realizados. Outra questão é que os valores convertidos se encontram em dB, sem a ponderação em filtros, tal como é possível realizar com um decibelímetro comercial que pode ser programado para o filtro “A”, que é o mais utilizado por considerar faixas de frequências entre 20 Hz e 20 kHz (MALCHAIRE, 2001).

Segundo Cavalcante (2011) e D’Ausilio (2012), o Arduíno® pode ser programado para diversas finalidades, recebendo/enviando informações para serem processadas e interpretadas, tal como um decibelímetro comercial o faz. Constatou-se que o sensor desenvolvido para a estimativa do nível de pressão sonora apresentou um funcionamento satisfatório e dentro das expectativas para o emprego do mesmo. Dessa forma a proposta apresentada e testada neste trabalho o denominou de “decibelímetro miniaturizado”.

### 3.3.2. Aplicação do decibelímetro miniaturizado em testes com ovos

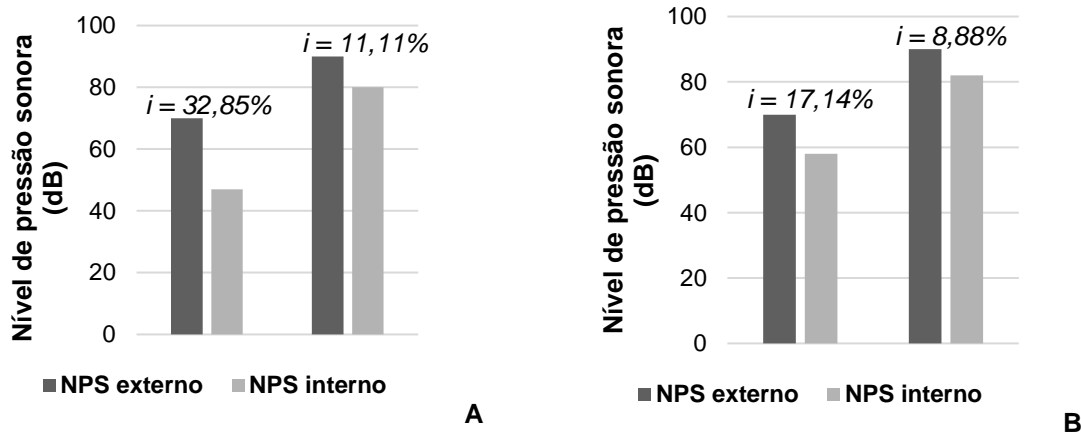
O tamanho reduzido dos microfones de eletreto foi fundamental para a utilização do decibelímetro miniaturizado na mensuração do NPS no interior de ovos. A danificação da casca foi mínima, como ilustra a Figura 13.



**Figura 13.** Comparação das dimensões do microfone do sensor com o do decibelímetro comercial

Apesar da vantagem do tamanho, surgiu uma limitação em relação ao uso do sensor nos testes com ovos: devido as características dos microfones os mesmos não podem ser molhados, pois, ocorre a perda do sinal e consequentemente o comprometimento do funcionamento do sensor. Isto poderia acontecer caso eles entrassem em contato com o albúmen e a gema dos ovos. Deste modo, a utilização e os resultados apresentados são limitados à parte superior dos ovos determinada pela câmara de ar que é um espaço vazio e seco que ocorre entre as membranas interna e externa da casca (GONZALES, 2013).

Um dos objetivos da pesquisa foi avaliar o isolamento acústico da casca dos ovos, considerando que no interior deles há um embrião em desenvolvimento que supostamente tem acesso ao som externo, que poderia ser quantificado pelo nível de pressão sonora (NPS). Diante disto, obteve-se o diferencial do NPS entre o ambiente externo e o interior de ovos vazios, para verificar o efeito da casca (Figura 14A), dando continuidade avaliou-se também o diferencial entre o ambiente externo e a câmara de ar de ovos íntegros (Figura 14B).



**Figura 14.** Diferencial de NPS e valores percentuais de isolamento entre o ambiente externo e interno (*i*), considerando somente a casca (A); e entre o ambiente externo e a parte superior dos ovos íntegros (B). Ambos para os dois NPS testados de 70 e 90 dB (A)

Os NPS externos foram fixados em 70 e 90 dB (A). Estes níveis foram escolhidos com base em estudos prévios sobre a estimulação sonora na incubação artificial. De fato, no interior dos ovos, o NPS foi inferior, sendo isto comprovado pelo teste de Kruskal-Wallis que indicou diferenças quanto à distribuição dos dados entre os dois ambientes. As estatísticas destes testes foram:  $\chi^2 = 35,885$  e  $p < 0,0001$  em 70 dB (A); e  $\chi^2 = 32,657$  e  $p < 0,0001$  no NPS de 90 dB (A).

A onda sonora, quando entra em contato com qualquer superfície, é parcialmente refletida, absorvida e transmitida (HALLIDAY et al., 2012). A quantificação exata destas frações envolve estudos sofisticados da acústica. Para facilitar a visualização dos dados anteriores, são apresentados valores percentuais de isolamento, primeiramente considerando as cascas (ovos vazios), que foram de 32,85% e 11,11% em 70 e 90 dB (A), respectivamente. Para os ovos íntegros, a percentagem de isolamento foi de 17,14% em 70 dB (A) e 8,88% em 90 dB (A). Observar diferenças entre estas condições não foi o escopo deste trabalho, mas sugere-se que os percentuais de isolamento possam estar associados a reverberação da fração da onda sonora absorvida, que provavelmente é diferente nos ovos vazios e nos integrais (cheios de líquido). A saber, o albúmen e a gema diferem em viscosidade e massa, causando alterações na frequência de ressonância de ondas sonoras (AKASHI; KUSHIBIKI, 1997; ATTAR; FATHI, 2014). Isto deverá ser estudado com maior rigor em outras pesquisas.

Os resultados obtidos na aplicação do decibelímetro miniaturizado comprovaram que a casca do ovo é uma barreira ao som. Um fato interessante a ser observado é o de que, mesmo com essa capacidade de isolamento, para uma exposição externa de 90 dB (A) o NPS interno ainda é elevado ( $\approx$  80 decibels), o que, em tese, poderia prejudicar o desenvolvimento embrionário (ROY et al., 2014). Com isto, os resultados das pesquisas de Sanyal et al. (2013) e Kesar (2013) podem ser explicados. Estes trabalharam com a exposição de embriões a 110 dB (A) e observaram o aumento no tamanho e quantidade de neurônios relacionados à audição, alterações em níveis hormonais e no comportamento das aves.

Por outro lado, Tong et al. (2015) concluíram que a exposição de embriões a um NPS de 72 dB (A) não influenciou o crescimento embrionário, taxas de eclodibilidade/mortalidade, níveis hormonais, etc. Sugere-se que o nível de 72 dB testado por eles tenha pouca relevância aos embriões, visto que, na câmara de ar a intensidade sonora seria ainda menor. Não existem referências sobre limites de exposição à embriões em desenvolvimento, em complemento Brouček (2014) afirma que várias espécies animais não apresentam alterações fisiológicas e comportamentais se a exposição aos sons adversos não for superior a 80 dB (A). Esta última informação justifica os resultados de Tong et al. (2015) e dos demais pesquisadores que trabalharam com a bioacústica na incubação artificial.

### 3.4. Conclusões

O sensor para a mensuração do nível de pressão sonora (decibelímetro miniaturizado) atendeu as exigências requeridas nesta pesquisa. Em sequência, sua aplicação foi testada em estudos de bioacústica na incubação artificial e com isto, verificou-se que a casca do ovo é um isolante acústico, mas internamente as magnitudes do NPS podem ainda serem elevadas.

### Referências

- AKASHI, N.; KUSHIBIKI, J. Acoustic properties of egg yolk and albumen in the frequency range 20–400 MHz. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 102, n. 6, p. 3774 - 3778, 1997.
- ALLADI, P. A.; ROY, T.; SINGH, N.; WADHWA, S. Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 363 - 373, 2005.
- ARDUÍNO. **Home**. Disponível em <<https://www.arduino.cc/>>. Acesso em 22 de maio de 2017.
- ATTAR, M.Z.; FATHI, M.M. Non-Destructive Acoustic Resonance Method for Evaluating Eggshell Strength and Thickness. **International Journal of Biophysics**, v. 4, n. 1, p. 9 - 15, 2014.
- BROUČEK, J. Effect of noise on performance, stress, and behaviour of animals. **Slovak Journal Animal Science**, v. 47, p. 111 - 123, 2014.
- CARVALHO C.C.S.; SOUZA, C.F.; TINÔCO, I.F.F.; SANTOS, L.V.; MINETTE, L.J.; SILVA, E.P. Activities and Ergonomics of Workers in Broiler Hatcheries. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.2, p. 123 – 136, 2015.
- CAVALCANTE, M.A.; TAVOLARO, C.R.C.; MOLISANI, E. Física com Arduino para iniciantes. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, n. 4, p. 4503 – 4514, 2011.
- CAVALCANTE, M. M.; SILVA, J.L.S.; VIANA, E.C. DANTAS, J.R. A Plataforma Arduino para fins didáticos: Estudo de caso com recolhimento de dados a partir do PLX-DAQ. **XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Computação – CSBC**, p. 1687 - 1696, 2014.
- CUSTODIO, R.; ANDRADE, J.C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 2019 - 225, 1997.
- D'AUSILIO, A. Arduino: A low-cost multipurpose lab equipment. **Behavior Research Methods**, v. 44, p. 305 - 313, 2012.

DAVID, N.; NINA, A.C.V.; NWAMAKA, E.I.; OPEYEMI, A.A. Library Sound Level Meter. **Journal of Electronics and Communication Engineering Research**, v. 1, n.1, p.20 - 29, 2013.

DIAS NETO, J.; THOMAZ JÚNIOR, J.C.; URBANO NETO, D. F. Método de ajuste matemático para validação de dados de sensores de radiação de onda longa. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 31, n. 1, p. 37 - 44, 2016.

DWORAKOWSKI, L.A.; HARTMANN, A. M.; KAKUNO, E.M.; DORNELES, P.F.T. Uso da plataforma Arduino e do software PLX-DAQ para construção de gráficos de movimento em tempo real. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 38, n. 3, p. 9, 2016.

FEITOSA, M. A. F.; CAVALCANTI, G. O.; CORREIA JR, M. A. V.; SILVA, A. M. X.; DANTAS, J. M. Sistema de monitoramento dos níveis de pressão sonora para avaliação do ruído em setores de unidades hospitalares. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica** – CBEB 2014, p. 1883 -1886, 2014.

FERNANDES, M.F.M.V. Desenvolvimento de um Sistema Remoto de Monitorização e Análise de Qualidade do Ambiente Interior em Edifícios. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências e Departamento de Engenharia Geográfica, Geofísica e Energia, p. 132, 2015.

GONZALES, E. Qualidade externa e interna do ovo: fatores que afetam os resultados da incubação de linhagens pesadas e leves de aves de produção comercial, p. 143-159. In: **Manejo da incubação**, 3. Ed. Jaboticabal: FACTA, 2013.

HALLIDAY, D.; WALKER, J.; RESNICK, R. **Fundamentos de Física 2 - Gravitação, Ondas, Termodinâmica**, p. 151 - 167, 9. ed. 2012.

HAUGEN, A. J.; MOORE, N.T. 2014. A model for including Arduino microcontroller programming in the introductory physics lab. **ArXiv**, p. 11, 2014.

HJORT, A.; HOLMBERG, M. Measuring mechanical vibrations using an Arduino as a slave I/O to na EPICS control system. **FREIA Report**, v. 9, n. 4, p. 25, 2015.

IEC 61672-1. Electroacoustics – Sound level meters – Part 1: Specifications. **International Standard**, p. 11, 2002.

JABER, A.A.; BICKER, R. Real-Time Wavelet Analysis of a Vibration Signal Based on Arduino-UNO and LabVIEW. **International Journal of Materials Science and Engineering**, v. 3, n. 1, p. 66 - 70, 2015.

JONES, T. A.; JONES, S. M. PAGGETT, K. C. Emergence of Hearing in the Chicken Embryo. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, p. 128 - 141, 2006.

JONES, D. R.; MUSGROVE, M. T.; ANDERSON, K. E.; THESMAR, H. S. Physical quality and composition of retail shell eggs. **Poultry Science** 89 :582–587, 2010.



JORDÃO, M. D. L.; PAIVA, K.; FIRMO, H.T.; INÁCIO, C.T.; ROTUNNO FILHO, O. C.; LIMA, T.A. Low-cost automatic station for compost temperature monitoring. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.21, n.11, p. 809 - 813, 2017.

KESAR, A. G. Effect of prenatal chronic excessive sound exposure on auditory filial imprinting area of chick forebrain. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 62, p. 125 - 132, 2013.

MALCHAIRE, J. Sound measuring instruments. In B. Goelzer, C. Hansen, & G. Sehrdt [Report], p. 25 – 140, 2001.

NBR 10.152. Avaliação do ruído em áreas habitadas, visando o conforto da comunidade – Procedimento. **ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 4, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em 2016.

SANYAL, T.; KUMAR, V.; NAG, T. C.; JAIN, S.; SREENIVAS, V. Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in chicks. **PLoS ONE**, v. 8, p. 16, 2013.

SOUZA, A.R.; PAIXÃO, A.C. UZÊDA, D.D.; DIAS, M.A.; DUARTE, S.; AMORIM, H.S. A placa Arduino: uma opção de baixo custo para experiências de física assistidas pelo PC. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, n. 1, p. 1702, 2011.

TONG, I. M.; MCGONNELL, C. E. B.; ROMANINI, H. BERGOUG, N.; ROULSTON, V.; BERCKMANS, C.; BAHRC, M.; GUINEBRETIERED, N.; ETERRADOSSID, P. Effect of species-specific sound stimulation on the development and hatching of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 56, p. 143 - 148, 2015.

TORRES, J. D.; MONTEIRO, I. O.; SANTOS, J. R.; ORTIZ, M. S. Aquisição de dados meteorológicos através da plataforma Arduino: construção de baixo custo e análise de dados. **Scientia Plena**, v. 11, n. 2, p. 13, 2015.

## **4. ESTÍMULOS SONOROS NA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL: EFEITOS NO CRESCIMENTO EMBRIONÁRIO E NA ECLOSÃO DE PINTOS DE CORTE**

### **RESUMO**

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da estimulação sonora na incubação artificial sobre o crescimento embrionário e eclosão de pintos de corte. Os tratamentos foram determinados por dois níveis de pressão sonora (NPS), um controle a 70 dB (A) e o outro representando incubadoras comerciais a 90 dB (A), acrescidos ou não de vocalizações da espécie. Essas combinações determinaram os tratamentos: S1 [70 dB (A) sem vocalizações] - controle, S2 [90 dB (A) sem vocalizações], S3 [70 dB (A) com vocalizações] e S4 [90 dB (A) com vocalizações]. Foram realizadas oito repetições (ciclos de incubação), em um delineamento aleatorizado em blocos. As respostas avaliadas foram divididas no pré-eclosão e na eclosão dos pintos. O crescimento embrionário não foi influenciado pela estimulação sonora. O NPS de 90 dB (A) resultou em uma maior perda de peso dos ovos, em eclosões mais precoces, maior taxa de eclodibilidade e melhor qualidade dos pintos (jarretes e umbigos). O efeito das vocalizações da espécie só foi observado no tempo de eclosão e na qualidade das aves, quando associado ao NPS de 70 dB (A), reduzindo e melhorando estas respostas, respectivamente. Em suma, a exposição ao NPS de 90 dB (A) melhorou as respostas relacionadas à eclosão, enquanto que os efeitos das vocalizações da espécie só foram observados na associação com o NPS 70 dB (A).

Palavras-chave: Bioacústica; Eclodibilidade; Janela de eclosão; Ruído; Vocalizações

### **ABSTRACT**

The objective of this research was to evaluate the effects of sound stimulation in artificial incubation on embryonic growth and hatching of broiler chicks. The treatments were determined by two sound pressure levels (SPL), the control with 70 dB (A) and the SPL representing commercial hatcheries with 90 dB (A), added (or not) with vocalizations of the species. The following combinations determined the treatments: S1 [70 dB (A) without vocalizations], S2 [90 dB (A) without vocalizations], S3 [70 dB (A) with vocalizations], and S4 [90 dB (A) with vocalizations]. Eight repetitions (hatching cycles) were performed in a randomized block design. The evaluated responses were divided in pre-hatching and hatching. Embryonic growth was not influenced by sound stimulation. The SPL of 90 dB (A) resulted in higher egg weight loss, earlier hatching, higher hatchability and better quality of chicks (hocks and navels). The effect of species vocalizations was only observed in time of hatching and in the quality of the chicks, when such stimulus was added to the 70 dB (A), reducing and improving these responses, respectively. In summary, exposure to SPL of 90 dB (A) improved hatching responses, whereas the effects of vocalizations of the species were only observed in association with 70 dB (A) SPL.

Keywords: Bioacoustics; Hatchability; Hatch window; Noise; Vocalizations

#### 4.1. Introdução

A incubação artificial é um dos grandes progressos da avicultura de corte. Tal técnica foi aprimorada ao longo do tempo visando a otimização da produção dos pintos que são destinados às granjas. Condições ótimas de temperatura e umidade já foram estabelecidas e são controladas com precisão, as incubadoras apresentam mecanismos eficientes de viragem e renovação do ar.

Mesmo com toda sua eficiência, autores como Tzschentke (2012), Archer; Mench (2013), Tong et al. (2015a) e Tong et al. (2015b) mencionam a existência de outros fatores inerentes à incubação que podem influir na embriogênese e em aspectos da vida pós-eclosão das aves. Tais suposições são levantadas partindo-se do princípio de que qualquer estímulo da vida embrionária possa resultar em alterações fisiológicas e comportamentais que delineiam o futuro dos animais (RUMPF; TZSCHENTKE, 2010; SOLDATOVA, 2011; DIXON et al., 2015).

Dentre estes fatores, a bioacústica (estimulação sonora) têm-se demonstrado como uma inovação ao processo de incubação. Trabalhos realizados no campo da neurofisiologia, como os de Alladi et al. (2005), Chaudhury et al. (2009), Kesar et al. (2013), Sanyal et al. (2013a), Sanyal et al. (2013b) e Roy et al. (2014), relataram o aumento no número de neurônios e uma maior expressão de proteínas sinápticas nos núcleos do tronco cerebral associados à audição de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) em decorrência dos efeitos da exposição à diferentes tipos de sons durante o desenvolvimento embrionário.

É importante mencionar que os embriões de aves possuem um desenvolvimento anatomofisiológico precoce, o que ainda inclui a formação e a maturação de seu sistema auditivo. Por volta do 16º dia de incubação, eles são capazes de detectar e processar sons externos (JONES et al., 2006). A isto associa-se o fato de que na natureza existem mecanismos de comunicação vocal da galinha com os embriões e mesmo entre embriões. Na fase final, eles começam a emitir sons e a bicarem as cascas, o que é considerado como um importante mecanismo de sincronização das eclosões (RUMPF; TZSCHENTKE, 2010; TEFERA, 2012; EDGAR et al., 2016; MARIETTE; BUCHANAN, 2016).

Todavia, na incubação artificial, o ruído do funcionamento das incubadoras atinge magnitudes superiores a 90 dB (A) (CARVALHO et al., 2009), o que poderia mascarar os sons das bicadas e atrapalhar o processo natural de eclosão. Limites

de exposição aos ruídos ainda não foram estabelecidos para embriões em desenvolvimento, mas acredita-se que exposições a sons arrítmicos (ruídos) superiores a 80 dB (A) possam comprometer aspectos fisiológicos e comportamentais destes animais (SANYAL et al., 2013a; ROY et al., 2014).

Considerando a importância do ambiente físico e a busca por outros fatores capazes de influir no desenvolvimento embrionário das aves domésticas, objetivou-se com esta pesquisa avaliar os efeitos da estimulação sonora (níveis de ruído acrescidos ou não de vocalizações da espécie) no crescimento embrionário e em respostas tomadas na eclosão dos pintos de corte.

## 4.2. Material e Métodos

Incubações experimentais com diferentes estímulos sonoros foram conduzidas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ambiente (NUPEA), na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba/SP (Latitude: 22° 42’ 41.4” Sul; Longitude 47° 37’ 47.2” Oeste; Altitude: 546 metros). A pesquisa teve um ano de duração, com início em setembro de 2016. Todas as práticas que envolveram os animais foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da ESALQ/USP (protocolo 2015 - 21).

### 4.2.1. Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos basearam-se em dois níveis de pressão sonora do ruído de incubadoras associados ou não às vocalizações naturais da espécie, delineados em um sistema de blocos, considerando um esquema fatorial 2 x 2. Por convenção os tratamentos designados como S1, S2, S3 e S4 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Descrição dos tratamentos experimentais

Tratamentos	Nível de pressão sonora do ruído (NPS)	Vocalizações da espécie
S1 (controle)	Ruído da incubadora a 70 dB (A)	Sem adição
S2	Ruído da incubadora a 90 dB (A)	Sem adição
S3	Ruído da incubadora a 70 dB (A)	Com adição
S4	Ruído da incubadora a 90 dB (A)	Com adição

O nível de pressão sonora de 70 dB (A) foi considerado como o controle. Enquanto que o NPS de 90 dB (A) foi obtido previamente em um incubatório comercial (Anexo A). O segundo fator avaliado foi a adição de vocalizações da espécie e para isso utilizou-se uma compilação de sons de *Gallus gallus domesticus*. Estes sons foram obtidos em campo e em arquivos livres. O NPS médio das vocalizações foi de 75 dB (A), com picos de 85 dB (A), o que é citado por apresentar resultados benéficos aos embriões (FOSTER et al., 1995; JAIN et al., 2004; ROY et al., 2013). A frequência das vocalizações foi analisada no programa SPEK<sup>®</sup>, verificando-se que estas estavam na banda de audição das aves de 100-6000 Hz (ALLADI et al.; 2005; SANYAL et al., 2013a; KESAR, 2013).

O ruído das incubadoras esteve presente 24 horas/dia a partir do 1º dia de incubação. Enquanto que as vocalizações da espécie foram adicionadas a partir do 12º dia, em decorrência do desenvolvimento do sistema auditivo dos embriões, assim como o sugerido em pesquisas já realizadas (ALLADI et al., 2005; JAIN et al., 2004; SANYAL et al., 2013; ROY et al., 2014). As vocalizações foram contínuas, com picos de atividade em intervalos de 20 minutos, como o sugerido por Foster et al. (1995). Os tratamentos sonoros foram mantidos até a retirada dos pintos, compreendendo obrigatoriamente o período de 24 horas pós-eclosão.

Com exceção do tratamento S1, os demais foram reproduzidos em arquivos MP3 por caixas amplificadoras (Mini Speaker<sup>®</sup> - BT51) com potência nominal de 5W. As caixas foram colocadas no interior das incubadoras, em uma das laterais e entre as bandejas de incubação. No tratamento S4 foram utilizadas duas caixas lado a lado, uma para reprodução do NPS de 90 dB (A) e outra para as vocalizações. Foram realizadas calibrações dos tratamentos no interior das incubadoras com um decibelímetro comercial (modelo DEC - 490 da Instrutherm<sup>®</sup>) e no interior de um ovo/incubadora com um sensor miniaturizado desenvolvido em uma etapa anterior desta pesquisa. As calibrações dos tratamentos aplicados na incubação encontram-se no Anexo B.

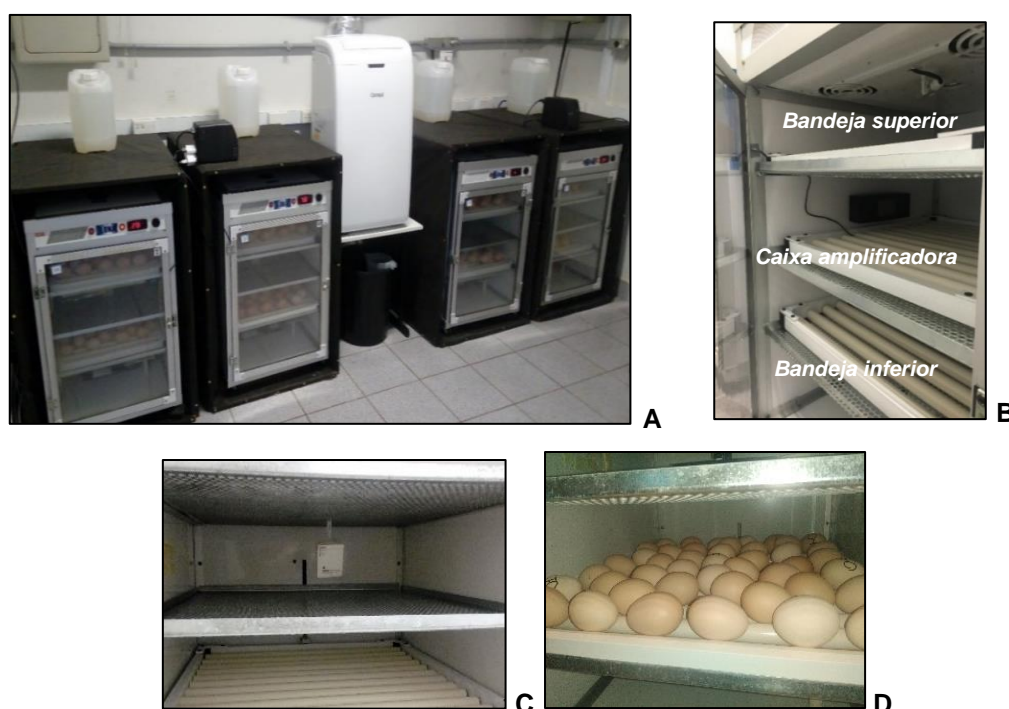
Foram realizadas oito repetições (blocos), condizentes com oito ciclos de incubação em quatro incubadoras diferentes. Em função disto, considerou-se um controle local duplo de linhas (blocos – tempo) e colunas (incubadoras), com os tratamentos aleatorizados e igualmente repetidos nas mesmas, totalizando-se 32 unidades experimentais (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição dos tratamentos nas incubadoras em cada repetição (bloco)

Repetição	Incubadoras			
	1	2	3	4
Bloco 1	S3	S4	S2	S1
Bloco 2	S2	S3	S1	S4
Bloco 3	S1	S2	S4	S3
Bloco 4	S4	S1	S3	S2
Bloco 5	S3	S4	S2	S1
Bloco 6	S2	S3	S1	S4
Bloco 7	S1	S2	S4	S3
Bloco 8	S4	S1	S3	S2

#### 4.2.2. Incubações experimentais

As incubadoras utilizadas nesta pesquisa são da Chocmaster®, modelo Luna, com controlador automático de temperatura e umidade (Coel®, modelo Y39UHQR). Internamente existem bandejas com roletes que garantem a viragem dos ovos a cada duas horas. Detalhes delas estão na Figura 15A/B/C/D.



**Figura 15.** Incubadoras isoladas acusticamente (A); vista interna de uma incubadora com a caixa amplificadora (B); ovos incubados (C); controle da temperatura e umidade (D)

As incubadoras encontravam-se em uma mesma sala, climatizada a 25 °C, o que implicou na necessidade de isolá-las acusticamente para que não houvesse interferência entre os tratamentos. Para o isolamento, as incubadoras foram mantidas em caixas de MDF revestidas com espuma acústica (Figura 15A).

A temperatura de incubação foi ajustada em 37,5 °C e a umidade relativa em 55%, valores recomendados para o desenvolvimento embrionário de linhagens comerciais. Tais variáveis foram acompanhadas a cada 15 minutos com dataloggers da Onset's HOBO® (modelo U12-013) (Figura 15C). Optou-se por não utilizar a bandeja do meio para a incubação, local em que foram dispostas as caixas amplificadoras para a aplicação dos tratamentos (Figura 15B).

Os ovos férteis foram adquiridos de um único matrizeiro de uma integradora comercial e a linhagem utilizada foi a COBB – 500®. Como o experimento foi conduzido em vários ciclos, a idade das matrizes progrediu ao longo do tempo, acarretando em trocas de lotes. Ao todo 2880 ovos foram incubados, distribuídos igualmente entre repetições e tratamentos. Em cada ciclo de incubação trabalhou-se com um montante de 360 ovos, com 15 unidades a mais para a substituição dos descartados (trincados, sujos, pequenos/grandes demais). A Tabela 6 traz essas e outras informações sobre as repetições.

**Tabela 6.** Informações referentes as repetições de incubações

Incubações	Ovos	Idade matrizes (semanas)	Postura	Incubação	Eclusão
1	360	45	02/09/16	07/09/16	28/09/16
2	360	53	02/11/16	07/11/16	28/11/16
3	360	59 <sup>1</sup>	23/12/16	26/12/16	17/01/17
4	360	46	23/02/17	28/02/17	20/03/17
5	360	52	07/04/17	11/04/17	01/05/17
6	360	57	10/05/17	15/05/17	05/06/17
7	360	63 <sup>2</sup>	16/06/17	26/06/17	16/07/17
8	360	59 <sup>3</sup>	06/09/17	12/09/17	03/10/17

<sup>1</sup>Primeira troca de lote; <sup>2</sup>Segunda troca de lote; <sup>3</sup>Terceira troca de lote

Os ovos foram distribuídos igualmente entre as bandejas (superior e inferior) e posicionados verticalmente (Figura 15D). As incubadoras foram ligadas simultaneamente, sendo abertas somente para a coleta das variáveis resposta. No 19º dia de incubação, a viragem foi desligada, a temperatura reduzida em 0,5 °C e a saída de circulação de ar aberta. As incubadoras foram limpas e desinfetadas em cada ciclo, adotando-se se como vazio sanitário o intervalo entre as incubações.

#### 4.2.3. Variáveis resposta

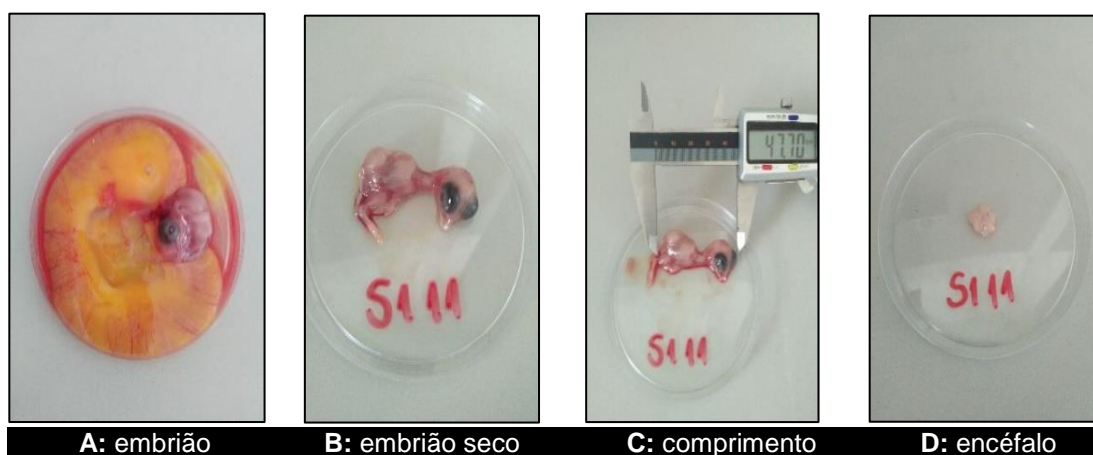
As variáveis resposta avaliadas foram subdivididas em respostas do pré-eclusão e em respostas tomadas no momento da eclusão (Figura 16).

Pré-eclosão	Eclosão
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perda de peso dos ovos (g)</li> <li>- Peso do embrião (g)</li> <li>- Peso relativo do embrião (%)</li> <li>- Comprimento do embrião (mm)</li> <li>- Peso do encéfalo (g)</li> <li>- Peso relativo do encéfalo (%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tempo início, fim e janela de eclosão (h)</li> <li>- Eclodibilidade e tipos de mortalidade (%)</li> <li>- Qualidade física das aves (escores)</li> <li>- Temperatura cloacal (°C)</li> <li>- Corticosterona plasmática (ng/mL)</li> </ul>

**Figura 16.** Resumo das variáveis resposta obtidas no experimento

#### 4.2.3.1. Respostas pré-eclosão

Ao todo 192 ovos foram utilizados nas respostas do pré-eclosão, originários de quatro repetições, divididos por tratamento e por tempo, sendo estes o 12º, 15º e o 18º dia de incubação. Os ovos foram identificados numericamente e pesados antes da incubação obtendo-se o peso dos ovos antes da incubação (PO1; g). Posteriormente, em cada tempo, quatro ovos/tratamento foram retirados das incubadoras e pesados para a obtenção do PO2 (g), possibilitando-se estimar a perda de peso (PPO; g). Estes mesmos ovos foram abertos e os embriões removidos, com a interrupção do seu desenvolvimento. Algumas etapas encontram-se na Figura 17.



**Figura 17.** Respostas pré-eclosão. Nesta imagem exemplifica-se uma coleta no 12º dia de incubação

Após a extração dos anexos embrionários, realizou-se a pesagem dos embriões (PE; g) e o cálculo do peso do embrião em relação ao ovo (PRE; %), determinado por:  $PRE = (PE/PO2) * 100$ .

O comprimento dos embriões (CE; mm) foi determinado com um paquímetro digital (modelo 727 6/150 mm; Starrett®), entre a cabeça e a base da cauda. Em sequência, o encéfalo foi removido fazendo-se uma incisão na base



cervical da cabeça com a retirada de todo material, incluindo o cérebro, cerebelo e bulbo espinhal. O encéfalo foi pesado (PEnc; g), obtendo-se o peso deste órgão em relação ao peso do embrião (PREnc; %), dado:  $PREnc = (PEnc/PE) * 100$ . As pesagens (embriões e encéfalos) foram realizadas em uma balança semianalítica com precisão de 0,10 g (modelo BG 2000; Gehaka®).

#### **4.2.3.2. Respostas da eclosão**

##### **i. Tempo de eclosão**

A partir do 20º dia de incubação, observações das eclosões a cada duas horas e entre 08:00 e 18:00 horas foram realizadas com o objetivo de identificar o início (IE; horas) e o término das eclosões (TE; horas). Dessa forma, foi possível calcular a janela de eclosão (JE; horas), de acordo com Tona et al. (2010). Com essas observações também foram determinadas por tratamento a percentagem de ovos eclodidos em 21 dias de incubação (tempo padrão), as eclosões atrasadas (após 22 dias) e a percentagem de eclosões/tratamento em a cada 12 horas.

##### **ii. Eclodibilidade e mortalidade embrionária**

A eclodibilidade (ECLO; %) foi determinada pela relação do total de pintos eclodidos pelo total de ovos férteis incubados. Os pintos eclodidos e que morreram nas bandejas foram considerados neste cálculo.

Os ovos não eclodidos foram caracterizados quanto ao tipo de mortalidade embrionária: a mortalidade inicial (M1; %) foi determinada quando o desenvolvimento foi interrompido nos sete primeiros dias de incubação; a mortalidade intermediária (M2; %) entre o 8º e o 17º dia; e a mortalidade tardia (M3; %) entre o 18º e o final dos 21 dias (ROSA; AVILA, 2000; PLANO; Di MATTE, 2013). A mortalidade inicial (M1, %) foi diferenciada dos ovos inférteis quando se constataram indícios de desenvolvimento embrionário, como a formação do blastoderma. Os ovos bicados foram classificados como mortalidade tardia. Os pintos vivos que iniciaram a eclosão, mas não saíram dos ovos, foram removidos manualmente e abatidos com o deslocamento cervical (CONCEA, 2013).

Da totalidade dos ovos não eclodidos, identificaram-se também aqueles que estavam contaminados ou trincados, que inviabilizam o desenvolvimento embrionário. Estas unidades, assim como os inférteis, são desconsideradas nas

análises dos efeitos dos tratamentos, partindo do pressuposto de que tais eventos não dependem da estimulação sonora recebida na incubação.

### **iii. Temperatura cloacal e corticosterona plasmática**

A temperatura cloacal (TClo; °C) foi aferida em todas as repetições, com uma amostra de 10 pintos/tratamento. Essa resposta foi determinada por um termômetro digital tipo espeto (Oregon Scientific®) foi introduzido na cloaca do pinto e mantido até que houvesse a estabilização da leitura (aproximadamente 30 segundos) (SOZCU; IPEK, 2015a).

Na dosagem da corticosterona plasmática (CORT; ng/mL) oito pintos/tratamento de uma incubação foram utilizados. Realizou-se a decapitação para a coleta do sangue e para evitar o efeito do tempo os tratamentos foram alternados na coleta. O sangue extraído ( $\approx 1,2$  ml) foi centrifugado em uma microcentrífuga a 3500 rpm, por 15 minutos, para a obtenção do soro. A parte sérica das amostras foi armazenada a -5 °C até o envio para o laboratório. Para a dosagem foi feito o radiomunoensaio, com o kit Duplo Ac Corticosterone Rat (MPBiomedicals®).

### **iv. Qualidade física dos pintos**

Os pintos foram analisados quanto à sua viabilidade. Os refugos ou com alguma malformação (vísceras expostas, duplicações e/ou problemas nos membros, alterações oculares ou nos bicos) foram classificados como pintos de descarte (PD; %), com a identificação e contabilização dos problemas (Anexo C) (PLANO; Di MATTE, 2013; HUTH; ARCHER, 2015). Devido à baixa viabilidade, estes pintos foram abatidos por meio do deslocamento cervical (CONCEA, 2013).

Os pintos em bom estado ou com defeitos que não comprometessem sua vida futura foram avaliados quanto à qualidade dos jarretes (QJ) e do umbigo (QU), de acordo com o estabelecido nas metodologias de Tona et al. (2005), Nanguay et al. (2016), Ipek et al. (2014) e Sozcu; Ipek (2015b). Para estas duas respostas, foram utilizados escores de avaliação de 1 a 3, ilustrados e descritos no Anexo C.

#### **4.2.4. Análise estatística**

As análises descritas nesta seção foram executadas no software estatístico R (R CORE TEAM, 2017). As relações causais entre os fatores experimentais e

possíveis alterações nas respostas de interesse foram investigadas por meio da ANOVA (respostas normais), análise de deviance (contagens e proporções) ou técnicas não-paramétricos como ANOVA sobre postos (tempos de eclosão).

As ANOVAs foram conduzidas considerando um modelo linear clássico de efeitos fixos e suas pressuposições foram validadas a partir de gráficos dos resíduos e os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias de Bartlett. Os tratamentos foram comparados pelos testes t e de Tukey.

No caso dos dados de eclosão, utilizou-se um modelo linear generalizado para resposta binomial e com função de ligação logit (FARAWAY, 2006; WARTON; HUI, 2011). Primeiramente ajustou-se um modelo completo, considerando efeitos de incubadoras, blocos (tempos), vocalização da espécie, nível de ruído e interação entre os dois últimos fatores. Efeitos não significativos foram retirados gradativamente do modelo corrente, a fim de seleção do melhor modelo. Os modelos foram comparados, etapa a etapa, a partir do teste da razão de verossimilhança. A análise da deviance residual foi realizada para averiguar a falta de ajuste dos modelos. Gráficos dos resíduos e envelopes simulados foram usados para complementar o diagnóstico do ajuste. A regressão binomial é expressa de acordo com a influência que os fatores experimentais possuem sobre as probabilidades ( $p$ ) ou chances ( $c$ ) do evento de interesse. Chances e probabilidades são intercambiáveis a partir da expressão:  $p = c/(1+c)$ .

Para as respostas associadas ao tempo de eclosão foram usadas técnicas de análise não paramétricas. Executou-se ANOVA sobre os postos das observações. Os grupos experimentais foram comparados entre si por meio do teste de Friedman para delineamentos em blocos. Correções de Bonferroni para cada grupo foram aplicadas a fim de corrigir o valor de  $\alpha$ . Utilizou-se para todos os testes de hipóteses  $\alpha = 0,05$ .

### **4.3. Resultados e Discussão**

#### **4.3.1. Respostas pré-eclosão**

As respostas mencionadas no pré-eclosão referiram-se a perda de peso dos ovos e ao crescimento embrionário em 12, 15 e 18 dias de incubação. Como o

esperado, o efeito do tempo foi significativo nestas respostas ( $p < 0,05$ ), refletindo o crescimento normal dos embriões e a perda de peso natural dos ovos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resumo da análise de variância (teste F e valores p) das respostas: perda de peso dos ovos (PPO; g), comprimento do embrião (CE; mm), peso do embrião (PE; g), peso relativo do embrião (PRE; %), peso do encéfalo (PEnc; g) e peso relativo do encéfalo (PREnc; %)

Efeitos	Variáveis											
	PPO		CE		PE		PRE		PEnc		PREnc	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	P	F	p
B	3,51*	0,026	7,44*	<0,001	7,30*	<0,001	7,018*	<0,001	5,424*	0,004	0,509*	0,003
I	4,44*	0,014	2,18	0,110	2,16	0,090	1,749	0,178	0,715	0,550	1,337	0,280
T	60,11*	<0,001	354,6*	<0,001	585,4*	<0,001	587,0*	<0,001	894,5*	<0,001	191,1*	<0,001
R	4,90*	0,034	3,69	0,061	1,62	0,212	0,476	0,495	1,328	0,258	0,518	0,477
V	0,189	0,666	0,20	0,653	0,24	0,625	0,452	0,506	0,016	0,898	0,246	0,623
T x R	1,387	0,265	0,08	0,921	0,19	0,821	0,304	0,739	0,271	0,764	0,129	0,879
T x V	0,219	0,804	2,19	0,128	0,73	0,486	0,646	0,530	2,101	0,139	0,069	0,933
R x V	0,323	0,573	3,67	0,064	0,64	0,427	0,684	0,414	1,618	0,213	0,351	0,557
TxRxV	2,060	0,145	1,90	0,166	0,08	0,919	0,033	0,967	0,199	0,819	0,284	0,754
R <sup>2</sup> (%)	83,94		96,17		97,57		96,58		97,92		92,85	
CV (%)	9,28		5,56		12,10		12,34		6,44		12,26	

\* Efeito significativa ao nível de 5%. Graus de liberdade residual: gl=30

B: blocos; I: incubadoras; T: tempo; R: níveis de pressão sonora (70 ou 90 dB); V: vocalizações (com adição ou sem); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação do modelo ajustado; CV: coeficiente de variação

As médias dos ovos submetidos aos diferentes tratamentos para PPO, PE, PRE, PEnc e PREnc não diferiram dentro dos tempos de avaliação, bem como não houve interação entre os fatores principais (nível de pressão sonora do ruído e vocalizações) e interação destes com os tempos ( $p > 0,05$ ). Assim, os efeitos principais foram testados comparando-se as médias dos três tempos. Somente o NPS do ruído apresentou efeito significativo ( $p = 0,034$ ) na perda de peso dos ovos, com os ovos expostos a 90 dB (A) apresentando uma maior PPO (Tabela 8).

**Tabela 8.** Médias das respostas do pré-eclosão, erros-padrão e comparações pelo teste t

Variáveis	Efeitos			
	Nível de pressão sonora		Vocalização da espécie	
	70 dB (A)	90 dB (A)	Sem	Com
PPO (g)	4,73 ± 0,18 a	5,02 ± 0,19 b	4,90 ± 0,17 a	4,85 ± 0,19 a
CE (mm)	60,89 ± 2,96 a	64,86 ± 3,01 a	63,64 ± 2,74 a	64,11 ± 3,22 a
PE (g)	15,81 ± 2,06 a	16,53 ± 2,07 a	16,03 ± 2,01 a	16,31 ± 2,12 a
PRE (%)	25,51 ± 3,41 a	26,14 ± 3,32 a	25,51 ± 3,30 a	26,13 ± 3,43 a
PEnc (g)	0,43 ± 0,32 a	0,44 ± 0,31 a	0,43 ± 0,30 a	0,43 ± 0,33 a
PREnc (%)	3,45 ± 0,26 a	3,36 ± 0,25 a	3,44 ± 0,26 a	3,38 ± 0,25 a

\*Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste t ( $p < 0,05$ )

PPO: perda de peso dos ovos; CE: comprimento do embrião; PE: peso do embrião; PRE: peso relativo do embrião; PEnc: peso do encéfalo; PREnc: peso relativo do encéfalo

A perda de peso dos ovos durante a incubação é o resultado da saída de vapor d'água pelos poros da casca, em função da dissociação da água das proteínas do albúmen (SCOTT; SILVERSIDES, 2000; ROCHA et al., 2013). Para a

maior PPO em 90 dB (A), levantaram-se duas hipóteses: (1) uma maior vibração das bandejas de incubação pela energia resultante do NPS superior, como o sugerido por Rumpf; Tzschentke (2010); (2) uma maior atividade metabólica dos embriões, o que foi explicado por Soldatova (2011). O percentual médio de PPO foi de 8,79% nos tratamentos expostos a 90 dB (A) e de 8,32% em 70 dB (A).

A não significância de efeitos da estimulação sonora no crescimento embrionário (PE e CE) corrobora os resultados de outras pesquisas. Tong et al. (2015a) também não encontraram significância de efeitos de seus tratamentos no PE com a adição de vocalizações da espécie a 72 dB (A). Em sua pesquisa, o único fator que influenciou nessa resposta foi o tempo de incubação. Soldatova (2011), por exemplo, verificou que aos 18 dias de incubação embriões estimulados com sons de bicadas a 80 dB (A) apresentaram um peso médio de 27,8 g, enquanto que o controle 26,5 g (4,67% a menos). Neste trabalho verificou-se que a média de PE de S3 foi 6,85% superior à de S1 ( $29,31 \pm 3,70$  g vs.  $27,30 \pm 3,76$  g), o que é similar aos resultados de Soldatova (2011), sem significância de efeitos, mas com uma tendência à redução no PE do controle.

O peso do encéfalo (PEnc) e o peso relativo do encéfalo (PREnc) não apresentaram evidências que comprovassem o efeito da estimulação sonora da incubação. Os tratamentos apresentaram médias similares, com valores de PEnc próximos a 0,25 g no 12º, a 0,42 g no 15º e a 0,60 g 18º dia. Sanyal et al. (2013b) também não verificaram diferenças significativas em PEnc, sendo estes de 0,63 g no controle, 0,64 g no estímulo com música rítmica e de 0,61 g no ruído a 110 dB (A). Os pesos cerebrais de pintos recém-eclodidos do controle e dos tratamentos estimulados (vocalizações e música rítmica) testados por Wadhwa et al. (1999) foram de 0,83 e 1,03 gramas, respectivamente, também não diferindo entre si.

Em contrapartida, Kesar (2013) verificou que a exposição ao ruído (110 dB) reduziu significativamente o peso do encéfalo no final da incubação (0,60 g vs. 0,68 g do controle). Para Kesar (2013), enquanto que a estimulação sonora positiva aumentou o crescimento da massa encefálica, o ruído a degenerou. O NPS utilizado por este autor foi superior ao desta pesquisa, mas similar ao avaliado por Sanyal et al. (2013b), que não encontraram efeitos significativos para o PEnc.

Com os resultados apresentados, atenta-se para a necessidade de mais pesquisas que comprovem realmente os efeitos da estimulação sonora em parâmetros relacionados ao crescimento embrionário das aves. Por ora, observou-

se uma maior perda de peso dos ovos expostos ao NPS de 90 dB (A), além de uma tendência à redução no peso dos embriões no tratamento controle. De toda forma, o NPS superior de 90 dB (A) não comprometeu o crescimento embrionário, como não foram observados efeitos da adição das vocalizações da espécie nestas respostas. Deve-se considerar que as pesquisas que avaliaram a exposição a 110 dB (A) apresentaram respostas significativas e não significativas, o que nos remete a realização de estudos com NPS superiores para verificar a influência desta no crescimento embrionário.

### 4.3.2. Respostas da eclosão

#### i. Tempo de eclosão

O desenvolvimento embrionário das aves comerciais ocorre em 504 horas, mas as eclosões podem adiantar ou atrasar, o que está associado diretamente a eficiência da incubação (VAN de VEN et al., 2012; LØTVEDT; JENSEN, 2014). As médias e desvios-padrão das respostas início e término das eclosões e janela de eclosão dos tratamentos avaliados estão na Tabela 9.

**Tabela 9.** Médias e desvios-padrão do tempo de eclosão dos tratamentos

Variáveis	Tratamentos			
	S1	S2	S3	S4
Início das eclosões (IE; h)	494,44 ± 12,50	486,61 ± 11,65	488,25 ± 11,38	487,25 ± 11,05
Término das eclosões (TE; h)	534,11 ± 11,22	529,85 ± 9,44	530,12 ± 9,65	531,37 ± 10,00
Janela de eclosão (JE; h)	39,66 ± 6,77	43,24 ± 9,18	41,87 ± 7,71	44,12 ± 5,59

Em condições ideais, estima-se que em 484 horas de incubação 50% das eclosões já tenham ocorrido, considerando a linhagem COBB (TONA et al., 2010). Assume-se que neste experimento as eclosões tenham se iniciado tardiamente, o que pode ser atribuído a menor eficiência das incubadoras experimentais.

Para o início das eclosões (IE; h), o NPS do ruído (R) e a interação dos fatores vocalização x NPS do ruído (V x R) foram significativos pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Além disso, o valor p foi relativamente baixo quando considerada a interação V x R na resposta TE (h) ( $p = 0,052$ ). Quanto à janela de eclosão (JE; h), não houve influência dos fatores experimentais avaliados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resumo da análise de variância *two way* não-paramétrica (teste F e valores p) para o início da eclosão (IE; h), término da eclosão (TE; h) e janela de eclosão (JE; h)

Efeitos	Variáveis					
	Início da eclosão (IE; h)		Término da eclosão (TE; h)		Janela de eclosão (JE; h)	
	F	p	F	p	F	p
B	31,05*	<0,0001	13,98*	<0,0001	4,35*	0,00557
I	0,84	0,49192	0,29	0,83382	0,67	0,58414
V	2,59	0,12492	0,41	0,52878	0,01	0,94205
R	16,41*	0,00075	0,46	0,50511	1,51	0,23502
V X R	6,52*	0,01998	4,32	0,05229	0,02	0,90357
R <sup>2</sup> (%)	93,16		85,24		65,36	
CV (%)	19,31		28,36		43,59	

\* Efeito significativa ao nível de 5%. Graus de liberdade residual: gl = 18

B: blocos; I: incubadora; V: vocalizações (com adição ou sem); R: ruído (70 ou 90); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação do modelo ajustado; CV: coeficiente de variação

Pelo teste de Friedman ( $\alpha = 0,05$ ) o TE ( $x^2 = 3,85$ ; gl = 3; p = 0,281) e a JE ( $x^2 = 3,69$ ; gl = 3; p = 0,301) não foram influenciadas pela estimulação sonora. Entretanto, no início das eclosões (IE), a distribuição dos dados diferiu entre os tratamentos ( $x^2 = 15,36$ ; gl = 3; p = 0,001). O IE variou entre os NPS sem as vocalizações ( $x^2 = 7$ ; gl = 1; p = 0,008), com eclosões mais precoces em 90 dB (A). Porém, os NPS não diferiram entre si na presença das vocalizações ( $x^2 = 1$ ; gl = 1; p = 0,317). Além disso, o IE diferiu em distribuição para as vocalizações quando elas foram adicionadas à 70 dB (A) ( $x^2 = 7$ ; gl = 1; p = 0,008), sem efeitos em 90 dB (A) ( $x^2 = 1,8$ ; gl = 1; p = 0,179), ou seja, o NPS superior encobriu os possíveis efeitos da adição das vocalizações da espécie. A Tabela 11 traz as comparações de médias e interações de IE.

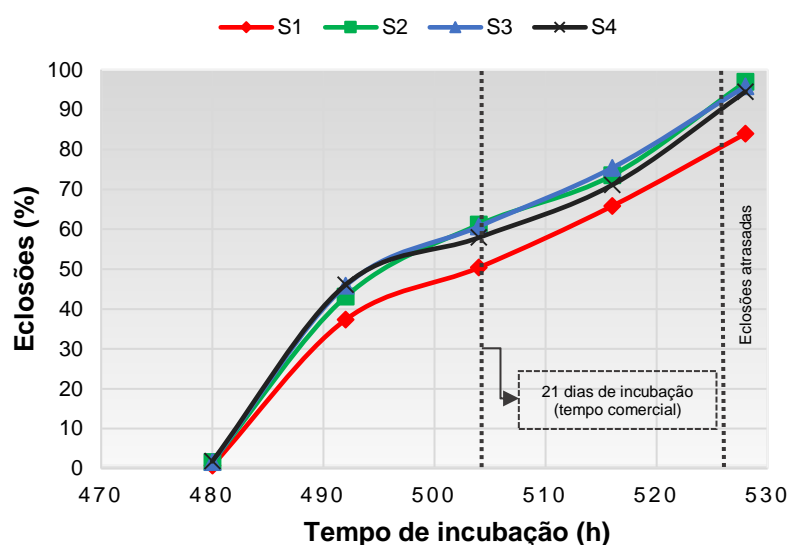
**Tabela 11.** Médias obtidas para os tempos de início de eclosão IE (h), erros-padrão e comparações pelo teste de Friedman

Vocalizações da espécie	Nível de pressão sonora do ruído	
	70 dB (A)	90 dB (A)
Sem adição	492,75 ± 4,42 Aa	486,75 ± 4,12 Ab
Com adição	488,25 ± 4,03 Ba	487,25 ± 3,85 Aa

Letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística em distribuição dos grupos experimentais pelo teste de Friedman (p<0,05)

Percebe-se que o tratamento que apresentou o início das eclosões mais tardio foi o S1, determinado pela exposição a 70 dB (A) na ausência das vocalizações. De acordo com este resultado, afirma-se que a exposição ao ruído de 90 dB (A) resultou no adiantamento nas eclosões em cerca de 6 horas. Por outro lado, a hipótese de que a exposição ao menor NPS seria melhor foi rejeitada.

Veterány et al. (1998; 2005) encontraram resultados semelhantes. Em sua primeira pesquisa, o tratamento incubado com som apresentou um adiantamento de 4,17 horas no início das eclosões em relação ao controle ( $511,67 \pm 2,86$  h). Em sequência, eles verificaram que para um NPS inferior as eclosões se iniciaram com um atraso de 4,5 horas em relação ao tratamento exposto ao NPS com 20 dB (A) a mais ( $489,50 \pm 4,64$  h). Em complemento, a Figura 18 permite visualizar as porcentagens de eclosões dos tratamentos a partir do 20º dia de incubação.



**Figura 18.** Porcentagem de eclosões dos tratamentos de incubação a partir do 20º dia de incubação e em intervalos de 12 horas

Os tratamentos S2, S3 e S4 apresentaram um padrão semelhante para a porcentagem de pintos eclodidos/tempo, enquanto que S1 demonstrou valores de eclosão aparentemente inferiores. Por consequência, em 528 horas (22 dias) a eclodibilidade de S1 ainda estava próxima a 80%, resultando em uma maior ocorrência de eclosões tardias. Segundo Van de Ven et al. (2012) e Bergoug et al. (2013), tal atraso está associado a uma maior proporção de pintos de baixa qualidade, o que será correlacionado mais à frente com as demais respostas.

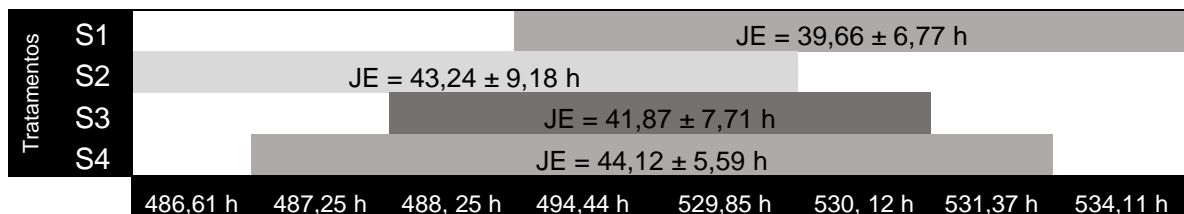
Ao contrário dos resultados encontrados, Tong et al. (2015a) observaram que, no início das bicagens, o grupo estimulado com vocalizações da espécie apresentou um atraso significativo de quatro horas em relação ao controle. Mas estes mesmos tratamentos não diferiram entre si quando considerado o tempo médio de incubação ( $483,9 \pm 1,3$  h no estimulado; e  $485,8 \pm 1,5$  h no controle). Deve-se considerar que os tratamentos e a metodologia empregada por eles foram



diferentes dos aqui utilizados, pois como tratamentos foram empregadas vocalizações da espécie a um NPS de 72 dB (A), em duas fases: chamadas maternas até o início das bicagens, substituídas pelos próprios sons de bicagens até o final da incubação.

Nos incubatórios, o tempo de incubação possui duas implicações. Uma delas é o descarte de ovos com potencial para eclosão, visto que a incubação é finalizada aos 21 dias, descartando dessa forma os ovos que ainda poderiam eclodir (BERGOUG et al., 2013; PLANO; Di MATTE, 2013; LØTVEDT; JENSEN, 2014). Além disso, quando as eclosões são antecipadas os pintos permanecem um maior tempo nos nascedouros, expondo-os ao calor e à desidratação, o que prejudica o seu desempenho futuro e bem-estar na fase inicial de suas vidas (FOSTER et al., 1995; BERGOUG et al., 2013; LØTVEDT; JENSEN, 2014).

Apesar da influência dos fatores experimentais no IE, a janela de eclosão (JE; h) não diferiu neste experimento ( $p > 0,05$ ). Isto pode ser explicado pelos tempos de início e final das eclosões, por exemplo, em S1 a JE foi de 39,66 h, igual à dos demais tratamentos, mas com um IE tardio e pintos mantidos nas incubadoras por até 534 horas (Figura 19).



**Figura 19.** Comparação das janelas de eclosão dos tratamentos com estimulação sonora

Um outro ponto é que as incubações experimentais foram finalizadas entre o 22º e 23º dia. Caso tivesse sido adotado como limite o 21º dia de incubação, como na indústria, seria observada uma redução considerável nas eclosões em S1 e uma menor janela de eclosão nos demais tratamentos, cujos efeitos seriam significativos assim como o ocorrido no tempo para o início das eclosões.

Rumpf; Tzschentke (2010) explicam que os embriões são capazes de produzir/perceber sons desde a vida embrionária. As primeiras vocalizações começam quando eles rompem a membrana abaixo da casca, prosseguindo-se com a produção de sons com a bicagem da mesma, sendo este o principal mecanismo de sincronização das eclosões. Em princípio, supôs-se que o NPS de 90 dB (A) pudesse atrapalhar a sincronização. Todavia, nesta condição as

eclosões adiantaram em até seis horas em relação ao NPS de 70 dB (A). Adotando-se o tempo de incubação de 21 dias a diferença na janela de eclosão seria visível e permitiria a retirada antecipada dos pintos das incubadoras.

## ii. Eclodibilidade e tipos de mortalidade embrionária

As médias referentes à eclodibilidade de S1, S2, S3 e S4 foram de 76,65%, 83,80%, 81,22% e 83,38%, respectivamente. Deparou-se com 2,3% de ovos inférteis e de 0,35% de ovos contaminados, desconsiderados na avaliação dos efeitos da estimulação sonora. Na Tabela 12 são apresentados os efeitos dos fatores experimentais sobre a chance de eclosão dos ovos férteis.

**Tabela 12.** Número de eclosões (E) e não eclosões (NE), chances de eclosão (CE), razão de chance (RC), estatística  $\chi^2$  para o teste de independência entre o fator experimental e o evento de eclosão e probabilidade de significância (p)

Fatores	Níveis	Estatísticas					
		E	NE	CE	RC	$\chi^2$	p
NPS do ruído	90 dB	837	168	4,982	1,337	6,309*	0,012
	70 dB	835	224	3,728			
Vocalizações da espécie	COM	883	191	4,623	1,178	1,964	0,161
	SEM	789	201	3,925			

\* Efeito significativo ao nível de 5%

As chances de eclosão (CE) corresponderam às razões entre o total de eclosões (E) e não eclosões (NE). Para a comparação relativa das chances foi utilizada a razão de chance (RC). Com este parâmetro, observou-se que a CE foi 33,7% maior para a exposição ao NPS de 90 dB (A) (RC = 1,337). Enquanto que a RC estimada mediante a adição das vocalizações foi 17,8% maior do que a calculada na ausência deste estímulo (RC = 1,178). Todavia, pelo teste  $\chi^2$ , somente o NPS culminou com a alteração significativa da CE (p = 0,012), enquanto a adição das vocalizações da espécie não influenciou nesta resposta (p = 1,161).

Os demais efeitos experimentais foram investigados pela regressão binomial com função de ligação logit, em que se confirmou que, dos fatores experimentais avaliados na incubação, apenas o nível de pressão sonora do ruído foi influente sobre a chance de eclosão (p = 0,0163) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise de deviance para o modelo binomial logístico ajustado aos dados de eclosão, com teste  $\chi^2$  para a diferença de deviances

Efeitos	GL	Deviance	GL residual	Deviance residual	Valor p P ( $>\chi^2$ )
NULO	--	--	30	37,487	--
I	3	4,0533	27	33,434	0,2558
B	7	6,1407	20	27,293	0,5234
V	1	2,4263	19	24,867	0,1193
R	1	5,7701	18	19,097*	0,0163
R x V	1	1,8123	17	17,285	0,1782

\* Efeito significativa ao nível de 5%

GL: graus de liberdade; NULO: modelo nulo; I: incubadoras; B: blocos (tempos); V: vocalização materna; R: ruído.

Inúmeros fatores podem afetar a eclodibilidade, mas poucas referências sobre a estimulação sonora foram descritas, um dos pontos que motivou a realização desta pesquisa. Por ora, afirma-se que os ovos incubados à 90 dB (A) apresentaram uma maior chance de eclosão, sendo a média dos tratamentos deste nível de 83,59% (S2 e S4) vs. 78,93% (S1 e S3) em 70 dB (A). Este resultado pode estar associado ao efeito positivo do som como um estímulo ao nascimento, mesmo este sendo um ruído (RUMPF; TZSCHENTKE, 2010).

As classificações dentro dos diferentes tipos de mortalidade embrionária estiveram acima do esperado para a linhagem. Observou-se que as proporções de mortalidade precoce e intermediária se apresentaram semelhantes entre os tratamentos, mas em S1 e S3 a mortalidade tardia se sobressaiu, possivelmente explicando a menor eclosão relacionada com a exposição a 70 dB (A) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Parâmetros que explicam a não eclosão dos ovos nos tratamentos avaliados

Parâmetros	Valores da literatura	Tratamentos				
		S1	S2	S3	S4	
Eclobilidade (%)	85 a 90	-	76,65	83,80	81,22	83,38
Mortalidade (%)	10 a 15	-	23,35	16,20	18,78	16,62
Mortalidade precoce (%)	2 a 4*	3**	4,70	3,60	3,90	3,40
Mortalidade intermediária (%)	0,5 a 0,7*	1**	2,20	1,40	2,00	2,50
Mortalidade tardia (%)	2 a 4*	5**	16,45	11,20	12,88	10,72
Bicados não eclodidos (%)	0,7 a 0,9*	-	3,62	3,57	3,21	3,06
Vivos (%)	-	-	1,37	1,73	0,88	1,33
Mortos (%)	-	-	2,24	1,83	2,32	1,72

\* Valores padrões estabelecidos por Rosa; Ávila (2000); \*\* Valores padrões estabelecidos por Plano; Di Matte (2013)

Tong et al. (2015a) também relataram um aumento na mortalidade tardia, todavia, no tratamento estimulado pelas vocalizações da espécie, com 5% a mais

em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Estes associaram tal resultado a um possível estresse causado pela estimulação sonora, até então considerada como positiva. Por isso, os mesmos remeteram à necessidade de mais pesquisas, além de cuidados quanto ao tempo de exposição, tipo de som e frequência.

Deparou-se com uma maior proporção de bicados mortos também em S1 e S3. Na prática, um pinto bicado vivo/morto era um ovo com potencial para eclosão, cuja ave não teve forças suficientes para sair da casca, sugerindo novamente que a exposição a 70 dB (A) não tenha favorecido o momento da eclosão.

Sanyal et al. (2013a) encontraram que a exposição à sons rítmicos a 110 dB (A) favoreceu o desenvolvimento cerebral e a aptidão de pintos no pós-eclosão. Estes autores não avaliaram respostas produtivas, como a eclodibilidade, porém, uma ligação de informações pode ser feita. Nesta pesquisa verificou-se que a exposição ao NPS superior de 90 dB (A) proporcionou uma maior chance de eclosão em relação ao NPS inferior de 70 dB (A), cuja causa principal das não eclosões foram as mortalidades tardias.

### iii. Temperatura cloacal e níveis de corticosterona plasmática

A Tabela 15 traz o resumo da ANOVA para as respostas temperatura cloacal (TClo; °C) e corticosterona plasmática (CORT; ng/mL). Dos fatores experimentais nenhum resultou em efeitos significativos sobre elas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 15.** Resumo da análise de variância (teste F e valores p) para as respostas fisiológicas temperatura cloacal (TClo; °C) e nível de corticosterona plasmática (CORT; ng/mL)

Efeitos	Variáveis			
	TClo		CORT	
	F	p	F	P
B	2,333	<0,001	-	-
I	35,031	0,142	-	-
V	0,558	0,474	0,111	0,742
R	0,899	0,367	1,543	0,224
V x R	1,008	0,341	2,247	0,145
R <sup>2</sup> (%)	94,33		12,23	
CV (%)	0,29		34,75	

\* Efeito significativa ao nível de 5%. Grau de liberdade residual 9 em TClo e 28 em CORT

B: blocos; I: incubadora; V: vocalizações (com adição ou sem); R: ruído (70 ou 90); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação do modelo ajustado; CV: coeficiente de variação

A média geral da temperatura cloacal foi de 39,56 °C. Preconiza-se que valores normais de TClo em pintos recém-eclodidos estejam entre 38,5 e 39,5 °C (SOZCU; IPEK, 2015a; SGAVIOLI et al., 2016). Os tratamentos de incubação

apresentaram médias muito próximas sendo estas:  $39,59 \pm 0,15$  °C (S1),  $39,49 \pm 0,13$  °C (S2),  $39,49 \pm 0,14$  °C (S3) e  $39,53 \pm 0,17$  °C (S4). Roy et al. (2014) reportaram o som como um fator influente na vida embrionária das aves e no funcionamento biológico das mesmas. Entretanto, dos trabalhos citados que fazem menção à parâmetros fisiológicos nenhum utilizou a TClo como uma variável capaz de detectar o efeito do ambiente acústico na incubação artificial.

Segundo Tong et al. (2013), as glândulas supra-renais são funcionais ao final da primeira semana de incubação produzindo a corticosterona que, junto aos hormônios tireoidianos, atua como um estimulante para o desenvolvimento do embrião e que fatores externos podem influir na produção e níveis circulantes destes hormônios. Foram observados níveis médios de CORT de  $16,77 \pm 1,34$  em S1,  $16,24 \pm 2,36$  em S2,  $14,36 \pm 1,41$  ng/mL em S3 e  $20,02 \pm 2,79$  ng/mL em S4, mas com a inexistência de efeito dos fatores experimentais.

Tong et al. (2015a) relataram níveis médios de 12,7 ng/mL em pintos recém-eclodidos em um controle e de 10,3 ng/mL em pintos que foram expostos às vocalizações da espécie a 72 dB (A) na incubação. Essas médias também não foram estatisticamente diferentes. Em contrapartida, Kauser et al. (2011) observaram uma redução significativa em CORT nos tratamentos estimulados com vocalizações e música rítmica, quando comparados ao controle. Estes autores obtiveram 15 ng/ml no controle e de 9,0 ng/ml nos tratamentos estimulados.

Sanyal et al. (2013a) sugeriram que a exposição ao som, sobretudo, aos altos níveis de decibéis, pudesse produzir estresse em embriões de aves e alterar os níveis de CORT. Mas, Sanyal et al. (2013z) não observaram influência de seus tratamentos: música rítmica e ruído, ambos a 110 dB (A) e um controle a 65 dB (A). Para os mesmos, o efeito significativo de várias respostas em decorrência da estimulação sonora na incubação, paralelo à não alteração nos níveis hormonais suporta a adaptação dos embriões ao som administrado desde o 10º dia de incubação. Os pintos desta pesquisa também foram expostos aos tratamentos sonoros deste o 12º dia de incubação. Acredita-se que isto poderia levar a não alteração dos níveis hormonais.

#### **iv. Qualidade física dos pintos de corte**

O sucesso da incubação depende da eclodibilidade e da qualidade dos pintos, o que será determinante na viabilidade futura dos mesmos (DECUYPERE;

BRUGGEMAN, 2007; ULMER-FRANCO et al., 2010). Nos incubatórios, a qualidade é avaliada na separação de pintos de primeira linha (vendáveis) e de segunda linha (descarte) (VAN de VEN et al., 2012). As anomalias associadas ao descarte (PD; %) nesta pesquisa foram pouco frequentes, por isso, são apresentadas em valores totais das oito repetições (Tabela 16).

**Tabela 16.** Total de anomalias (pintos de descarte) para as oito repetições realizadas

Anomalias específicas	Tratamentos				Total ***
	S1	S2	S3	S4	
Cérebro exposto	-	-	-	-	-
Vísceras expostas	4	5	3	5	17
Deformação olhos	-	-	-	-	-
Duplicação de membros	-	-	-	-	-
Membros comprometidos	4	2	1	3	10
Duplicação de face	-	-	-	-	-
Deformação bico	-	-	1	-	-
Débeis	1	2	-	1	4
Total*	9	9	5	9	-
Porcentagem**	1,32	1,34	0,68	1,20	-

\* Total de anomalias em oito repetições/tratamento;

\*\* Porcentagem de anomalias obtida para o total de pintos eclodidos nas oito repetições/tratamento

\*\*\* Total de anomalias por categorias

Segundo Plano e Di Matte (2013), o percentual de más-formações que levam ao descarte deve ser de 0,30%. Observou-se que tal proporção foi superior em todos os tratamentos. As vísceras expostas e os membros comprometidos foram mais frequentes, sendo que estes problemas são realmente os mais comuns (TONA et al., 2004; VAN de VEN et al., 2012). Não há relatos diretos sobre os efeitos da estimulação sonora na incidência das anomalias apresentadas. De acordo com Wilson (2004), essas ocorrências são originárias do estágio inicial de desenvolvimento embrionário (problemas genéticos).

Nas avaliações de umbigo (QU) e jarretes (QJ), verificou-se que as médias dos escores foram semelhantes entre S2, S3 e S4. Por exemplo, o escore “1”, que remete a melhor qualidade dos pintos, ficou entre 84 e 90% nestas duas respostas. Enquanto que o tratamento S1 aparentou uma menor porcentagem deste escore, tanto em QU (64,11%) como em QJ (74,85%). Os fatores experimentais relacionados à estimulação sonora foram avaliados pelos escores médios destas respostas, via ANOVA com  $\alpha = 0,05$  (Tabela 17).

**Tabela 17.** Resumo da análise de variância (teste F e valores p) para os escores médios de qualidade de umbigo (QU) e qualidade dos jarretes (QJ)

Efeitos	Variáveis			
	Qualidade do umbigo (QU)		Qualidade dos jarretes (QJ)	
	F	p	F	p
B	1,9165	0,1481	9,5455*	<0,001
I	0,3935	0,7596	0,6914	0,572
V	81,5738*	<0,001	13,0108*	0,003
R	38,4949*	<0,001	8,2626*	0,012
V X R	52,6034*	<0,001	28,9962*	<0,001
R <sup>2</sup> (%)	93%	-	88,7%	-
CV (%)	3,75%	-	3,58%	-

\*Efeito significativa ao nível de 5%. Grau de liberdade residual = 14

B: blocos; I: incubadora; V: vocalizações (com adição ou sem); R: ruído (70 ou 90); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação do modelo ajustado; CV: coeficiente de variação

O NPS do ruído e as vocalizações da espécie apresentaram efeitos significativos em QU e QJ, com interações significativas entre eles ( $p < 0,001$ ). O desdobramento das interações nestas respostas é apresentado na Tabela 18.

**Tabela 18.** Médias obtidas para os escores de qualidade do umbigo e jarretes, erros-padrão e comparações realizadas pelo teste de Tukey

Vocalizações da espécie	Nível de pressão sonora do ruído	
	70 dB (A)	90 dB (A)
Qualidade de umbigo (QU)		
Sem adição	1,45 ± 0,03 Aa	1,18 ± 0,01 Ab
Com adição	1,17 ± 0,01 Ba	1,18 ± 0,01 Aa
Qualidade de jarretes (QJ)		
Sem adição	1,28 ± 0,03 Aa	1,13 ± 0,03 Ab
Com adição	1,13 ± 0,03 Ba	1,17 ± 0,03 Aa

Letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Em QU a exposição a 90 dB (A), sem as vocalizações, levou à redução da média do escore, o que condiz com pintos de melhor qualidade. Enquanto o efeito das vocalizações só foi significativo se associado a 70 dB (A), também resultando em um menor escore. Verificou-se que o tratamento S1 foi o que apresentou a maior média de escore em QU. Vale mencionar que os pintos classificados nos escores “2” ou “3” não foram descartados, pois, se as vísceras não estão expostas os umbigos fecham-se em poucas horas e os resíduos da incubação se desprendem sozinhos (PLANO; Di MATTE, 2013). Todavia, segundo Meijerhof (2003), a mortalidade destas aves é maior. Fassenko; O’Dea (2008) observaram que

pintos com problemas nos umbigos (abertos ou com resíduos da incubação) apresentaram um menor peso aos 41 dias de idade e uma maior mortalidade.

Da mesma forma, em QJ o NPS de 90 dB (A) resultou em uma melhor qualidade dos jarretes (menor escore) na ausência das vocalizações da espécie. Enquanto que o estímulo natural só apresentou efeitos significativos nesta resposta, quando este foi associado à 70 dB (A), com a redução no escore. Os jarretes avermelhados estão relacionados ao atraso para a eclosão, pois é um indicativo de que houve uma maior pressão das pernas contra a casca, como uma tentativa de sair do ovo (WILSON, 2004; VAN de VEN et al., 2012). Na prática, isto pode prover dificuldade de sustentação e movimentação, atrasando a ingestão de alimentos dos pintos em seus primeiros dias de vida (TERČIČ et al., 2015).

Diante da última discussão, supõem-se que a estimulação sonora não seja passível de alterar diretamente as características físicas das aves. Todavia, provou-se que o ambiente acústico, sobretudo o NPS, está relacionado com o tempo de início das eclosões e este sim é descrito como um fator determinante da qualidade do umbigo e dos jarretes de pintos recém-eclodidos (PLANO; Di MATTE, 2013; LØTVEDT; JENSEN, 2014). Disto afirma-se que o tratamento S1 resultou em uma pior qualidade física dos pintos, como uma consequência das eclosões mais tardias. No mais, os pintos cujos ovos foram expostos ao NPS de 90 dB (A) apresentaram melhores parâmetros de qualidade. Já o efeito das vocalizações só foi verificado com o NPS de 70 dB (A).

#### **4.3.3. Discussão geral**

Esta pesquisa avaliou os efeitos da estimulação sonora na incubação artificial, considerando níveis de pressão sonora (NPS) do ruído associados a vocalizações da espécie, como uma forma de prover um estímulo natural ao processo industrial de produção de pintos de corte.

Em seu levantamento, Brouček (2014) enfatizou que o ruído e os intensos níveis de pressão sonora compreendem um problema da produção animal. Isto motivou o estudo do ruído em um incubatório comercial, caracterizado com um NPS médio de 90 dB (A). Os resultados obtidos foram diferentes do esperado, visto que, neste NPS houve um adiantamento das eclosões, uma maior chance de eclosão e melhor qualidade física dos pintos. Isto poderia ser justificado pela



estimulação promovida pelo ruído, assim como o ocorrido com outros sons (música ou vocalizações da espécie), que independente do NPS modulam positivamente os sistemas fisiológicos dos embriões (ROY et al., 2014).

As vocalizações da espécie, postas como uma forma de sincronizar as eclosões e melhorar as habilidades cognitivas das aves, influenciaram positivamente algumas respostas, porém, somente quando foram adicionadas ao NPS de 70 dB (A). Disto, concluiu-se que o ruído mais elevado encobriu o efeito deste estímulo. Portanto, a adição das vocalizações como uma forma de enriquecimento ambiental só seria efetiva se o ruído das incubadoras fosse reduzido ou se as vocalizações fossem aplicadas a um NPS superior a 90 dB (A).

O tratamento S1 (controle) resultou nos piores resultados. Sugere-se que no interior do ovo haja uma redução no nível de pressão sonora que chega ao embrião, como o evidenciado no Capítulo anterior. Acredita-se que a menor exposição ao NPS externo tenha comprometido o desencadeamento da eclosão, o que também levou à alteração das outras respostas. Tong et al. (2015a) desenvolveram um dos poucos trabalhos que avaliaram os efeitos da estimulação sonora com um interesse direto na avicultura, porém, os resultados em sua maioria não foram significativos, o que poderia ser atribuído ao NPS baixo de 72 dB(A).

O tempo para o início das eclosões foi um dos resultados mais relevantes. Verificou-se um atraso médio de mais de seis horas para que as eclosões começassem nos embriões expostos ao NPS de 70 dB (A), sem as vocalizações. No geral, a variação deste tempo é um fator que contribui para a redução na qualidade das aves (DECUYPERE et al., 2001; CAREGHI et al., 2005). Portanto, defende-se que a menor qualidade do umbigo e jarretes seja uma consequência deste atraso ao início das eclosões.

Para Tzschentke; Plagemann (2006) e Tong et al. (2013) os fatores do ambiente de um embrião em desenvolvimento podem mudar suas trajetórias, padrões fisiológicos e vida pós-eclosão. De fato, existem muitos mecanismos envolvidos na incubação artificial com efeitos que já foram amplamente reportados. Com os dados desta pesquisa coloca-se o ambiente acústico como mais um fator inerente à incubação artificial capaz de afetar, por exemplo, o tempo de incubação.

#### 4.4. Conclusões

1. A exposição ao nível de pressão sonora das incubadoras comerciais - 90 dB (A) – proveu melhores resultados na eclosão. Acelerou o tempo de nascimento, proporcionou uma maior chance de eclosão dos ovos e uma melhor qualidade física dos pintos de corte;
2. Os efeitos das vocalizações da espécie só foram evidenciados junto ao nível de pressão sonora inferior, concluindo-se que o ruído de 90 dB (A) encobriu o estímulo natural. A adição das vocalizações a 70 dB (A) resultou em eclosões mais precoces e em pintos com uma melhor qualidade;
3. As respostas relacionadas ao crescimento embrionário e as variáveis fisiológicas no pós-eclosão não foram influenciadas pela estimulação sonora na incubação artificial.

#### Referências

ALLADI, P. A.; ROY, T.; SINGH, N.; WADHWA, S. Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and a Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 363 - 373, 2005.

ARCHER, G. S.; MENCH, J. A. The effects of light stimulation during incubation on indicators of stress susceptibility in broilers. **Poultry Science**, v. 92, p. 3103 - 3108, 2013.

BERGOUG, H.; BUREL, C.; GUINEBRETIEREG, M.; TONG, Q. et al. Effect of pre-incubation and incubation conditions on hatchability, hatch time and hatch window, and effect of post-hatch handling on chick quality at placement. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 312 - 334, 2013.

BROUČEK, J. Effect of noise on performance, stress, and behaviour of animals. **Slovak Journal Animal Science**, v. 47, p. 111 - 123, 2014.

CAREGHI, C.; TONA, K.; ONAGBESAN, O.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. The effects of the spread of hatch and interaction with delayed feed access after hatch on broiler performance until seven days of age. **Poultry Science**, v. 84, n. 8, 2005.

CARVALHO, C.C.S. Avaliação ergonômica em operações do sistema produtivo de carnes de frango. 2009. **Tese de doutorado** apresentada a Universidade Federal de Viçosa para obtenção do título em Doutor em Ciências, Viçosa - MG, p. 163, 2009.

CHAUDHURY, S.; NAG, T. C.; WADHWA, S. Effect of prenatal auditory stimulation on numerical synaptic density and mean synaptic height in the post hatch day 1 chick hippocampus. **Synapse**, v. 63, p.152 - 159, 2009.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação, p. 54, 2013.

DECUYPERE, E.; TONA, K.; BRUGGEMAN, F. The day-old chick: a crucial hinge between breeders and broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p. 127 - 138, 2001.

DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. **Poultry Science**, v. 86, p. 1037 - 1042, 2007.

DIXON, L. M.; SPARKS, N. H. C.; RUTHERFORD, K. M. D. Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. **Poultry Science**, v. 00, p. 1 - 11, 2015.

EDGAR, J.; HELD, S.; JONES, C.; TROISI, C. Influences of maternal care on chicken welfare. **Animals**, v. 6, p.12, 2016.

FARAWAY, J.J. Extending the Linear Model with R: Generalized Linear, Mixed Effects and Nonparametric Regression Models. ed. 1, Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC, p. 413, 2006.

FASENKO, G.M.; O'DEA, E.E. Evaluating broiler growth and mortality in chicks with minor navel conditions at hatching. **Poultry Science**, v. 87, n. 3, p. 594 - 597, 2008.

FOSTER, M. R.; GREENLEES, B., DUNCAN, I.J.H. **United States Patent**: Method and apparatus for increasing the quantity and improving the quality of hatchlings incubated and hatched under artificial conditions by exposing the eggs to natural sounds. Patent Number: 5.383.424, 1995.

HUTH, J.C.; ARCHER, G.S.; Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. **Poultry Science**, v.94, p. 3052 - 3058, 2015.

IPEK, A.; SAHAN, U.; BAYCAN, S.C.; SOZCU, A. The effects of different eggshell temperatures on embryonic development, hatchability, chick quality, and first-week broiler performance. **Poultry Science**, v. 93, p. 464 - 472, 2014.

JAIN, S.; SHARMA, R.; WADHWA, S. Effect of prenatal species-specific and music stimulation on the postnatal auditory preference of domestic chick. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 48, p. 174 - 183, 2004.

JONES, T. A.; JONES, S. M. PAGGETT, K. C. Emergence of Hearing in the Chicken Embryo. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, p. 128 - 141, 2006.

KAUSER, H.; ROY, S.; PAL, A.; SREENIVAS, V.; MATHUR, R.; WADHWA, S.; JAIN, S. Prenatal complex rhythmic music sound stimulation facilitates postnatal spatial learning but transiently impairs memory in the domestic chick. **Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 48 - 56, 2011.

KESAR, A. G. Effect of prenatal chronic excessive sound exposure on auditory filial imprinting area of chick forebrain. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 62, p. 125 - 132, 2013.

LØTVEDT, P.; JENSEN, P. Effects of Hatching Time on Behavior and Weight Development of Chickens. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 10, 2014.

MARIETTE, M.M.; BUCHANAN, K.L. Prenatal acoustic communication programs offspring for high posthatching temperatures in a songbird. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 812 - 814, 2016.

MEIJERHOF, R. Problem solving in the commercial broiler sector. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 14, p. 212 - 224, 2003.

NANGSUAY, A.; RUANGPANIT, Y.; MEIJERHOF, R.; ATTAMANGKUNE, S. Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens. **Poultry Science**, v. 90, p. 2648 - 2655, 2011.

PLANO, C. M.; Di Matte, A. M. Embriodiagnóstico e patologia perinatal. In: MACARI, et al. **Manejo da incubação**. 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. p. 245-271.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em 2017.

ROCHA, J.S.R.; BAIÃO, N.C.; BARBOSA, V.M.; POMPEU, M.A.; FERNANDES, M.N.S.; LARA, L.J.C.; MATIAS, C.F.Q.; BATISTA, J.V.M.S.P. Negative effects of fertile egg storage on the egg and the embryo and suggested hatchery management to minimize such problems. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 79 - 89, 2013.

ROSA, P.S.; AVILA, V.S. Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte. Brasília: **EMBRAPA**, p.3 (Comunicado Técnico, 246), 2002.

ROY, S.; NAG, T. C.; UPADHYAY, A. D.; MATHUR, R.; JAIN, S. Prenatal music stimulation facilitates the postnatal functional development of the auditory as well as visual system in chicks (*Gallus domesticus*). **Journal of Biosciences**, v. 39, p. 107 - 117, 2014.

RUMPF, M; TZSCHENTKE, B. Perinatal Acoustic Communication in Birds: Why Do Birds Vocalize in the Egg? **The Open Ornithology Journal**, v. 3, p. 141 - 149, 2010.

SANYAL, T.; KUMAR, V.; NAG, T. C.; JAIN, S.; SREENIVAS, V. Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in one day-old chicks. **PLoS ONE**, v. 8, p. 16, 2013a.

SANYAL, T.; PALANISAMY, P.; NAG, T.C.; ROY, T.S.; WADHWA, S. Effect of prenatal loud music and noise on total number of neurons and glia, neuronal nuclear area and volume of chick brainstem auditory nuclei, field L and hippocampus: A stereological investigation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, p. 234 - 244, 2013b.

SCOTT, T.A.; SILVERSIDES, F.G. The effect of storage and strains of hen on egg quality. **Poultry Science**, v. 79, p. 1725 - 1729, 2000.

SGAVIOLI, S.; SANTOS, E.T.; DOMINGUES, C.H.F.; QUADROS, T.C.O.; CASTIBLANCO, D.M.C.; ANDRADE-GARCIA, G.M.; AMOROSO, L.; NÄÄS, I.A.; GARCIA, R.G.; BARALDI-ARTONI, S.M. Effect of high incubation temperature on the blood parameters of layer chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. spe., p. 41 - 47, 2016.

SOLDATOVA, I. B.; Development and metabolism of chicken embryos in the embryogenesis under acoustic stimulation. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 42, p. 261 - 266, 2011.

SOZCU, A.; IPEK, A. Acute and chronic eggshell temperature manipulations during hatching term influence hatchability, broiler performance, and ascites incidence. **Poultry Science**, v. 94, n. 2, 1, p. 319 - 327, 2015a.

SOZCU, A.; IPEK, A. Quality assessment chicks from different hatcher temperatures with different scoring methods and prediction of broiler growth performance. **Journal of Applied Animal Research**, v. 43, n. 4, p. 409 - 416, 2015b.

TEFERA, M. Acoustic signals in domestic chicken (*Gallus gallus*): a tool for teaching veterinary ethology and implication for language learning. **Ethiopian Veterinary Journal**, v.16, p. 77 - 84, 2012.

TERČIČ, D.; ŽOLGER, M.; PESTOTNIK, M. Effect of different litter materials on foot pad dermatitis, hock burn and feather coverage in broiler chickens. **Acta Agriculture Slovenica**, v. 106, n.2, p. 97 - 101, 2015.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.; KETELAERE, B.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight, and chick post-hatch growth to forty-two days. *Journal Applied Poultry Research*, London, v. 13, p. 10 - 18, 2004.

TONA, K.; BRUGGEMANA, V.; ONAGBESANA, O.; BAMELISA, F.; GBEASSORB, M.; MERTENS, A.K.; DECUYPERE, E. Day-old chick quality: relationship to hatching egg quality, adequate incubation practice and prediction of broiler performance. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v.16, n. 2, p. 109 - 119, 2005.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.M.; KAMERS, B.; EVERAERT, N.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E.; Comparison of Cobb and Ross strains in embryo physiology and chick juvenile growth. **Poultry Science**, v. 89, p. 1677 - 1683, 2010.

TONG, Q.; ROMANINI, C. E.; EXADAKTYLOS, V.; BAHR, C.; BERCKMANS, D.; BERGOUG, H.; ETERRADOSS, N.; ROULSTON, N.; VERHELST, R.; MCGONNELL, I. M.; DEMMERS, T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 620 - 628, 2013.

TONG, I. M.; MCGONNELL, C. E. B.; ROMANINI, H. BERGOUG, N.; ROULSTON, V.; EXADAKTYLOS, D.; BERCKMANS, C.; BAHRC, M.; GUINEBRETIÈRE, N.; ETERRADOSSID, P. Effect of species-specific sound stimulation on the development and hatching of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 56, p. 143 - 148, 2015a.

TONG, Q.; MCGONNELL, I.M.; ROMANINI, C.E.; BERGOUG, H.; ROULSTON, N.; BERCKMANS, D.; EXADAKTYLOS, V.; GUINEBRETIÈRE, M.; ETERRADOSSI, N.; GARAIN, P.; DEMMERS, T. Effect of a photoperiodic green light program during incubation on embryo development and hatch process. **Agricultural Engineering International IGR Journal** - Special issue: 18th World Congress of CIGR, p. 264 - 267, 2015b.

TZSCHENTKE, B., PLAGEMANN, A. Imprinting and critical periods in early development. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 626 - 637, 2006.

TZSCHENTKE, B. Effect of hatching time on poultry behaviour: the impact of incubation environment during the last days of embryonic development. **World's Poultry Congress**, 5 - 9 August – 2012, Salvador - Bahia – Brasil, p. 11, 2012.

ULMER-FRANCO, A.M.; FASENKO, G.M.; O'DEA CHRISTOPHER, E.E. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. **Poultry Science**, v. 89, p. 735 - 742, 2010.

VAN DE VEN, L. J. F.; VAN WAGENBERG, A. V.; UITDEHAAG, K. A.; GROOT KOERKAM, P. W. G.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Significance of chick quality score in broiler production. **Animal**, v. 6, n. 10, p. 1677 - 1683, 2012.

VETERÄNY, L.; HLUCHY, S.; WEIS, J. The influence of an artificial sound stimulation on chicken hatching. **Czech Journal Animal Science**, v. 43, p. 177 - 179, 1998.

VETERÄNY, S.; HLUCHÝ, J. ČERVEŇANOVÁ. Effect of the use of synthetic sound during incubation in chicken. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, p.131 - 138, 2005.

WADHWA, S.; PHALGUNI, A.; BHOWMICK, D. Quantitative study of plasticity in the auditory nuclei of chick under conditions of prenatal sound attenuation and overstimulation with species specific and music sound stimuli. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 239 - 253, 1999.

WARTON, D.I.; HUI, F.K.C. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. **Ecology**, v. 92, v. 1, p. 3 - 10, 2011.

WILSON, H. R. **Hatchability problem analysis 1**. University of Florida IFAS Extension CIR1112. University of Florida, Gainesville, 2004.

## 5. ESTÍMULOS SONOROS NA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL E OS EFEITOS NO DESEMPENHO DE PINTOS DE CORTE

### RESUMO

Vários fatores inerentes à incubação artificial podem influenciar o futuro da produção avícola. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar se a estimulação sonora promovida durante o desenvolvimento embrionário poderia alterar o desempenho de pintos de corte. Os tratamentos avaliados foram determinados por dois níveis de pressão sonora (NPS), um controle a 70 dB (A) e o outro representando incubadoras comerciais a 90 dB (A), acrescidos ou não de vocalizações da espécie. Essas combinações determinaram os tratamentos: S1 [70 dB (A) sem vocalizações], S2 [90 dB (A) sem vocalizações], S3 [70 dB (A) com vocalizações] e S4 [90 dB (A) com vocalizações]. Foram realizados oito ciclos de incubações (repetições), em um delineamento aleatorizado em blocos. Os pintos foram alojados por uma semana e como respostas mensurou-se os pesos na eclosão e no final do alojamento, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade. O peso na eclosão foi influenciado pelo NPS do ruído, com a exposição a 90 dB (A) resultando em pintos mais leves. Todavia, o peso final e o ganho de peso não diferiram, sugerindo-se a compensação dos pintos que eclodiram com um menor peso. O consumo de ração foi maior nos animais cuja exposição embrionária ocorreu ao NPS de 70 dB (A) sem as vocalizações (controle), o que conseqüentemente piorou a conversão alimentar. Com estes resultados conclui-se que o ruído das incubadoras comerciais e/ou a adição das vocalizações da espécie promoveram melhores resultados produtivos.

Palavras-chave: Bioacústica; Conversão alimentar; Estresse; Ganho de peso; Ruído

### ABSTRACT

Several factors to artificial incubation can influence the future of poultry production. The objective of this research was to evaluate if the sound stimulation in the embryonic development can alter the performance of chicks. The treatments were determined by two sound pressure levels (SPL), the control with 70 dB (A) and the SPL representing commercial hatcheries with 90 dB (A), added (or not) with vocalizations of the species. The following combinations determined the treatments: S1 [70 dB (A) without vocalizations], S2 [90 dB (A) without vocalizations], S3 [70 dB (A) with vocalizations], and S4 [90 dB (A) with vocalizations]. Eight repetitions (hatching cycles) were performed in a randomized block design. The chicks were housed for a week and the evaluated responses were the weights in hatching and at the end of the housing, weight gain, feed intake, feed conversion and mortality. Hatching weight was influenced by the NPS, with exposure to 90 dB (A) resulting in lighter chicks. However, the final weight and weight gain did not differ. Feed intake was higher in animals whose embryo exposure was at 70 dB (A) (control), which consequently worsened feed conversion. With these results we conclude that the noise of the commercial hatcheries and/or the addition of the vocalizations of the species promoted better productive results.

Keywords: Bioacoustics; Feed conversion; Weight gain; Stress; Noise



## 5.1. Introdução

Os pintos de corte destinados às granjas devem apresentar uma boa viabilidade e potencial de crescimento, para que no final da criação bons resultados sejam alcançados. Assim, os fatores que influenciam na produção de pintos nos incubatórios são relevantes em todo o ciclo da avicultura (WILLEMSEN et al., 2008; ULMER-FRANCO et al., 2010; NAZARENO et al., 2014; CAMARGO et al., 2015).

O tempo de incubação representa entre 30% e 40% da vida de um frango e os efeitos deste período nos embriões será extremamente crítico para a vida subsequente das aves (MAIORKA et al., 2006; VILLANUEVA et al., 2016). Especificamente no caso da incubação, diferentes condições de temperatura, umidade, viragem dos ovos e ventilação impõem às aves jovens uma bagagem de condições, cujas consequências vão além até de seu potencial genético (TONA et al., 2005; DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2007; DUMAN; ŞEKEROĞLU, 2017).

De acordo com Løtvedt; Jensen (2014), o ambiente pré-eclosão é passível de afetar o fenótipo e a fisiologia dos pintos de corte de várias maneiras. Neste sentido, outros fatores além daqueles que já são bem conhecidos estão sendo estudados. As pesquisas de Archer et al. (2009), Özkan et al. (2012), Archer; Mench (2013) e Tong et al., (2015b), por exemplo, abordaram a questão da luminosidade na incubação artificial. Segundo estes, os embriões responderam à estimulação luminosa por causa da atividade precoce da glândula pineal, de modo que, as mudanças nos ciclos de claro e escuro, diferentes intensidade e espectros de cores durante a incubação modificaram o crescimento e o bem-estar dos pintos.

Nesta pesquisa, defende-se que a bioacústica (estimulação sonora) na incubação artificial possa influir no desenvolvimento embrionário e no desempenho dos pintos de corte. Sanyal et al. (2013) e Roy et al. (2014) explicam que o som age como um estímulo para muitos sistemas biológicos durante o seu desenvolvimento e apresenta uma profunda influência na fisiologia/comportamento destes organismos. Pesquisas anteriores provaram que os embriões de aves de linhagens comerciais possuem um sistema auditivo funcional e que a exposição pré-eclosão aos estímulos sonoros pode desempenhar um papel importante no pós-eclosão (JONES et al., 2006; ALLADI et al., 2002; ALLADI et al., 2005).

Apesar dos levantamentos citados, são poucas as informações sobre a estimulação sonora no desenvolvimento embrionário de aves comerciais focadas

em respostas produtivas, visto que, as pesquisas citadas são direcionadas principalmente ao campo da neurofisiologia. O trabalho mais próximo da produção avícola foi desenvolvido por Tong et al. (2015a), os quais avaliaram a adição de vocalizações da espécie durante a incubação, mas com avaliações realizadas somente até a eclosão. Com isto, objetivou-se avaliar os efeitos da estimulação sonora provida na incubação artificial no desempenho de pintos de corte.

## **5.2. Material e Métodos**

Este experimento foi realizado no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ambiência (NUPEA) e no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba – São Paulo (Latitude: 22° 42’ 41.4” Sul; Longitude 47° 37’ 47.2” Oeste; Altitude: 546 metros). Os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo protocolo 2015 – 21, proferido pela Comissão de Ética do Uso de Animais da ESALQ/USP.

### **5.2.1. Tratamentos, incubações e alojamento dos pintos**

Os tratamentos aplicados na incubação artificial foram determinados pela associação de dois níveis de pressão sonora (NPS), um de 70 dB (A) (controle) e o outro de 90 dB (A) simulando o ruído de incubadoras comerciais. A estes dois NPS foram acrescentadas ou não vocalizações da espécie, como um estímulo natural, a partir do 12º dia do desenvolvimento embrionário (ALLADI et al., 2005; JAIN et al., 2004). A associação dos NPS com a presença/ausência das vocalizações originou um esquema fatorial 2 x 2, com os tratamentos denominados em:

- S1 - ruído de 70 dB (A), sem vocalizações (controle);
- S2 - ruído de 90 dB (A), sem vocalizações;
- S3 - ruído de 70 dB (A) com vocalizações da espécie;
- S4 - ruído de 90 dB (A) com as vocalizações.

Foram realizadas oito repetições condizentes com oitos ciclos de incubação. Para tanto, adotou-se um delineamento experimental em blocos, de modo que, em cada repetição, os tratamentos descritos foram aleatorizados e

igualmente repetidos (duas vezes) em quatro incubadoras isoladas acusticamente. Para isso, considerou-se um controle local duplo de linhas (blocos – tempo) e colunas (incubadoras), totalizando-se 32 unidades experimentais. Algumas informações sobre as incubações e eclosão dos pintos encontram-se na Tabela 19.

**Tabela 19.** Informações referentes às repetições experimentais

Incubações	Ovos	Idade		Incubação	Eclosão (início)	Final do alojamento
		matrizes	Postura			
		(semanas)				
1	360	45	02/09/16	07/09/16	28/09/16	06/10/16
2	360	53	02/11/16	07/11/16	28/11/16	06/12/16
3	360	59 <sup>1</sup>	23/12/16	26/12/16	17/01/17	26/01/17
4	360	46	23/02/17	28/02/17	20/03/17	27/03/17
5	360	52	07/04/17	11/04/17	01/05/17	08/05/17
6	360	57	10/05/17	15/05/17	05/06/17	12/06/17
7	360	63 <sup>2</sup>	16/06/17	26/06/17	16/07/17	24/07/17
8	360	59 <sup>3</sup>	06/09/17	12/09/17	03/10/17	10/10/17

<sup>1</sup>Primeira troca de lote; <sup>2</sup>Segunda troca de lote; <sup>3</sup>Terceira troca de lote

Os ovos foram provenientes de um único matrizeiro e a linhagem utilizada foi a COBB – 500<sup>®</sup>, com a troca de lotes em função do tempo de experimentação. Ao todo 2880 ovos foram incubados, distribuídos igualmente entre repetições e tratamentos. Em cada ciclo de incubação trabalhou-se com um montante de 360 ovos. As incubadoras experimentais foram ajustadas em 37,5 °C e a umidade relativa em 55%, com a viragem das bandejas a cada duas horas. No interior delas havia caixas amplificadoras (Mini Speaker<sup>®</sup> - BT51) que reproduziam o NPS de 90 dB (A) e/ou as vocalizações da espécie, visto que o NPS de 70 dB (A) era inerente ao funcionamento das mesmas. Calibrações foram realizadas previamente com um decibelímetro comercial (DEC – 490 da Instrutherm<sup>®</sup>).

As incubadoras foram isoladas acusticamente para evitar a interferência dos tratamentos. O ruído esteve presente 24 horas/dia a partir do 1º dia de incubação. Enquanto que as vocalizações da espécie foram adicionadas a partir do 12º dia, em decorrência do desenvolvimento do sistema auditivo dos embriões (ALLADI et al., 2005; JAIN et al., 2004). As vocalizações foram contínuas, com picos de maior atividade em intervalos de 20 minutos, como o sugerido por Foster et al. (1995). Os tratamentos sonoros foram mantidos até a retirada dos pintos,

compreendendo obrigatoriamente o período de 24 horas pós-eclosão. Outras informações e as ilustrações podem ser acompanhadas no Capítulo anterior.

Após o início das eclosões, os pintos foram retirados das incubadoras em dois momentos diferentes: entre o 21º e 22º dia de incubação e após o 22º dia, destinando-se somente as aves viáveis para o alojamento por uma semana, contada a partir da primeira expedição.

Os tratamentos foram aleatorizados (por bloco) entre quatro boxes de 8,36 m<sup>2</sup> (2,2 metros de largura e 3,8 metros de comprimento). O espaço dos boxes foi reduzido com placas de Eucatex® formando um círculo de proteção de 130 cm de diâmetro, para manter as aves mais próximas da fonte de calor, no caso, lâmpadas infravermelhas (OSRAM®, 250 W) (Figura 20A/B/C).



**Figura 20.** Conjunto de boxes de alojamento (A); detalhes para o círculo de proteção (B); separação pintos para o alojamento e pesagem na eclosão (C)

Os pintos foram manejados conforme recomendações da linhagem (COBB, 2009). A densidade de alojamento variou em função da quantidade de eclodidos por tratamento, ficando em torno de 15 pintos/m<sup>2</sup>. O controle da temperatura foi realizado na faixa de 30 e 32 °C nos primeiros quatro dias e 28 e 30 °C nos dias

seguintes. Como cama utilizou-se palha de arroz a 5 cm de profundidade. O programa de luz foi de 24 horas, em função do uso de lâmpadas como fonte de calor. A água e a ração inicial foram fornecidas *ad libitum*.

### **5.2.2. Variáveis resposta**

Os pintos foram pesados individualmente assim que retirados das incubadoras para obtenção do peso médio na eclosão (PE; g). Posteriormente, eles foram pesados no último dia de alojamento, obtendo-se o peso médio final (PF; g). Com isso se calculou o ganho de peso médio dos pintos (GPM; g), dividindo-se o ganho de peso dos tratamentos pela quantidade de pintos alojados na repetição.

A ração fornecida foi quantificada em sua totalidade por tratamento de incubação, visando aferir o consumo médio de ração/pinto nos sete dias de alojamento (CMR; g). Para a obtenção da conversão alimentar (CA), dividiu-se o (CMR; g) pelo ganho de peso médio dos pintos de cada tratamento (GPM; g). As pesagens (aves e ração) foram realizadas em uma balança digital BAT1 (Veit Electronics®). As mortalidades ao longo da primeira semana foram registradas e correções aplicadas para os cálculos de consumo de ração.

### **5.2.3. Análise estatística**

As análises foram executadas no software estatístico R (R CORE TEAM, 2017). As relações causais entre os fatores experimentais e possíveis alterações nas respostas foram investigadas por meio da ANOVA (respostas normais). As ANOVAs foram conduzidas considerando-se o modelo linear clássico de efeitos fixos e suas pressuposições foram validadas a partir de gráficos dos resíduos e os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias de Bartlett. Posteriormente às ANOVAs, os tratamentos foram comparados pelos testes t e de Tukey. Os testes de hipóteses foram feitos com  $\alpha = 0,05$ .

## **5.3. Resultados e Discussão**

O peso na eclosão de pintos de corte depende de vários fatores, incluindo aqueles relacionados às matrizes, condições de armazenamento dos ovos e as

próprias condições de incubação (TONA et al., 2005; MAIORKA et al., 2006). Paralelamente, estímulos ambientais providos durante o desenvolvimento embrionário podem afetar o futuro desempenho destes animais (ARCHER et al., 2009; TONG et al., 2013; ARCHER; MENCH, 2013). O resumo da análise de variância do peso dos pintos na eclosão (PE; g) e das demais respostas relacionadas ao desempenho na primeira semana é apresentado na Tabela 20.

**Tabela 20.** Resumo da análise de variância (teste F e valores p) das respostas de desempenho peso na eclosão (PE; g), peso final (PF; g), ganho de peso (GP; g), consumo de ração (CR; g) e conversão alimentar (CA)

Efeitos	Variáveis									
	PE		PF		CR		GP		CA	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
B	11,04*	<0,001	83,35*	<0,001	19,55*	<0,001	75,33*	<0,001	3,33*	0,019
I	1,16	0,350	0,64	0,601	1,08	0,382	0,33	0,803	0,41	0,748
V	2,67	0,119	1,04	0,321	9,54*	0,006	0,44	0,513	12,06*	0,002
R	4,72*	0,043	0,06	0,805	3,38	0,08	0,41	0,528	2,44	0,136
V X R	1,30	0,269	0,05	0,826	9,40*	0,007	0,18	0,676	8,71*	0,009
R <sup>2</sup> (%)	83,25%		97,02%		90,02%		96,71%		73,17%	
CV (%)	2,12%		3,84%		9,92%		6,25%		10,20%	

\* Efeito significativa ao nível de 5%. GL residual igual a 18

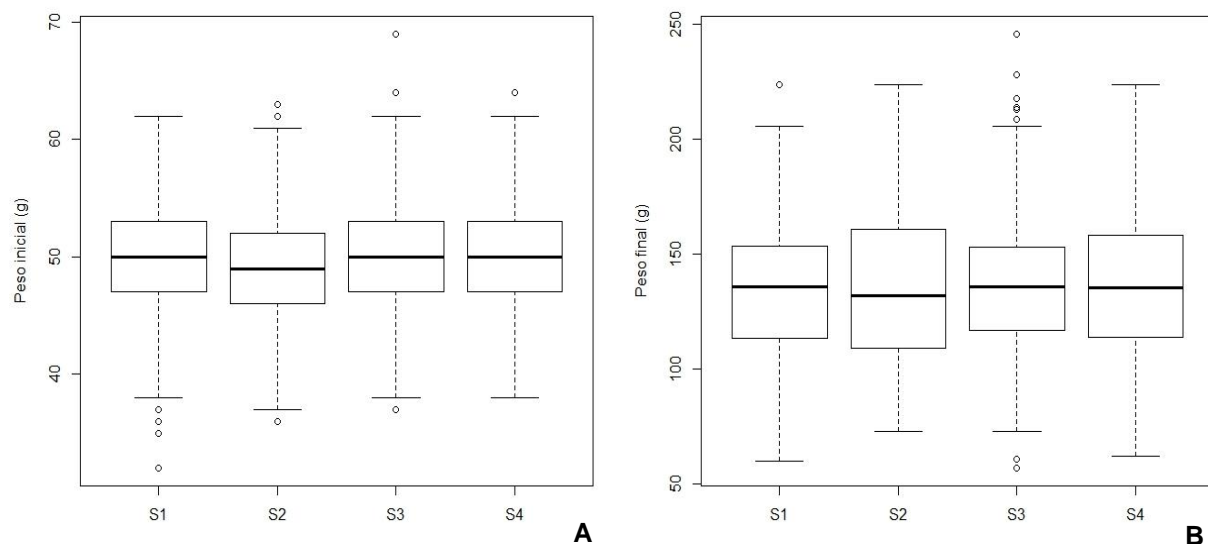
B: blocos; I: incubadora; V: vocalizações (com adição ou sem); R: ruído (70 ou 90); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação do modelo ajustado; CV: coeficiente de variação

As médias e os erros-padrão referentes ao PE foram de  $50,06 \pm 0,59$  g em S1,  $48,82 \pm 0,74$  g em S2,  $50,24 \pm 0,78$  g em S3 e  $49,85 \pm 0,65$  g em S4. Verificou-se que o nível de pressão sonora apresentou efeito significativo ( $p = 0,043$ ) para esta resposta. A exposição a 70 dB (A) resultou em uma média de PE de  $50,15 \pm 0,48$  g, enquanto que a de 90 dB (A) de  $49,34 \pm 0,50$  g, diferindo pelo teste t de Student, com  $\alpha = 0,05$ . Não houve interação significativa entre os fatores experimentais avaliados e nenhum efeito para a adição das vocalizações da espécie foi observado ( $p > 0,05$ ).

Segundo Brake et al. (1997) e Tona et al. (2005), o peso dos pintos na eclosão está diretamente relacionado a perda de peso dos ovos durante a incubação, dependente da evaporação de água pelos poros da casca, dentre outros fatores. No Capítulo anterior demonstrou-se o efeito da exposição ao NPS de 90 dB (A) na perda de peso dos ovos que foi maior sobre a ação deste nível de pressão sonora. Assim, sugere-se que a sutil redução observada no PE possa ser explicada pela maior perda de peso dos ovos que ocorreu sobre o efeito da exposição ao NPS de 90 dB (A).

Outras pesquisas com estimulação sonora na incubação artificial não identificaram diferenças significativas no peso na eclosão de seus tratamentos. Kesar (2013) obteve 38,76 g em pintos do controle e 34,43 g no grupo experimental (ruído crônico a 110 dB). Do mesmo modo, Tong et al. (2015a) obtiveram os mesmos pesos no grupo controle e no grupo exposto às vocalizações da espécie a 72 dB (A), não elucidando os seus resultados. Esses autores relataram em somente o peso dos pintos na eclosão, sem avaliar outras respostas produtivas.

As médias do peso ao final da primeira semana (PF; g) foram de  $139,03 \pm 7,93$  g em S1,  $139,93 \pm 9,88$  g em S2,  $141,40 \pm 8,26$  g em S3 e  $141,46 \pm 9,20$  g em S4. Para esta resposta não foram encontrados efeitos dos fatores principais aplicados na incubação ( $p > 0,05$ ). Sugere-se que o menor PE dos tratamentos incubados a 90 dB (A) tenha sido compensado ao longo da primeira semana de crescimento. Nos diagramas da Figura 21, é possível acompanhar a uniformidade das respostas PE (g) e PF (g), considerando a totalidade de pintos eclodidos entre as oito repetições. Percebe-se uma distribuição semelhante nos pesos dos tratamentos de incubação, com medianas próximas a 50 g no PE e a 140 g no PF e poucos pontos discrepantes.

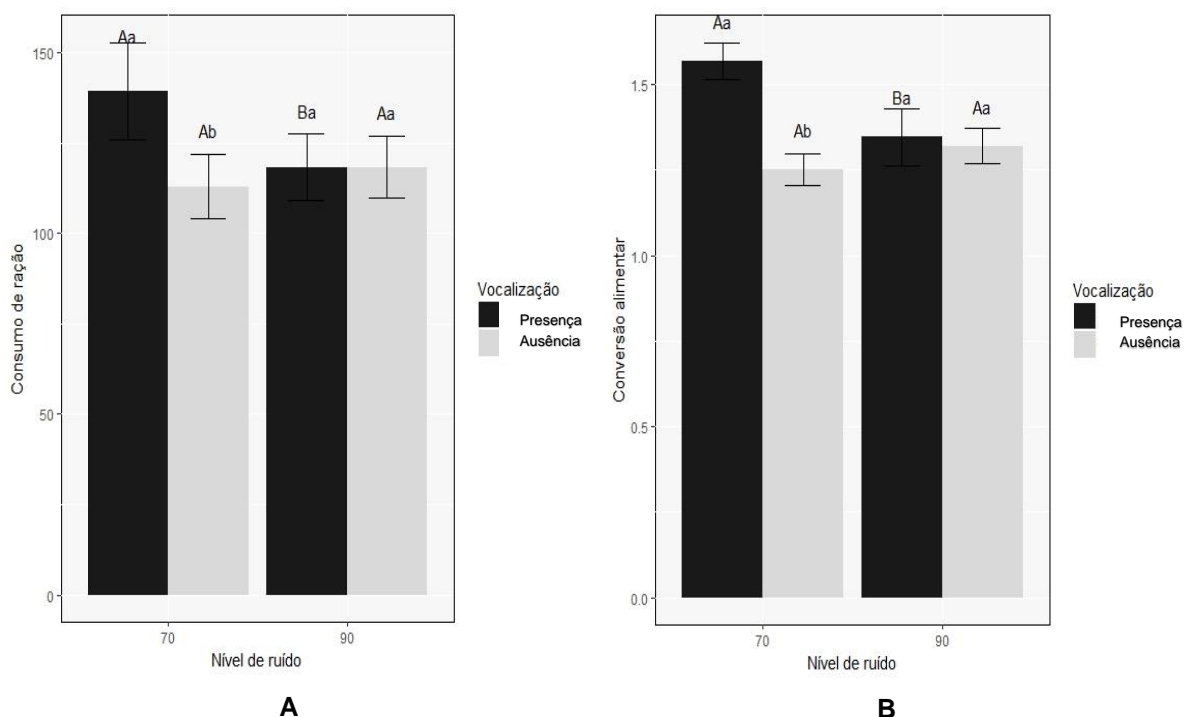


**Figura 21.** Boxplot das respostas peso na eclosão (PE; g) (A) e peso final (PF; g) (B) para avaliação da uniformidade dos pintos em função dos tratamentos de incubação

No ganho de peso médio dos pintos/tratamento (GPM; g), nenhum fator experimental apresentou influência significativa ( $p > 0,05$ ). Novamente, este resultado pode ser atribuído a uma compensação ao longo da primeira semana dos

fatores que apresentaram um menor PE na eclosão. A saber, as médias e erros-padrão desta resposta em S1, S2, S3 e S4 foram, respectivamente:  $86,65 \pm 23,26$  g,  $88,22 \pm 29,47$  g,  $88,11 \pm 24,93$  g e  $87,44 \pm 28,46$  g.

Para o consumo médio de ração (CMR; g), verificou-se o efeito significativo da adição das vocalizações da espécie ( $p = 0,006$ ) e da interação vocalização (V) x ruído (R) ( $p=0,007$ ). Com o desdobramento dos fatores experimentais, observou-se que a exposição ao NPS de 70 dB (A) na ausência das vocalizações resultou em um maior CMR dos pintos, enquanto que esta resposta foi igual nos dois níveis de pressão sonora na presença das vocalizações (Figura 22A).



**Figura 22.** Médias obtidas para o CMR (A) e para a CA (B), barras de erros-padrão e comparações realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os dois NPS e letras minúsculas entre a presença/ausência das vocalizações

Do mesmo modo, na conversão alimentar (CA), os efeitos da adição das vocalizações ( $p = 0,002$ ) e a interação entre as vocalizações e o NPS do ruído ( $p = 0,009$ ) foram significativos, com o mesmo padrão de resposta observado no CMR. Assim, verificou-se que o NPS de 70 dB (A) na ausência das vocalizações da espécie culminou com uma pior CA (Figura 22B). Vale mencionar que a conversão alimentar se trata da relação entre o consumo de ração e o ganho de peso, sendo o último não influenciado pelos fatores experimentais.



O desempenho esperado de pintos recém-eclodidos baseia-se na alta viabilidade, boa taxa de crescimento e baixa conversão alimentar (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2007). Na ausência de dados para comparar o desempenho em função da estimulação sonora provida na incubação, algumas hipóteses foram levantadas para explicar o maior CMR e o mesmo GPM, resultando em uma pior CA no tratamento exposto a 70 dB (A) sem as vocalizações, ou seja, no controle. Uma delas refere-se ao comportamento dos pintos após a eclosão. De acordo com Jain et al. (2004) e Sanyal et al. (2013), a estimulação sonora pode modelar o comportamento das aves e isso está diretamente relacionado com o maior ou menor nível de atividade e, conseqüentemente, com um maior ou menor consumo de ração para a obtenção de um mesmo ganho de peso.

Paralelamente, Woodcock et al. (2004) verificaram que a estimulação sonora pós-eclosão, com chamados da espécie, melhorou as respostas produtivas de pintos de corte (ganho de peso e conversão alimentar) nos primeiros nove dias de vida. Segundo estes autores, os ambientes de produção atuais falham em aspectos naturais das espécies, de modo que os resultados obtidos por eles são explicados pelo comportamento das aves que tenderam a se aproximar mais dos comedouros. Esse artifício poderia ser utilizado como enriquecimento ambiental, visando não só os resultados produtivos como melhores condições de bem-estar.

Outra hipótese associa-se ao tempo eclosão, cujas respostas foram verificadas no Capítulo anterior. Segundo Tamboli et al. (2018), apesar do ganho de peso não ser necessariamente afetado, os pintos que eclodem tardiamente podem apresentar uma redução na altura das vilosidades intestinais, o que afeta a absorção dos nutrientes e resulta em um CMR maior para obtenção de um mesmo GPM. Os pintos do tratamento S1 (controle) eclodiram cerca de seis horas mais tarde que os dos demais tratamentos (Capítulo 4), denotando-se o efeito negativo da exposição a 70 dB (A) na ausência das vocalizações. Para esta mesma condição, também foram encontrados pintos de pior qualidade (jarretes e umbigo), o que segundo Decuyper; Bruggeman (2007), Yassin et al. (2009) e Ulmer-Franco et al. (2010), é outro fator determinante no desempenho de pintos de corte.

Sobre a mortalidade observada nos sete dias, encontrou-se: 1,25% em S1, 0,50% em S2, 0,37% em S3 e 0,50% em S4. Para estes valores não foi utilizado nenhum método estatístico em função da pouca ocorrência dos eventos, mas atenta-se para que em S1 tenha sido observado um valor aparentemente maior.

Percentuais de até 1,50% são considerados aceitáveis (HEIER et al., 2002; COBB, 2008), mas cabe mencionar que as principais causas de mortalidade inicial estão associadas à menor qualidade dos pintos (FASENKO; O'DEA, 2008). Além disso, esses resultados de mortalidade quando consideradas as escalas de produção industrial, representam perdas financeiras significativas.

Maiorka et al. (2006) e Tona et al. (2010) explicam que o desempenho dos pintos está relacionado a vida embrionária, mas poucos efeitos e correlações entre esses momentos foram estabelecidos. Em complemento, Tzschentke (2012) menciona que o impacto das condições físicas do pré-eclosão na vida pós-eclosão, incluindo o desenvolvimento e o desempenho dos pintos, é cada vez mais aceito pela produção industrial. Todavia, como já mencionado, não foram encontrados relatos sobre os efeitos da estimulação sonora da incubação no ganho de peso, peso final, consumo de ração e conversão alimentar. Sugere-se que o presente trabalho seja pioneiro nestas informações, por mais que outras pesquisas sejam conduzidas para corroborar, complementar ou divergir destes resultados.

#### **5.4. Conclusões**

O consumo de ração foi maior nos pintos que durante o desenvolvimento embrionário foram expostos ao NPS de 70 dB (A), na ausência das vocalizações, o que conseqüentemente piorou a conversão alimentar. Com isto concluiu-se que o ruído das incubadoras comerciais e/ou a adição das vocalizações da espécie promoveram melhores resultados produtivos na primeira semana dos pintos.

#### **Referências**

ALLADI, P. A.; WADHWA, S.; SINGH, N. Effect of prenatal auditory enrichment on developmental expression of synaptophysin and syntaxin 1 in chick brainstem auditory nuclei. **Neuroscience**, v. 114, p. 577 - 590, 2002.

ALLADI, P. A.; ROY, T.; SINGH, N.; WADHWA, S. Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 363 - 373, 2005.

ARCHER, G. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MENCH, J. A. Effect of providing light during incubation on the health, productivity, and behavior of broiler chickens. **Poultry Science** v. 88, p. 29 - 37, 2009.

ARCHER, G. S.; MENCH, J. A. The effects of light stimulation during incubation on indicators of stress susceptibility in broilers. **Poultry Science**, v. 92, p. 3103 - 3108, 2013.

CAMARGO, J.R.; SILVA, I.J.O.; NAZARENO, A.C.; VIEIRA, F.M.C.; CASTRO, A.C.; DIAS, R.A.P. Qualidade de pintos em função do microclima, tempo de espera e idade de matrizes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.19, n.11, p.1079 - 1085, 2015.

COBB – VANTRESS. **Manual de Manejo de Frangos de Corte**. Arkansas: COBB-VANTRESS, p. 70, 2009.

\_\_\_\_\_. **Broiler Performance & Nutrition Supplement**. Arkansas: COBB-VANTRESS, p. 14, 2015.

BRAKE, J.; WALSH, T.J.; BENTON JUNIOR, C.E.; PETITTE, J.N.; MEIJERHOF, R.; PENALVA, G. Egg handling and storage. **Poultry Science**, v. 76, p. 144 - 151 p., 1997.

DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. **Poultry Science**, v. 86, p. 1037 - 1042, 2007.

DUMAN, M.I.; ŞEKEROĞLU, A. Effect of egg weights on hatching results, broiler performance and some stress parameters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.19, n.2, p. 255 - 262, 2017.

FASENKO, G.M.; O'DEA, E.E. Evaluating broiler growth and mortality in chicks with minor navel conditions at hatching. **Poultry Science**, v. 87, n. 3, p. 594 - 597, 2008.

HEIER, B. T., HOGASEN, H. R.; JARP, J. Factors associated with mortality in Norwegian broiler flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, p. 147 - 157. 2002.

JAIN, S.; SHARMA, R.; WADHWA, S. Effect of prenatal species-specific and music stimulation on the postnatal auditory preference of domestic chick. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 48, p. 174 - 183, 2004.

JONES, T. A.; JONES, S. M. PAGGETT, K. C. Emergence of Hearing in the Chicken Embryo. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, p. 128 - 141, 2006.

LØTVEDT, P.; JENSEN, P. Effects of Hatching Time on Behavior and Weight Development of Chickens. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 10, 2014.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M.S.F.A. Broiler adaptation to post-hatching period. **Ciência Rural**, v.36, n. 2, p. 701 - 708, 2006.

NAZARENO, A. C.; SILVA, I. J. O.; VIEIRA, A. M. C., VIEIRA, F. M. C.; MIRANDA, K. O. S. Transporte de ovos férteis: Influência das idades das matrizes, tempos de estocagem e das estradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n. 3, p. 338 - 343, 2014.

ÖZKAN, S.; YALÇIN, S.; BABACANOĞLU, B.; KOZANOĞLU, H.; KARADAŞ, F.; UYSAL, S. Photoperiodic lighting (16 hours of light:8 hours of dark) programs during incubation: 1. Effects on growth and circadian physiological traits of embryos and early stress response of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 2912 - 2921, 2012.

ROY, S.; NAG, T. C.; UPADHYAY, A. D.; MATHUR, R.; JAIN, S. Prenatal music stimulation facilitates the postnatal functional development of the auditory as well as visual system in chicks (*Gallus domesticus*). **Journal of Biosciences**, v. 39, p. 107 - 117, 2014.

SANYAL, T.; KUMAR, V.; NAG, T. C.; JAIN, S.; SREENIVAS, V. Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in one day-old chicks. **PLoS ONE**, v. 8, p. 16, 2013a.

TAMBOLI, A.S.S.; GOEL, A.; MEHRA, M.; ROKADE, J. J.; BHADAURIA, P.; YADAV, A. S.; MAJUMDAR, S.; BHANJA, S. K. Delayed post-hatch feeding affects the performance and immunocompetence differently in male and female broiler chickens. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 306 - 313, 2018.

TONA, K.; BRUGGEMANA, V.; ONAGBESANA, O.; BAMELISA, F.; GBEASSORB, M.; MERTENS, A.K.; DECUYPERE, E. Day-old chick quality: relationship to hatching egg quality, adequate incubation practice and prediction of broiler performance. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v.16, n. 2, p. 109 - 119, 2005.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.M.; KAMERS, B.; EVERAERT, N.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E.; Comparison of Cobb and Ross strains in embryo physiology and chick juvenile growth. **Poultry Science**, v. 89, p. 1677 - 1683, 2010.

TONG, Q.; ROMANINI, C. E.; EXADAKTYLOS, V.; BAHR, C.; BERCKMANS, D.; BERGOUG, H.; ETERRADOSS, N.; ROULSTON, N.; VERHELST, R.; MCGONNELL, I. M.; DEMMERS, T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 620 - 628, 2013.

TONG, I. M.; MCGONNELL, C. E. B.; ROMANINI, H. BERGOUG, N.; ROULSTON, V.; EXADAKTYLOS, D.; BERCKMANS, C.; BAHRC, M.; GUINEBRETIERED, N.; ETERRADOSSID, P. Effect of species-specific sound stimulation on the development and hatching of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 56, p. 143 - 148, 2015a.

TONG, Q.; MCGONNELL, I.M.; ROMANINI, C.E.; BERGOUG, H.; ROULSTON, N.; BERCKMANS, D.; EXADAKTYLOS, V.; GUINEBRETIERE, M.; ETERRADOSSI, N.; GARAIN, P.; DEMMERS, T. Effect of a photoperiodic green light program during incubation on embryo development and hatch process. **Agricultural Engineering International IGR Journal** - Special issue: 18th World Congress of CIGR, p. 264 - 267, 2015b.

TZSCHENTKE, B. Effect of hatching time on poultry behaviour: the impact of incubation environment during the last days of embryonic development. **World's Poultry Congress**, 5 - 9 August – 2012, Salvador - Bahia – Brasil, p. 11, 2012.

ULMER-FRANCO, A.M.; FASENKO, G.M.; O'DEA CHRISTOPHER, E.E. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. **Poultry Science**, v. 89, p. 735 - 742, 2010.

VILLANUEVA, A.P.; EBLING, P.D.; PONTALTI, G.C.; RIBEIRO, A.M.L. Effect of incubation system on the development of intestinal villi, metabolism, and performance of one- to forty-day-old broiler chickens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 9, p. 524 - 531, 2016.

WILLEMSEN, H.; EVERAERT, N.; WITTERS, A.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; VERSCHUERE, F.; GARAIN, P.; BERCKMANS, D.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Critical assessment of chick quality measurements as an indicator of posthatch performance. **Poultry Science**, v.87, n.11, p. 2358 - 2366, 2008.

WOODCOCK, M. B.; PAJOR, E. A.; LATOUR, M. A. The Effects of Hen Vocalizations on Chick Feeding Behavior. **Poultry Science**, v. 83, p. 1940 - 1943, 2004.

YASSIN, H.; VELTHUIS, A. G. J.; BOERJAN, M.; RIEL, J. VAN. Field study on broilers' first-week mortality. **Poultry Science**, v. 88, p. 798 - 804, 2009.

## 6. COMPORTAMENTO DE PINTOS DE CORTE: OS REFLEXOS DA ESTIMULAÇÃO SONORA DA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL

### RESUMO

Esta pesquisa avaliou os efeitos da estimulação sonora da incubação artificial em respostas comportamentais de pintos de corte. Para isso, os testes de imobilidade tônica, isolamento social e campo aberto foram realizados, considerando diferentes períodos e condições. Ovos férteis comerciais foram expostos aos tratamentos determinados por dois níveis de pressão sonora [70 e 90 dB (A)] acrescidos ou não com vocalizações da espécie. Após a eclosão as aves foram avaliadas sobre o efeito residual destes tratamentos, em três períodos (24, 72 e 144 h pós-eclosão) e em duas condições: em silêncio (S) ou expostas novamente as vocalizações (C). O NPS só apresentou efeitos no tempo de latência para o retorno a posição de pé, nas primeiras 24 horas pós-eclosão. No isolamento social, os níveis de vocalização e movimentação dos pintos, em 24 horas, foram menores nos tratamentos expostos às vocalizações na incubação, que também apresentaram uma menor distância percorrida no campo aberto em 24 horas pós-eclosão. Os efeitos da estimulação sonora da incubação foram notórios em algumas respostas comportamentais em até 24 horas pós-eclosão. Além disso, a realização dos testes com as vocalizações de fundo reduziu o medo/estresse, mas o avanço dos períodos (idade) tornou os pintos menos sensíveis a este estímulo.

Palavras-chave: Audição; Imobilidade tônica; Memória; Nível de atividade

### ABSTRACT

This research evaluated the effects of sound stimuli in artificial incubation on the behavioral responses of broiler chicks. To do so, tonic immobility, social isolation and open field tests were performed by taking into consideration different periods and conditions. Commercial fertile eggs were exposed to treatments based on two sound pressure levels [70 and 90 dB (A)] with, or without, species-specific vocalizations. After hatching, chicks were evaluated on the residual effect of the treatments, in three different periods (24, 72 and 144 h post-hatching) and under two conditions: silence (S) or exposed to species-specific vocalizations (C). The SPL only showed effect on the latency time to return to the standing position in 24 hours after hatching. With respect to the social isolation test, the vocalization and movement levels in the first period were lower in treatments exposed to vocalizations during incubation. These treatments also presented shorter covered distance in the open field (24 hours). Notorious effects of sound stimulation were recorded in some responses in 24 hours after hatching. Moreover, the rests comprising background vocalizations showed reduced fear/stress in chicks; however, the advancement of periods (age) made chicks less responsive to such stimulus.

Keywords: Hearing; Tonic immobility; Memory; Activity level

## 6.1. Introdução

O ambiente pré-natal pode modular/alterar as trajetórias etológicas dos animais, o que também é verídico para as aves cujo desenvolvimento embrionário ocorre “in ovo” (LØTVEDT, JENSEN, 2014; DIXON et al., 2015). As pesquisas de Wadhwa et al. (1999), Jain et al. (2004), Kauser et al. (2011) e Sanyal et al. (2013) inserem-se diretamente nesta discussão e são importantes referências de como a estimulação sonora embrionária é capaz de influir no comportamento, preferências perceptuais e memória de aves comerciais (*Gallus gallus domesticus*).

A incubação artificial não possui recursos visuais/auditivos suficientes para os embriões, o que pode, dentre outros fatores, comprometer sua capacidade de adaptação e percepção pós-eclosão (ARCHER et al.; 2009; TZSCHENTKE, 2012). Pelo contrário, nos incubatórios, o ambiente acústico é o resultado do barulho das incubadoras, o que é bem diferente das condições naturais (EDGAR et al., 2016).

Segundo Tzschentke (2012), no final dos 21 dias de incubação, a maioria dos mecanismos fisiológicos são bem formados e a maturação destes será melhorada pela estimulação ambiente, como a exposição à diferentes sons ou variações de claro e escuro. Kauser et al. (2011) e Sanyal et al. (2013) relataram alterações no comportamento de pintos que durante a vida embrionária receberam ruídos crônicos a 110 dB (A) ou estímulos positivos (música rítmica ou vocalizações da espécie). Segundo estes, a capacidade de orientação e a aprendizagem foram favorecidas nos grupos expostos aos sons positivos. Nesta mesma linha, Jain et al. (2004) e Roy et al. (2014) provaram que pintos eram predispostos aos sons recebidos na incubação, o que poderia ser atribuído à memória antes mesmo da eclosão.

A comunicação entre os pintos recém-eclodidos e os adultos ocorre principalmente por meio de sinais vocais e auditivos (PARK; BALABAN, 1991; TEFERA, 2012). Segundo Edgar et al. (2016), no ambiente natural, a galinha vocaliza para seus ovos durante o choco e os sons recebidos ainda na vida embrionária auxiliam no reconhecimento da mãe após a eclosão, tornando os filhotes aptos ao ambiente e menos temerosos. Mesmo com toda carga genética imposta às espécies comerciais, já foi provado que o contato com estímulos adultos influencia positivamente no comportamento, preferências alimentares e

adaptação ao ambiente destes animais (GVARYAHU et al., 1987; GVARYAHU et al., 1989; WAUTERS et al., 2002; WOODCOCK et al., 2004; EDGAR et al., 2015b).

De acordo com Forkman et al. (2007), quando se deseja avaliar questões como o medo, reconhecimento e a adaptação têm-se como ferramentas os testes comportamentais. Esses testes são baseados em respostas que, em conjunto, fornecem informações sobre como o organismo se expressa frente às imposições ambientais/sociais. Por exemplo, o teste de campo aberto envolve a exposição do animal a um ambiente novo, partindo-se do princípio que isso permeie por alterações comportamentais que vão do medo a exploração e marcação territorial (JONES; CARMICHAEL, 1997; HEIBLUM et al., 1998). Enquanto que o teste de imobilidade tônica é baseado em um reflexo natural de defesa, quando o animal se finge de morto se contido fisicamente, com o tempo de retorno ao estado normal como a principal resposta (THOMPSON; LIEBREICH, 1987; PITTET et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento pós-eclosão de pintos de corte, por meio de testes específicos (imobilidade tônica, isolamento social e campo aberto), considerando os efeitos residuais dos estímulos sonoros que estes receberam no desenvolvimento embrionário.

## **6.2. Material e Métodos**

Esta pesquisa foi conduzida no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ambiência (NUPEA) e no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba – São Paulo (Latitude: 22° 42' 41.4" Sul; Longitude 47° 37' 47.2" Oeste; Altitude: 546 metros). Os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo protocolo 2015 – 21, proferido pela Comissão de Ética do Uso de Animais da ESALQ/USP.

### **6.2.1. A estimulação sonora na incubação artificial**

Os tratamentos aplicados na incubação artificial foram determinados pela associação de dois níveis de pressão sonora (NPS), um de 70 dB (A) (controle) e o outro de 90 dB (A) simulando o ruído de incubadoras comerciais. A estes dois NPS foram acrescentadas ou não vocalizações da espécie, como um estímulo natural, a partir do 12º dia do desenvolvimento embrionário (ALLADI et al., 2005; JAIN et al.,



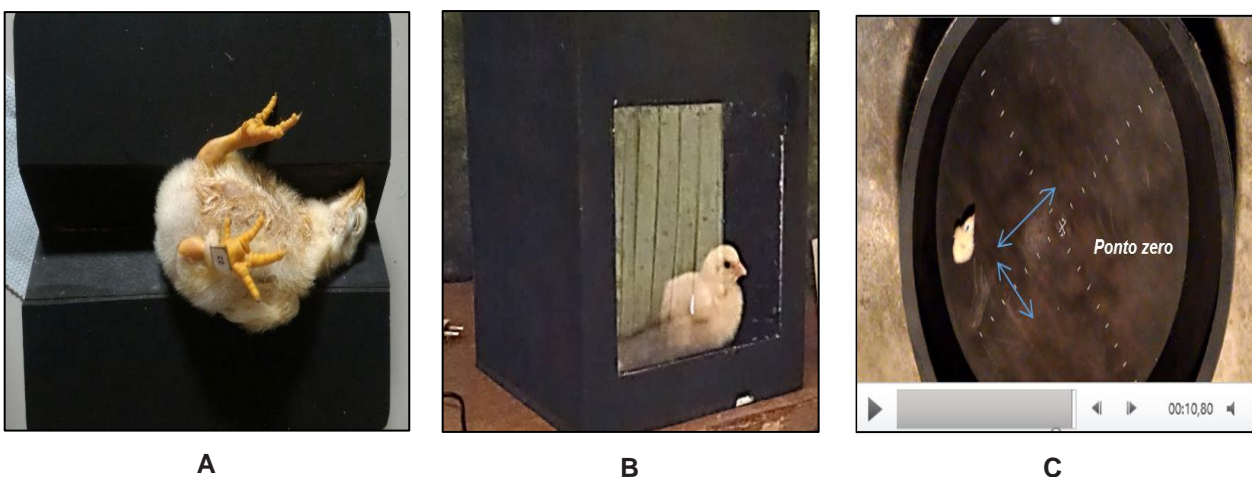
2004). A associação dos NPS com a presença/ausência das vocalizações originou um esquema fatorial 2 x 2, com os tratamentos denominados em:

- S1 - ruído de 70 dB (A), sem vocalizações (controle);
- S2 - ruído de 90 dB (A), sem vocalizações;
- S3 - ruído de 70 dB (A) com vocalizações da espécie;
- S4 - ruído de 90 dB (A) com as vocalizações.

Os pintos utilizados nos testes comportamentais foram resultantes de um ciclo de incubação realizado no mês de janeiro de 2017. Após a eclosão os pintos foram identificados numericamente com anilhas e alojados por uma semana em boxes, separados por tratamento. Informações detalhadas sobre as incubações experimentais, aplicação dos tratamentos sonoros e alojamento dos pintos foram apresentadas nos Capítulos 4 e 5.

### 6.2.2. Testes comportamentais

Os testes escolhidos para aferir os efeitos da estimulação sonora no comportamento dos pintos após a eclosão foram o de imobilidade tônica - IT (Figura 23A), isolamento social - IS (Figura 23B) e campo aberto - CA (Figura 23C).



**Figura 23.** Teste de imobilidade tônica (A); teste de isolamento social (B); teste de campo aberto (C)

Estes testes foram aplicados em três períodos diferentes: período 1 - testes realizados em até 24 horas (um dia) após a eclosão; período 2 - testes realizados

após 72 horas (três dias) da eclosão; período 3 - testes realizados após 144 horas (seis dias) da eclosão. Além dos períodos, foram avaliadas duas condições, sendo uma delas a condição “S”, com os testes realizados em silêncio e a outra a condição foi a “C”, com a reprodução das vocalizações da espécie durante a aplicação dos testes. As vocalizações da condição “C” foram as mesmas aplicadas nos tratamentos S3 e S4 na incubação, a um NPS médio de 75 dB (A), com picos de 85 dB (A), reproduzidas por caixas amplificadoras (Mini Speaker® - BT51). As caixas amplificadoras foram posicionadas a 20 cm dos aparatos experimentais utilizados nos testes de comportamento.

Os tratamentos de incubação foram submetidos aos testes comportamentais (IT, CA e IS), nos três períodos (1, 2 e 3) e nas duas condições (S e C). Para tanto, os testes foram duplicados entre os períodos, o que resultou em seis dias de experimento (período = pares de dia). Foram utilizados cinco pintos por tratamento de incubação, por condição e por período em cada teste comportamental. As aves foram consideradas como repetições, aleatorizadas e não repetidas nos períodos. A Tabela 21 exibe a quantificação de testes e aves.

**Tabela 21.** Quantificação dos testes comportamentais e quantidade de aves, para cada situação de avaliação (A e B), dentro de cada período (1, 2, 3)

Tratamentos de incubação	Testes	Períodos					
		1		2		3	
		Condição		Condição		Condição	
		S	C	S	C	S	C
Número de pintos por tratamento e teste							
S1	IS, CA, IT	15	15	15	15	15	15
S2	IS, CA, IT	15	15	15	15	15	15
S3	IS, CA, IT	15	15	15	15	15	15
S4	IS, CA, IT	15	15	15	15	15	15
Total de aves	-	60	60	60	60	60	60

IS: isolamento social; CA: campo aberto; IT: imobilidade tônica

A: teste realizado em silêncio; B: teste realizado com aplicação de vocalizações da espécie

Cada teste foi reproduzido 40 vezes por período, visto que foram avaliados cinco pintos por tratamento, duplicados pelas condições. Dados os três testes, foram feitas 120 avaliações/período resultando em um total de 360 testes. A ordem dos testes e condições foi alternada ao longo dos dias, sendo eles realizados em um local silencioso e com baixa luminosidade.

### **i. Teste de imobilidade tônica (IT)**

No teste de imobilidade tônica foi utilizada uma caneleira em “V”, com cinco centímetros de profundidade e uma angulação interna de 90°, dimensões apropriadas para aves pequenas (PITTET et al., 2014). Para a indução, os pintos foram deitados na caneleira com o dorso para baixo, enquanto o ventre e a cabeça eram contidos suavemente com uma das mãos de um observador por um período de 15 segundos. Após esse tempo, o observador cautelosamente removia a sua mão liberando o animal e iniciando a avaliação comportamental, caso a indução fosse efetiva (JONES; WADDINGTON, 1992).

Considerou-se como indução não efetiva quando o pinto estivesse acordado/ativo ou quando a duração da IT fosse inferior a cinco segundos. Se após três tentativas a indução não fosse efetiva, essa informação era registrada e o pinto recebia zero segundos nas demais respostas. Com a comprovação da indução a IT acionava-se um cronômetro e as observações comportamentais por cinco minutos (300 segundos). Neste teste foram avaliados os tempos de latência para qualquer movimentação (TPM; s), para o retorno à posição de pé (TPP; s) e para o primeiro piado (TPI; segundos). Caso o pinto realizasse-se os comportamentos antes dos 300 s o teste era interrompido. Na ausência de algum comportamento, registrava-se 300 s para o mesmo (JONES; WADDINGTON, 1992; DÁVILA et al., 2011).

### **ii. Teste de isolamento social (IS)**

O teste de isolamento social (IS) foi adaptado das metodologias de Marx et al. (2001), Mujahid; Furuse (2009) e Huth; Archer (2015). O aparato experimental consistiu em uma caixa de MDF 30 x 30 x 30 cm. Uma das faces da caixa possuía vitral transparente permitindo a observação dos pintos em seu interior.

Avaliações acerca da atividade dos pintos perante à condição de isolamento foram realizadas atribuindo-se escores de 1 a 3 em subintervalos de um minuto, para as respostas: nível de vocalização (NV), nível de movimentação (NM) e tentativa de fuga (TF). Ao final, resultaram-se cinco escores por atividade/pinto, somados e apresentados em seu total. Assim, a pontuação mínima conferida em uma das respostas era igual a cinco e a máxima igual a 15, partindo-se do princípio que quanto menor, mais tranquilo estava o pinto, de acordo com a Tabela 22.

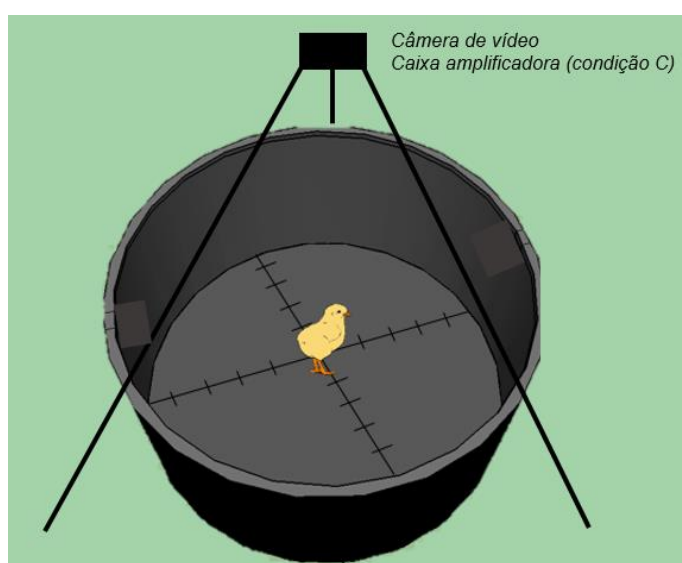
**Tabela 22.** Padrões de resposta adotados no teste de isolamento social

Tipo de resposta	Score	Descrição da resposta
Nível de vocalização (NV)	1	Ausência de vocalização
	2	Vocalização de conforto (chilros) ou piados isolados
	3	Vocalização de socorro (piados intensos)
Nível de movimentação (NM)	1	Ausência de movimentação: ave parada em pé ou deitada
	2	Movimentação moderada caracterizada por passos
	3	Movimentação alterada caracterizada por corridas e saltos
Tentativa de fuga (TF)	1	Sem tentativas de fuga: ausência de saltos (curtos/longos)
	2	Com tentativas de fuga: presença de saltos (curtos/longos)
	3	Ave alterada: movimentação excessiva com vocalização de socorro e tentativa de fuga

Adaptado de Mujahid; Furuse (2009)

### iii. Teste de campo aberto (CA)

O teste de campo aberto foi baseado nas metodologias de Suarez; Gallup Jr. (1985), Jones (1989) e Heiblum et al. (1998). Utilizou-se de uma arena circular com 90 cm de diâmetro e 45 cm de altura, com a marcação de uma escala a cada cinco centímetros nos eixos x e y do piso. O centro da arena foi adotado como o ponto zero, servindo como referencial para o cálculo da distância percorrida pelas aves. Os testes foram gravados por uma câmera posicionada a 1,50 metros do chão. Além disso, por se tratar de uma área maior, o aparato foi pré-aquecido antes dos testes para que a temperatura não limitasse a locomoção das aves (Figura 24).



**Figura 24.** Esquematização do aparato de realização do teste de campo aberto

Uma redoma circular transparente de 20 cm de diâmetro continha o pinto no ponto zero da arena, impedindo sua imediata locomoção. Após 30 segundos a redoma era retirada e as gravações iniciadas com um tempo fixo de cinco minutos (300 segundos) (JAIME; LICKLITER, 2006; HARSHAW; LICKLITER, 2011).

Posteriormente, as gravações foram analisadas do início do deslocamento dos pintos ao término dos cinco minutos de teste, com a determinação da posição do pinto nos eixos x e y, em intervalos pré-estabelecidos de 30 segundos. Cada ave gerou 20 pontos aplicados no cálculo da distância Euclidiana, obtendo-se como resposta à distância total percorrida (DT; cm).

### **6.2.3. Análise estatística**

As análises foram realizadas no software estatístico R (R CORE TEAM, 2017). Nos testes de campo aberto (CA) e isolamento social (IS), os efeitos dos fatores experimentais sobre as respostas foram investigados por meio de análise de variância (ANOVA). As pressuposições da ANOVA foram validadas a partir dos testes de Shapiro-Wilk (normalidade dos resíduos) e Levene (homogeneidade de variâncias), além de gráficos de diagnóstico do ajuste. Para a distância total percorrida (DT) foi necessário transformar os dados, aplicando-se a função raiz quadrada. Os tratamentos foram comparados por meio do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas considerando-se um nível de 5% de significância.

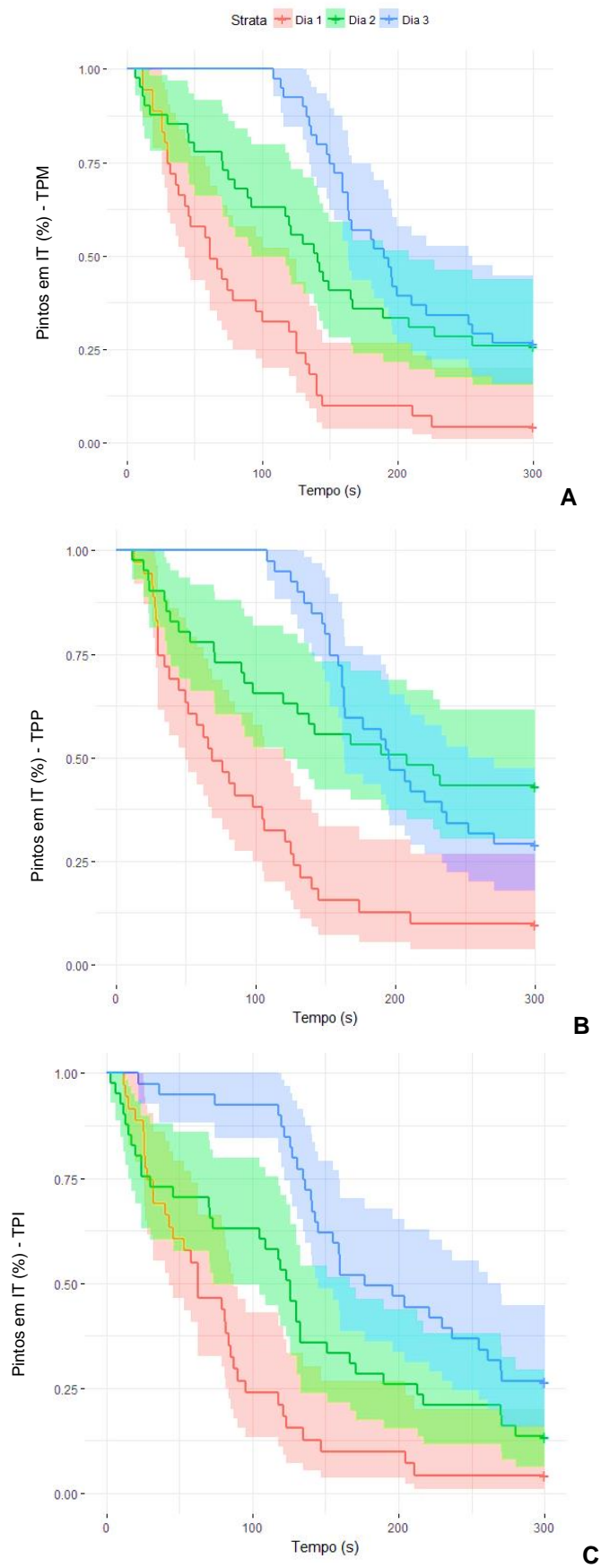
No teste de imobilidade tônica (IT) avaliou-se o tempo de latência até a execução de um determinado comportamento por meio da análise de sobrevivência. Como fatores de risco considerou-se a condição de realização do teste (C ou S) e os fatores experimentais da incubação: nível de pressão sonora do ruído [70 ou 90 dB (A)] e a adição das vocalizações. Curvas de sobrevivência para dados censurados foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier com intervalos de 95% de confiança (COLOSIMO; GIOLO, 2006; HOSMER; LEMESHOW, 2008). Para cada fator calculou-se o risco relativo e seu intervalo com 95% de confiança, com a significância dos efeitos averiguada pelo teste de Wald com  $\alpha = 0,05$ .

### 6.3. Resultados e discussão

#### 6.3.1. Teste de imobilidade tônica (IT)

A imobilidade tônica (IT) é um estado temporário de inibição motora do animal, o que remete a uma resposta inata de medo e defesa antipredatória (GALLUP,1977; GALLUP,1979; JONES, 1992). Verificou-se que o tempo médio de IT foi de  $60,73 \pm 41,26$  s no primeiro período,  $116,13 \pm 58,21$  s no segundo e  $170,82 \pm 19,94$  s no terceiro período. Já a resposta que obteve uma maior duração foi o tempo até o retorno a posição de pé (TPP), com uma média geral de 157,58 s. Enquanto que a primeira movimentação (TPM), que representa a finalização do estado de imobilidade, foi o comportamento realizado mais rapidamente (141,70 s).

Na Figura 25 são apresentadas as curvas de sobrevivência das respostas do teste de imobilidade tônica (TPM, TPP e TPI) em relação aos três períodos de avaliação considerados nesta pesquisa. Nos três casos, a duração da IT aumentou entre o período inicial e o final. Isto é explicado por Heiblum et al. (1998) e Nakasai et al. (2013), que colocam o tempo de IT como um fator influenciado principalmente pela idade da ave. Os pintos jovens (até três dias) são mais resistentes à imobilidade, por isso permanecem menos tempo imóveis (HILL et al., 1994). Deste modo, independentemente dos tratamentos de incubação e/ou condições de teste, o aumento da duração da IT com o avanço dos períodos já era esperado.



**Figura 25.** Curvas de sobrevivência da primeira movimentação (A); retorno a posição de pé (B); e primeiro piado (C). Os períodos (dias) são apresentados em parcelas separadas.

Na Tabela 23 encontram-se as estatísticas (teste de Wald,  $\alpha = 0,05$ ) obtidas para os tempos de latência das respostas avaliadas neste teste de IT.

**Tabela 23.** Análise do tempo para as respostas latência até a primeira movimentação, retorno à posição de pé e primeiro piado

Fatores	Valor p	Risco relativo	Intervalo de confiança - 95%	
			Inferior	superior
<b>Primeira movimentação (TPM)</b>				
<b>Período 1 (24 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	<0,001	6,28	2,21	17,95
NPS do ruído	0,082	1,92	0,92	3,99
Vocalizações	0,284	0,69	0,35	1,36
<b>Período 2 (72 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,024	2,31	1,12	4,80
NPS do ruído	0,471	0,48	0,23	0,99
Vocalizações	0,604	0,82	0,40	1,70
<b>Período 3 (120 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,704	0,87	0,42	1,80
NPS do ruído	0,783	0,90	0,44	1,87
Vocalizações	0,894	0,51	0,47	1,75
<b>Retorno à posição de pé (TPP)</b>				
<b>Período 1 (24 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,001	4,99	1,90	13,13
NPS do ruído	0,033	2,26	1,06	4,76
Vocalizações	0,499	0,79	0,40	1,56
<b>Período 2 (72 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,027	2,58	1,11	5,99
NPS do ruído	0,084	0,48	0,21	1,10
Vocalizações	0,954	1,02	0,45	2,32
<b>Período 3 (120 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,979	0,99	0,47	2,08
NPS do ruído	0,857	1,07	0,51	2,25
Vocalizações	0,893	0,98	0,77	2,89
<b>Primeiro piado (TPI)</b>				
<b>Período 1 (24 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	<0,001	4,36	1,88	10,12
NPS do ruído	0,190	1,64	0,78	3,45
Vocalizações	0,336	0,72	0,36	1,41
<b>Período 2 (72 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,057	1,92	0,98	3,76
NPS do ruído	0,149	0,61	0,31	1,19
Vocalizações	0,860	1,06	0,54	2,07
<b>Período 3 (120 h pós-eclosão)</b>				
Condição (S ou C)	0,307	0,68	0,33	1,42
NPS do ruído	0,769	1,12	0,54	2,31
Vocalizações	0,227	1,58	0,75	3,33

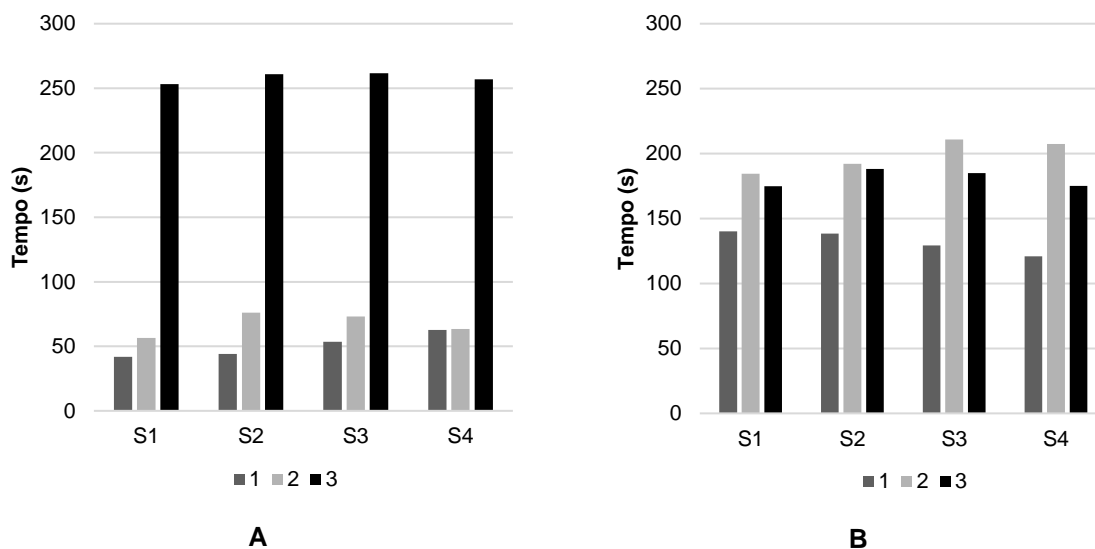
Valores p calculados a partir da estatística Z no teste de Wald para o coeficiente do modelo de regressão Cox, com  $\alpha = 0,05$ .  
 \*Baseline: condição de teste em silêncio (S); NPS na incubação de 70 dB (A); e vocalizações ausentes na incubação

Nos períodos 1 e 2 as duas condições (C e S) diferiram entre si para o tempo até a primeira movimentação (TMP; s) e para o tempo de retorno à posição de pé (TPP; s); e no primeiro período para o tempo do primeiro piado (TPI; s). Na presença das vocalizações os pintos apresentaram o início das atividades antes daqueles que foram testados em silêncio (condição S), comprovando a sensibilidade deles em relação às vocalizações do ambiente pós-eclosão (FORKMAN et al. 2007; EDELAAR et al., 2012). Todavia, no terceiro período as duas condições foram iguais em todas as respostas. Percebe-se com estes



resultados que os pintos são sensíveis ao som ambiente, neste caso, às vocalizações da espécie. Porém, à medida em que o tempo passa, há uma redução nesta resposta, o que foi atribuído a menor sensibilidade às vocalizações.

Nas respostas TPM e TPI os fatores aplicados durante a incubação não apresentaram efeitos significativos ( $p>0,05$ ). Contudo, em TPP verificou-se que no primeiro período o NPS do ruído da incubação ( $p=0,033$ ) foi diferente entre 70 e 90 dB (A). A exposição ao maior NPS das incubadoras fez com os pintos ficassem em pé mais rapidamente. Todavia, como a resposta de maior interesse no teste de IT é o tempo de realização da primeira movimentação, pelo qual é possível verificar o término do estado de imobilidade, os tratamentos da incubação não diferiram entre si e apresentaram médias semelhantes como ilustra a Figura 26.



**Figura 26.** Médias do tempo da primeira movimentação (TPM; s) dos tratamentos de incubação nos períodos 1,2 e 3, considerando a condição "S" (A) e a condição "C" (B)

Segundo Sigman; Prestrude (1981) e Thompson; Liebreich (1987), mesmo em estado de IT as aves são capazes de processar estímulos externos, sobretudo, os sonoros. Hatton; Thompson (1975) provaram que o aumento gradativo de 60 para 90 dB de um ruído resultou em um maior tempo de IT de aves adultas. Nesta pesquisa, o fato dos pintos ouvirem os sons da espécie durante o teste fez com que eles ficassem ativos rapidamente (saída do estado de imobilidade). Todavia, percebeu-se que com o avanço da idade (3º período) isto não foi mais significativo.

Os outros trabalhos que avaliaram os efeitos da estimulação sonora no desenvolvimento embrionário em respostas comportamentais não aplicaram o teste

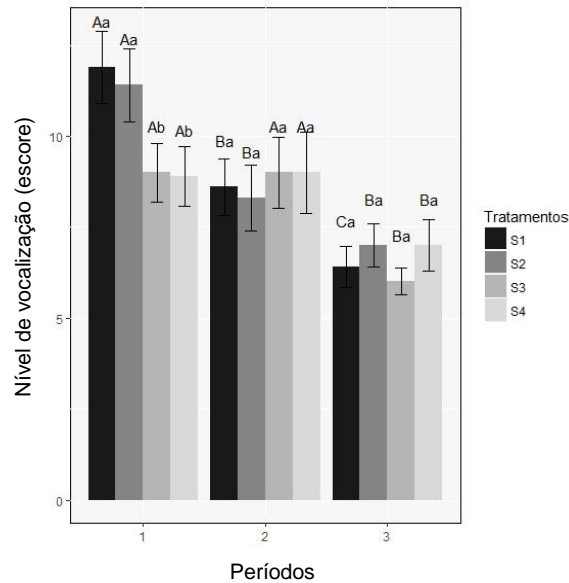
de imobilidade tônica. Para comparação serão citados os resultados de Jain et al. (2004), que verificaram a capacidade de pintos expostos à sons no desenvolvimento embrionário em reconhecerem estes após a eclosão. Em princípio, acreditava-se que a exposição prévia às vocalizações pudesse ser percebida, como o relatado por Jain et al. (2004), mas no teste de IT este fator não foi influente. Além disso, a hipótese inicial era de que a exposição ao NPS de 90 dB (A) pudesse aumentar a reação de medo das aves, só que o efeito deste fator só foi observado no primeiro período de TPP, com a redução do tempo de latência.

### **6.3.2 Teste de isolamento social (IS)**

As aves são animais sociais e o seu isolamento resulta em uma condição de estresse demonstrada pela agitação, atividade de fuga e/ou aumento das vocalizações (RAJECK et al., 1977; MARX et al., 2001; MARINO, 2017). Com o teste de isolamento social buscou-se avaliar se os sons da incubação alterariam isso, o que também poderia ser influenciado pelo período e/ou condição de teste.

O nível de vocalização (NV) foi o comportamento com maior pontuação, o que condiz com o aumento das chamadas de socorro durante uma condição estressante (MARX et al., 2001; MARINO et al., 2017). Para NV na ANOVA foram verificados efeitos significativos da condição de teste ( $F = 57,33$  e  $p < 0,001$ ) e períodos ( $F = 39,46$ ;  $p < 0,001$ ), além das interações entre condição e períodos ( $F = 25,10$  e  $p < 0,001$ ) e entre períodos e tratamentos de incubação ( $F = 3,10$  e  $p = 0,008$ ), sendo  $CV = 21,88\%$  e  $R^2 = 69,58\%$ .

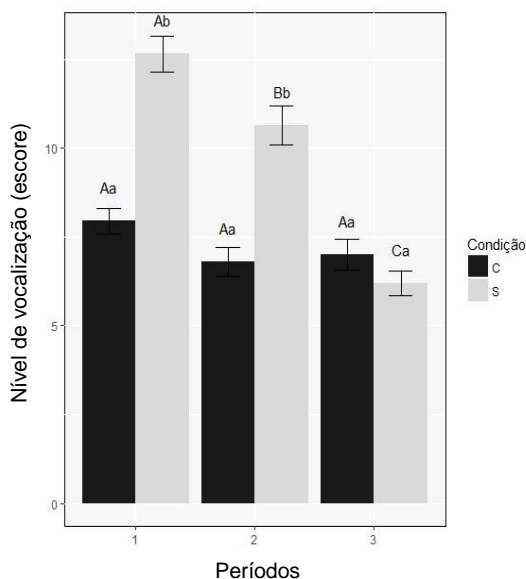
No período 1 observou-se que os tratamentos S1 e S2, apresentaram escores maiores em relação à S3 e S4 ( $p < 0,05$ ). Estes tratamentos podem ser agrupados em duplas, pela ausência das vocalizações durante a incubação (S1 e S2) e pela presença deste estímulo natural (S3 e S4), o que sugere que a exposição aos sons da espécie durante a incubação reduziu o nível de vocalização dos pintos no pós-eclosão (24 horas). Entretanto, nos demais períodos (72 e 120 horas no pós-eclosão) as médias dos tratamentos de incubação foram iguais pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ) (Figura 27).



**Figura 27.** Médias e erros-padrão para o nível de vocalização (NV) nos períodos e tratamentos de incubação. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em períodos diferentes e letras minúsculas comparam os tratamentos em um mesmo período (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

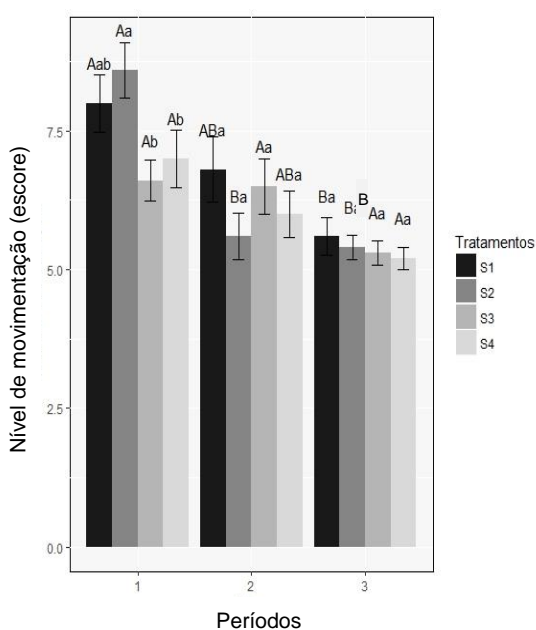
O NPS do ruído durante a incubação não apresentou nenhuma influência aparente no NV dos pintos após a eclosão, entretanto, a presença das vocalizações da espécie durante a incubação influenciou o comportamento vocal deles, verificando-se a redução dos piados durante o isolamento social, como o discorrido anteriormente. Este fato, pode ser considerado favorável ao bem-estar dos animais, indicando uma condição de menor estresse.

Quando se avaliou o nível de vocalização dos pintos em função das condições de teste (Figura 28), verificou-se que no silêncio esta resposta diminuiu com a idade, o que já era esperado. Por outro lado, quando os pintos foram expostos às vocalizações o NV foi menor em relação à condição de silêncio ( $p < 0,05$ ). Este resultado remete que as vocalizações no ambiente pós-eclosão também reduziram o NV e o estresse dos pintos perante o isolamento social, refletindo em um comportamento mais calmo e concordando com as informações de Wauters et al. (2002) e de Woodcock et al. (2014). De uma forma geral, pode-se dizer que as vocalizações da espécie tanto durante a incubação, quanto no ambiente pós eclosão, influenciaram na redução do nível de vocalização (piados) dos pintos, perante o estresse imposto pelo isolamento social.



**Figura 28.** Médias e erros-padrão para o nível de vocalização (NV) nos períodos e condições de teste. Letras maiúsculas comparam as condições em períodos diferentes e letras minúsculas comparam as condições em um mesmo período (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

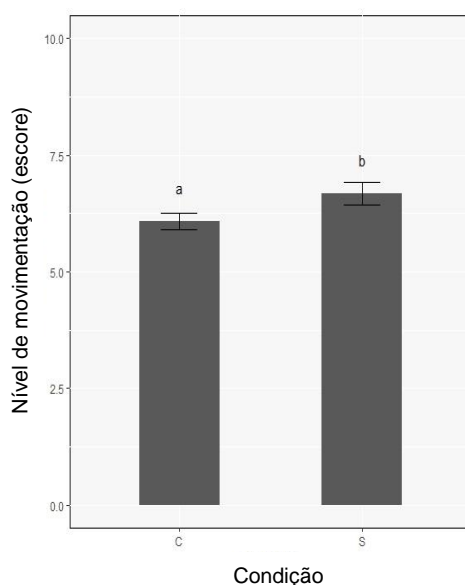
O nível de movimentação (NM) reflete o grau de atividade (agitação) dos animais, portanto, quanto maior o escore de NM mais estressado estava o pinto. Foram verificados os efeitos da condição de teste ( $F = 6,44$  e  $p = 0,013$ ) e dos períodos ( $F = 28,69$  e  $p < 0,001$ ) e a interação destes últimos com os tratamentos de incubação ( $F = 2,36$  e  $p = 0,036$ ), com  $CV = 20,27\%$  e  $R^2 = 50,12\%$ . Na Figura 29 é apresentado o desdobramento dos tratamentos de incubação pelos períodos



**Figura 29.** Médias e erros-padrão para o nível de movimentação (NM) nos períodos e tratamentos de incubação. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em períodos diferentes e letras minúsculas comparam eles em um mesmo período (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

Na Figura 29 observou-se que no primeiro período o tratamento de incubação S2 apresentou um maior NM em relação a S3 e S4, todavia, o mesmo não diferiu de S1. Este resultado sugere que a exposição embrionária na presença das vocalizações diminuiu a atividade dos pintos às 24 horas pós-eclosão. Novamente, nos períodos 2 e 3 os tratamentos de incubação não diferiram entre si. No geral, o nível de movimentação reduziu com a idade dos animais. Estes resultados vão de encontro aos de Kauser et al. (2011), que verificaram que o tratamento estimulado por sons da espécie na incubação apresentou uma redução significativa no tempo dispendido ao completar um labirinto, sugerindo uma menor reação de medo, porém, isso só foi observado nas primeiras 24 horas pós-eclosão.

Ao se avaliar as duas condições de teste, na Figura 30, observou-se que o nível de movimentação dos pintos foi menor na presença das vocalizações ( $p < 0,05$ ), apresentando a mesma tendência em relação aos resultados encontrados para o NV. Na condição em que os animais foram expostos às vocalizações da espécie, eles vocalizaram e se movimentaram menos. Estes resultados, mais uma vez, reforçam a ideia de que as vocalizações no pós-eclosão também apresentaram influências no comportamento dos animais.



**Figura 30.** Médias e erros-padrão para a comparação das condições, letras minúsculas comparam as mesmas (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

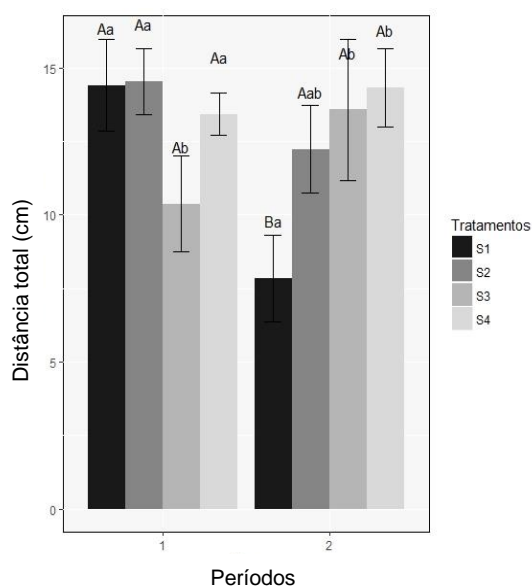
A resposta tentativa de fuga (TF) foi pouco frequente nas observações realizadas, com médias que variaram de 5,0 a 5,6 entre os períodos, condições e tratamentos de incubação. Por isso, a TF não foi modelada para a análise do efeito

dos fatores avaliados, não apresentando qualquer evidência sobre os efeitos da incubação e/ou condições de teste no pós-eclosão.

### 6.3.3 Teste de campo aberto (CA)

O teste de campo aberto (CA) envolve a exposição do animal a um novo ambiente, o que permeia por alterações comportamentais que vão do medo a exploração territorial (SUAREZ; GALLUP JR., 1983; JONES; CARMICHAEL, 1997; HEIBLUM et al., 1998). Segundo Forkman et al. (2007), no CA utiliza-se da quantificação do movimento como a distância total percorrida (DT; cm), que nesta pesquisa foi analisada somente para os períodos 1 e 2, pois, no terceiro período cerca de 50% dos pintos não se movimentaram além do primeiro ponto da arena.

A DT foi influenciada pela condição de teste ( $F = 15,14$  e  $p = 0,0023$ ) e pelos períodos ( $F = 25,60$  e  $p < 0,001$ ), com interações entre a condição e os períodos ( $F = 5,022$  e  $p = 0,0098$ ) e entre os períodos e os tratamentos de incubação ( $F = 3,49$  e  $p = 0,0054$ ), sendo  $CV = 29,95\%$  e  $R^2 = 67,82\%$ . Na Figura 31 apresenta-se o desdobramento das interações entre os tratamentos de incubação e os períodos. Os valores de DT foram transformados pela raiz quadrada, de maneira a garantir dados com variâncias homogêneas e normalidade.

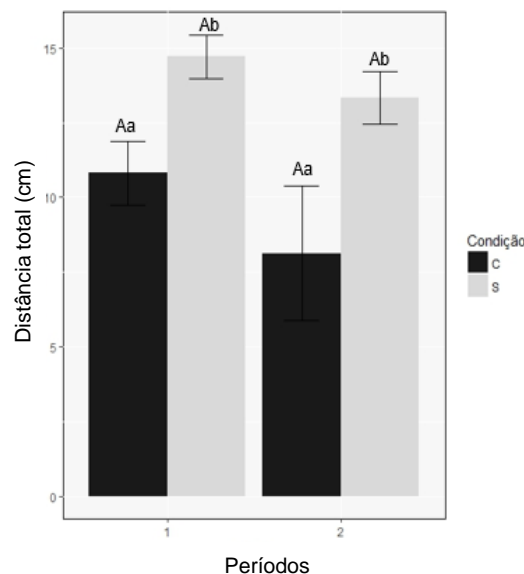


**Figura 31.** Médias e erros-padrão da raiz quadrada da distância total (DT) nos períodos e tratamentos de incubação. Letras maiúsculas comparam um fator em períodos diferentes e letras minúsculas comparam os fatores em um mesmo período (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

Inicialmente deve-se considerar que quanto maior a distância percorrida, maior será o estresse e a agitação dos animais no ambiente desconhecido (arena). Observando os resultados, percebe-se que S3 apresentou uma redução na DT em relação aos demais no primeiro período ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas neste tratamento já haviam sido observadas no primeiro período do teste de isolamento social. No período 2 a média de S1 foi igual a de S2, mas diferente de S3 e S4, estando os últimos associados a uma maior movimentação, o que foi inconclusivo. Na comparação dos tratamentos dentro dos períodos somente a DT de S1 diferiu entre 1 e 2, com a redução na DT do primeiro para o segundo dia.

O teste de campo aberto foi empregado no estudo de estimulação sonora na incubação realizado por Sanyal et al. (2013). Estes autores não encontraram efeitos significativos de seus tratamentos na DT. Entretanto, o tempo gasto durante a movimentação foi maior nos pintos expostos na incubação aos ruídos crônicos com um NPS de 110 dB (A). Nesta pesquisa, o NPS não apresentou significância de efeitos nas respostas relacionadas ao teste de campo aberto, pois, verificou-se o efeito somente do tratamento S3 (NPS de 70 dB com vocalizações da espécie).

Na Figura 32 é apresentada a interação entre os períodos 1 e 2 e as condições de teste (S e C) no pós-eclosão. Nos dois períodos os animais testados na condição de silêncio apresentaram uma maior distância percorrida indicando uma maior agitação ( $p < 0,05$ ).



**Figura 32.** Médias e erros-padrão para a distância total (DT) nos períodos e condições de teste. Letras maiúsculas comparam as condições em períodos diferentes e letras minúsculas comparam as condições em um mesmo período (teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

Apesar dos últimos resultados serem independentes dos tratamentos de incubação, eles podem ser utilizados para a obtenção de conclusões sobre o teste de CA. Na realização dos outros testes em silêncio as respostas encontradas provaram que os pintos estavam mais agitados. Desta forma, supõem-se que a maior movimentação no campo aberto na condição de silêncio reflita o maior estresse dos pintos, cuja maior movimentação está associada a tentativa de restabelecer o contato social e não à exploração do ambiente (SUAREZ; GALLUP JR., 1983; VALLORTIGARA; ZANFORLIN, 1988).

Em suma, os resultados de CA vão de encontro aos dos demais testes, com efeitos da incubação observados somente nas primeiras 24 horas após a eclosão e com os testes realizados com as vocalizações (condição C) resultando em comportamentos menos associados ao estresse dos pintos.

#### **6.4. Conclusões**

1. Os efeitos da estimulação sonora na incubação artificial foram verificados no comportamento dos pintos somente nas primeiras 24 horas pós-eclosão;
2. A exposição às vocalizações da espécie durante o desenvolvimento embrionário e no pós-eclosão reduziram os comportamentos associados à reação de medo, bem como, o nível de estresse dos animais;
3. O tempo se mostrou influente no comportamento pós-eclosão das aves. A medida a idade dos pintos foi avançando estes se tornaram menos reativos às condições impostas pelos testes, como o isolamento.

#### **Referências**

ALLADI, P. A.; ROY, T.; SINGH, N.; WADHWA, S. Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 363 - 373, 2005.

ARCHER, G. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MENCH, J. A. Effect of providing light during incubation on the health, productivity, and behavior of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, p. 29 - 37, 2009.



CAMPO, J. L.; CARNICER, C. Effects of several "stressors" on tonic immobility reaction of chickens. **Archives Geflügelk**, v. 58, n. 2, p. 75 - 78, 1994.

COLOSIMO, E.A.; GIOLO, S.R. **Análise de Sobrevivência Aplicada**. Editora Edgard Blucher. São. Paulo, p. 392, 2006.

DÁVILA, S. G.; CAMPO, J. L.; GIL, M. G.; PRIETO, M. T. TORRES, O. Effects of auditory and physical enrichment on 3 measurements of fear and stress (tonic immobility duration, heterophil to lymphocyte ratio, and fluctuating asymmetry) in several breeds of layer chicks, **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2459 - 2466, 2011.

DIXON, L. M.; SPARKS, N. H. C.; RUTHERFORD, K. M. D. Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. **Poultry Science**, v. 00, p. 1 - 11, 2015.

EDELAAR, P.; SERRANO, S.; CARRETE, M.; BLAS, J.; POTTI, J.; TELLA, J.L. Tonic immobility is a measure of boldness toward predators: an application of Bayesian structural equation modeling. **Behavioral Ecology**, v. 23, n. 3, p. 619 - 626, 2012.

EDGAR, J.; HELD, S.; JONES, C.; TROISI, C. Influences of maternal care on chicken welfare. **Animals**, v. 6, p.12, 2016.

FIELD, S.E.; RICKARD, N.S.; TOUKHSATI, S.R.; GIBBS, M.E. Maternal hen calls modulate memory formation in the day-old chick: The role of noradrenaline. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, p. 321 - 330, 2007.

FORKMAN, B.; BOISSY, A.; MEUNIER-SALAÜN, M.-C.; CANALI, E.; JONES, R.B. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 340 - 374, 2007.

GALLUP, G. G., JR. Animal hypnosis: Factual status of a fictional concept. **Psychological Bulletin**, v. 81, p. 836 - 853, 1974.

GALLUP, JR., G.G. Tonic immobility: the role of fear and predation. **The Psychological Record**, v. 27, p. 41 - 61, 1977.

GALLUP, JR., G.G., Tonic immobility as a measure of fear in domestic fowl. **Animal Behaviour**, v. 27, p. 316 - 317, 1979.

GVARYAHU, G.; SNAPIR, N.; ROBINZON, B. Research Note: Application of the Filial Imprinting Phenomenon to Broiler Chicks at a Commercial Farm, **Poultry Science**, v. 66, n. 9, p. 1564 - 1566, 1987.

GVARYAHU, G.; CUNNINGHAM, D. L.; VAN TIENHOVEN, A. Filial imprinting, environmental enrichment, and music application effects on behavior and performance of meat strain chicks. **Poultry Science**, v. 68, n. 2, p. 211 - 217, 1989.

- HARSHAW, C.; LICKLITER, R. "Biased embryos: Prenatal experience alters the postnatal malleability of auditory preferences in bobwhite quail. **Developmental Psychobiology**, v. 53, p. 291 - 302, 2011.
- HATTON, D.C.; THOMPSON, R.W. Termination of tonic immobility in chickens by auditory stimulation. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 5, n. 1, p. 61 - 62, 1975.
- HEIBLUM, R.; AIZENSTEIN, O.; GVARYAHU, G.; VOET, H.; ROBINZON, B.; SNAPIR, N. Tonic immobility and open-field responses in domestic fowl chicks during the first week of life. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, p. 347 - 357, 1998.
- HILL, W. L.; FLEMING, T. M.; SHRIER, E. M. Tonic immobility and high-intensity calls in a precocial chick as a function of age, diet, and time of day. **Developmental Psychobiology**, v. 27, n. 6, p. 331 - 342, 1994.
- HOSMER JR.; DAVID W.; STANLEY LEMESHOW. *Applied Survival Analysis: Regression Modeling of Time-to-Event Data*, 2a edição, p. 416, 2008.
- HUTH, J.C.; ARCHER, G.S.; Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. **Poultry Science**, v.94, p. 3052 - 3058, 2015.
- JAIME, M.; LICKLITER, R. Prenatal exposure to temporal and spatial stimulus properties affects postnatal responsiveness to spatial contiguity in bobwhite quail chicks. **Developmental Psychobiology**, v. 48, p. 233 - 242, 2006.
- JAIN, S.; SHARMA, R.; WADHWA, S. Effect of prenatal species-specific and music stimulation on the postnatal auditory preference of domestic chick. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 48, p. 174 - 183, 2004.
- JONES, R.B. Avian open-field research and related effects of environmental novelty: an annotated bibliography. *The Psychological Record*, v. 39, p. 397–420, 1989.
- JONES, R.B. The nature of handling immediately prior to test affects tonic immobility fear reactions in laying hens and broilers. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 34, p. 247 - 254, 1992.
- JONES, R. B.; WADDINGTON, D. Modification of fear in domestic chicks, *Gallus gallus domesticus*, via regular handling and early environmental enrichment. **Animal Behaviour**, v. 43, p. 1021 - 1033, 1992.
- JONES, R. B.; CARMICHAEL, N. Open-field behavior in domestic chicks tested individually or in pairs: Differential effects of painted lines delineating subdivisions of the floor. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 29, n. 3, p. 396 - 400, 1997.

KAUSER, H.; ROY, S.; PAL, A.; SREENIVAS, V.; MATHUR, R.; WADHWA, S.; JAIN, S. Prenatal complex rhythmic music sound stimulation facilitates postnatal spatial learning but transiently impairs memory in the domestic chick.

**Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 48 - 56, 2011.

LØTVEDT, P.; JENSEN, P. Effects of Hatching Time on Behavior and Weight Development of Chickens. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 10, 2014.

MARINO, L. Thinking chickens: a review of cognition, emotion, and behavior in the domestic chicken. **Animal Cognition**, v. 20, p. 127 - 147, 2017.

MARX, G; LEPELT, J.; ELLENDORFF, F. Vocalisation in chicks (*Gallus gallus dom.*) during stepwise social isolation. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 75, n. 1, p. 61 - 74, 2001.

MUJAHID, A.; FURUSE, M. Behavioral responses of neonatal chicks exposed to low environmental temperature, **Poultry Science**, v. 88, n.5, p. 917 - 922, 2009.

NAKASAI, E; TANIZAWA, H.; TAKAWAKI, M.; YANAGITA, K.; KAWAKAMI, S.; OKA, T.; TSUDZUKI, M.; BUNGO, T. Age-Dependent Change of Tonic Immobility Response in Chicks of a Native Japanese Chicken breed, Tosa-Jidori. **Japan Poultry Science Association**, v. 50, p. 321 - 325, 2013.

PARK, T.; BALABAN, E. Relative salience of species maternal calls in neonatal gallinaceous birds: a direct comparison of japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 105, p. 45 - 54, 1991.

PITTET, F. HOUELIER, C.; LE BOT, O.; LETERRIER, C.; LUMINEAU, S. fearfulness affects quail maternal care and subsequent offspring development. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. 10, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 2017.

ROY, S.; NAG, T. C.; UPADHYAY, A. D.; MATHUR, R.; JAIN, S. Prenatal music stimulation facilitates the postnatal functional development of the auditory as well as visual system in chicks (*Gallus domesticus*). **Journal of Biosciences**, v. 39, p. 107 - 117, 2014.

SANYAL, T.; KUMAR, V.; NAG, T. C.; JAIN, S.; SREENIVAS, V. Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in one-day-old chicks. **PLoS ONE**, v. 8, p. 16, 2013.

SIGMAN, S.E.; PRESTRUDE, A.M. Auditory imprinting in domestic chicks during tonic immobility. **Developmental Psychobiology**, v. 14, n. 5, p. 473 - 480, 1981.

SUAREZ, S.D.; GALLUP JR, G.G. Social reinstatement and open-field testing in chickens. **Animal Learning & Behavior**, v. 2, n. 1, p. 119 - 126, 1983.

THOMPSON, R. K. R.; LIEBREICH, M. Adult chicken alarm calls enhance tonic immobility in chicks. **Behavioural Processes**, v.14, p. 49 - 61, 1987.

TZSCHENTKE, B.; A. PLAGEMANN. Imprinting and critical periods in early development. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 62, p. 626 - 637, 2006.

TZSCHENTKE, B. Effect of hatching time on poultry behaviour: the impact of incubation environment during the last days of embryonic development. **World's Poultry Congress**, 5 - 9 August – 2012, Salvador - Bahia – Brasil, p. 11, 2012.

VALLORTIGARA, G.; MARIO ZANFORLIN, M. Open-field behavior of young chicks (*Gallus gallus*): Antipredatory responses, social reinstatement motivation, and gender effects. **Animal Learning & Behavior**, v. 16, n. 3, p. 359 - 362, 1988.

WADHWA, S.; ANAND, P.; BHOWMICK, D. Quantitative study of plasticity in the auditory nuclei of chick under conditions of prenatal sound attenuation and overstimulation with species specific and music sound stimuli. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 17, n. 3, p. 239 - 253, 1999.

WAUTERS, A.M.; RICHARD-YRIS, M. A.; TALEC, N. Maternal Influences on Feeding and General Activity in Domestic Chicks. **Ethology**, v. 108, p. 529 - 540, 2002.

WOODCOCK, M. B.; PAJOR, E. A.; LATOUR, M. A. The Effects of Hen Vocalizations on Chick Feeding Behavior. **Poultry Science**, v. 83, p. 1940 - 1943, 2004.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa validou o fato de que os embriões de aves comerciais são expostos ao ambiente acústico durante a incubação artificial e que isto pode influenciar em respostas produtivas de interesse à avicultura e no comportamento pós-eclosão das aves. Inicialmente, levantou-se como hipótese que a exposição ao nível de pressão sonora mais intenso afetaria o crescimento embrionário, a eclosão, o desempenho e o comportamento dos pintos. Bem como, a adição das vocalizações da espécie, como uma forma de prover um estímulo natural à produção industrial, proveria melhorias nestas mesmas respostas.

O nível de pressão sonora (NPS) das incubadoras extrapola o que é estabelecido como condição de conforto para muitas espécies. Como os embriões de aves são capazes de ouvir/processar sons a partir do 12º dia de desenvolvimento, supôs-se que os mesmos estariam expostos ao ruído de funcionamento delas. Com o auxílio do decibelímetro miniaturizado desenvolvido nesta pesquisa foi possível estimar a magnitude da onda sonora na câmara de ar e prever valores de NPS próximos aos embriões. Disto, obteve-se que a casca isola o som em até 33%, mas que o NPS no interior dos ovos ainda é elevado.

Com as incubações experimentais verificou-se que a estimulação sonora influenciou em importantes respostas produtivas. A exposição ao NPS superior simulando ruído dos incubatórios levou ao adiantamento das eclosões, uma maior chance de eclosão e melhor qualidade dos pintos. A princípio, estes resultados opuseram a hipótese de que o maior NPS seria prejudicial. Dado o efeito do isolamento da casca, acredita-se que internamente o NPS mesmo a uma exposição a 90 dB (A) tenha ficado dentro de um limiar estimulante e não aversivo. Tanto que, para 70 dB (A), houve um atraso demasiado no início das eclosões e a ocorrência de outras respostas consideradas negativas.

Por outro lado, a adição das vocalizações da espécie só se mostrou influente em algumas respostas produtivas se associadas ao NPS inferior, concluindo-se que a utilização deste estímulo na prática da incubação não seria perceptível/aplicável, a menos que o ruído das incubadoras fosse reduzido ou que o NPS das vocalizações fosse maior, deixando isso como sugestão para a realização de outras pesquisas. Já nos testes comportamentais, verificou-se que a

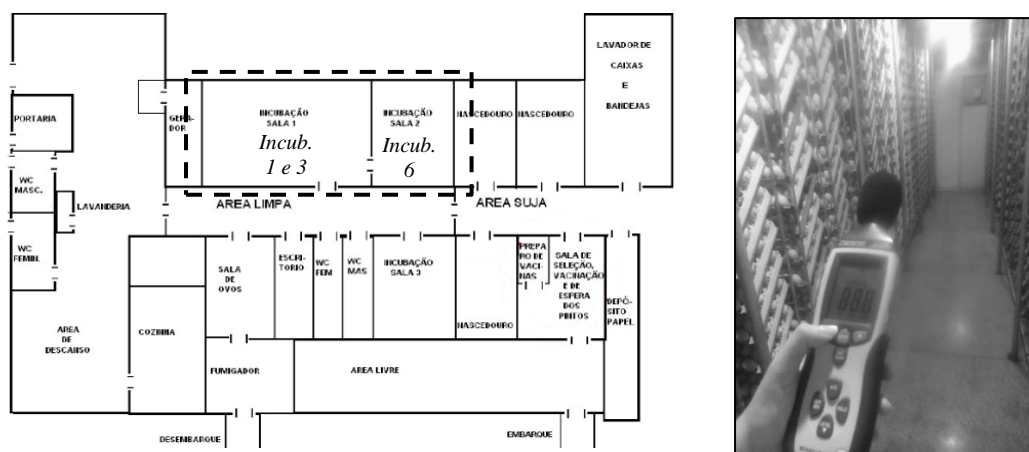
exposição às vocalizações no desenvolvimento embrionário resultou em uma menor condição estresse dos pintos. Ao mesmo tempo, houve uma forte influência do tempo (idade das aves) e com o passar das horas de eclosão o efeito da estimulação sonora e o nível de atividade, de um modo geral, reduziu.

Na busca por outros elementos influentes na incubação artificial, com este estudo relatou-se os efeitos da bioacústica em respostas de interesse para a avicultura. Defende-se que a estimulação sonora possa prover melhorias e adaptar à produção industrial de pintos de corte a novas demandas, como o caso do bem-estar animal e o emprego de aspectos naturais da espécie à produção em larga escala. Combinações e variações de fatores, como tipos de sons e níveis de pressão sonora, permitem a continuação desta pesquisa e a obtenção de novos resultados visando a inovação na produção de pintos comerciais.

## ANEXOS

### ANEXO A - Caracterização do ruído em incubadoras comerciais

A caracterização do ruído em incubadoras comerciais foi realizada em um incubatório no Município de Mogi Mirim - SP, a uma longitude de 46°59'30,9" O e latitude de 22°26'23,5 "S. Três máquinas de estágio múltiplo da CASP®, modelo CMg 125 - capacidade de 125 mil ovos - foram caracterizadas. Na Figura 33 encontra-se a planta baixa do incubatório, destacando-se as salas das incubadoras. Ao lado é possível visualizar o interior de uma delas durante a aferição do NPS.



**Figura 33.** Planta baixa do incubatório com destaque para as salas em que estavam as incubadoras caracterizadas (A); aferição do nível de pressão sonora (B)

Foram adotados os procedimentos estabelecidos na NBR 10.152:2000, que envolve as medições do NPS em decibels ponderados na escala "A". Para tanto, utilizou-se um decibelímetro DEC – 490 da Instrutherm®, já descrito anteriormente e com o emprego da mesma configuração. Os registros de NPS foram realizados em três posições distintas, espaçadas a cada 2,30 m (total de 6,97 m de comprimento da incubadora). Essas posições foram denominadas de porta, meio e fundo, nas quais foram obtidos cinco minutos de coleta.

Os dados foram descarregados no programa Sound Level Meter®. Utilizou-se de estatísticas descritivas (medianas, desvios-padrão, valores mínimos e máximos e diagramas de caixas) e posteriormente de testes não paramétricos de Kruskal e Wallis, para comparações em mais do que dois grupos, a 5% de significância. As análises foram realizadas no programa R (R CORE TEAM, 2016).



As médias do NPS das incubadoras, considerando as diferentes posições internas das mesmas (porta, meio e fundo) são apresentadas na Tabela 24.

**Tabela 24.** Caracterização do nível de pressão sonora em dB (A)\* das incubadoras comerciais, nas posições: porta (P), meio (M) e fundo (F)

	Incubadora 1			Incubadora 2			Incubadora 3		
	P	M	F	P	M	F	P	M	F
<b>Médias</b>	90,15	90,21	89,88	89,14	90,34	90,47	91,46	90,72	89,66
<b>Medianas</b>	90,20	90,50	89,90	89,20	90,40	90,40	90,90	90,40	89,20
<b>Máximos</b>	92,50	92,10	92,50	91,50	92,70	95,60	100,90	97,80	97,40
<b>Mínimos</b>	88,60	85,90	87,80	86,80	88,20	89,00	88,60	88,40	87,80

\* Observação: adotou-se a ponderação em A no decibelímetro comercial normalmente utilizada para o estudo do ambiente acústico de seres humanos (HALLIDAY et al., 2012; FEITOSA et al., 2014).

A média geral foi próxima a 90 dB (A), sendo este valor adotado como referência para os tratamentos dos Capítulos 4, 5 e 6. Verificou-se que o menor registro foi de 85,90 dB (A) no meio da primeira incubadora e o maior de 100,90 dB (A), na porta da incubadora três. Pelo teste de Kruskal-Wallis observou-se que o NPS foi proveniente de distribuições diferentes entre as incubadoras ( $\chi^2 = 39,72$ ;  $p < 0,01$ ). A terceira máquina, por exemplo, apresentou uma maior dispersão acima da medida de posição, com pontos de NPS que chegaram a até 100 dB (A). Acredita-se que as diferenças entre incubadoras e mesmo entre posições internas sejam decorrentes do funcionamento dos ventiladores, o que talvez possa ser justificado por características individuais ou por alguma falha deles. Os resultados encontrados podem ser complementados pelos trabalhos de Carvalho (2009) um dos poucos autores que aferiram essa variável em incubadoras comerciais, com registros médios próximos a 99 dB (A).

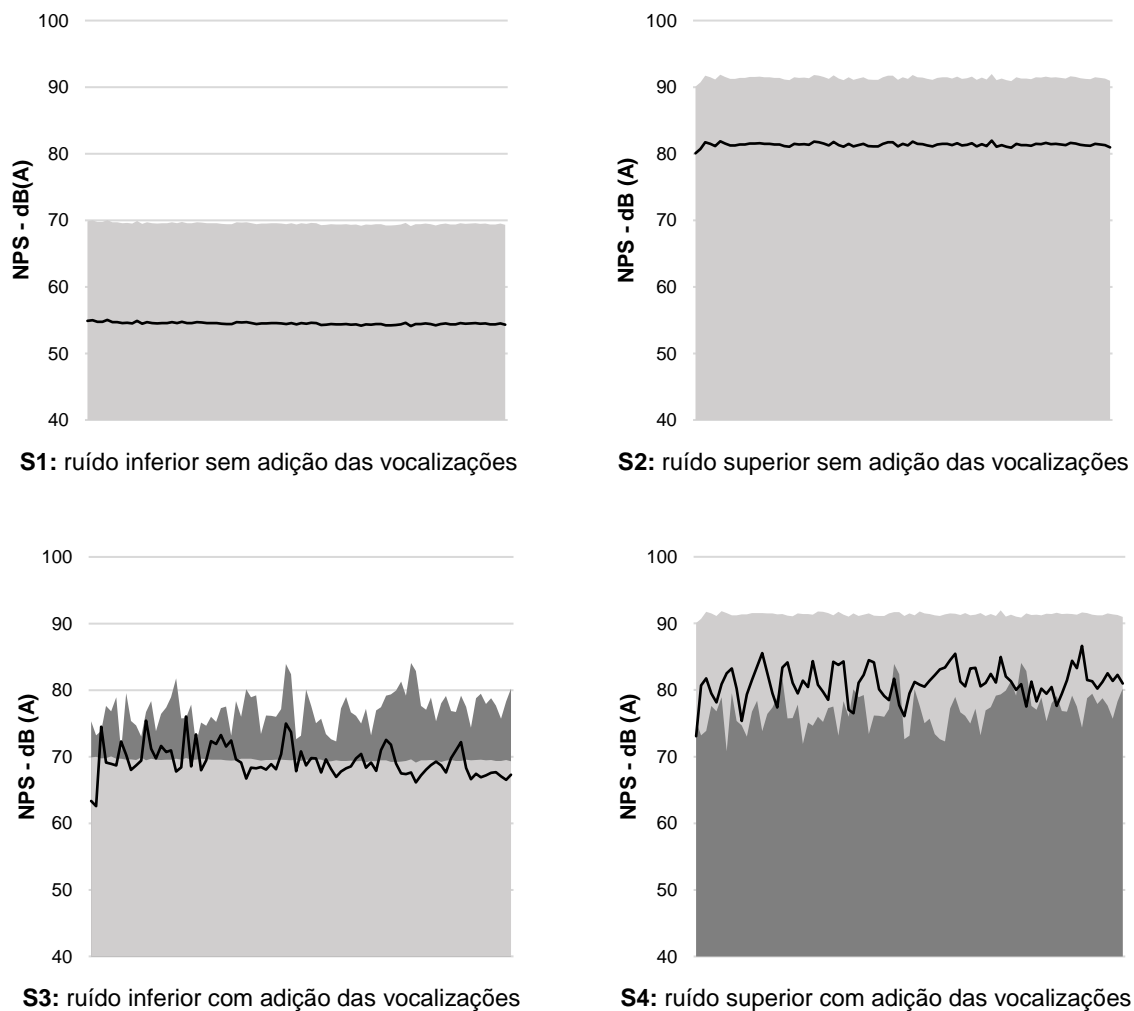
## Referências

CARVALHO, C.C.S. Avaliação ergonômica em operações do sistema produtivo de carnes de frango. 2009. **Tese de doutorado** apresentada a Universidade Federal de Viçosa para obtenção do título em Doutor em Ciências, Viçosa - MG, p. 163, 2009.

NBR 10.152. Avaliação do ruído em áreas habitadas, visando o conforto da comunidade – Procedimento. **ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 4, 2000.

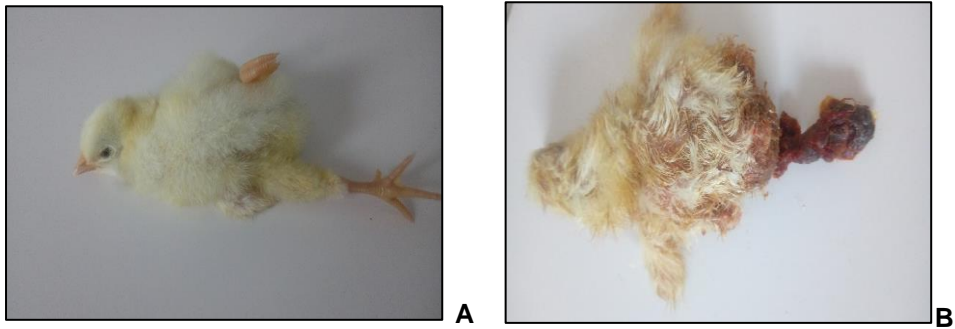
R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em 2016.

## ANEXO B – Caracterização do nível de pressão sonora dos estímulos sonoros aplicados como tratamentos nas incubações









**Figura 34.** Caracterização do nível de pressão sonora dos tratamentos de incubação S1, S2, S3 e S4. As linhas finas indicam os valores de NPS obtidos na câmara de ar dos ovos com o sensor miniaturizado

**ANEXO C – Metodologia empregada para avaliação da qualidade dos pintos**



**Figura 35.** Exemplos de anomalias que caracterizaram os pintos como descarte (PD; %): membros comprometidos (A); vísceras expostas (B)

		
<b>Escore 1</b>	<b>Escore 2</b>	<b>Escore 3</b>
umbigos totalmente fechados, secos e sem resíduos	umbigos com qualidade média (resíduos de fio preto ou botão menor que 0,5 cm)	umbigos de baixa qualidade (botões superiores a 0,5 cm ou abertos)
<b>A</b>		
		
<b>Escore 1</b>	<b>Escore 2</b>	<b>Escore 3</b>
jarretes normais sem vermelhidão na pele	jarretes vermelhos, mas sem lesão na pele	jarretes vermelhos com lesão de pele
<b>B</b>		

**Figura 36.** Escores da avaliação da qualidade do umbigo – QU (A); escores de avaliação da qualidade dos jarretes - QJ (B)