

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA  
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE  
ORIGEM ANIMAL

MARIZA DINAH MANES BRANDÃO

EFEITO DA ARMAZENAGEM NA QUALIDADE DE OVOS,  
COM E SEM ANORMALIDADES DO ÁPICE DA CASCA,  
PRODUZIDOS POR GALINHAS NATURALMENTE  
INFECTADAS POR *Mycoplasma synoviae*

Niterói, RJ  
2011

UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA

MARIZA DINAH MANES BRANDÃO

EFEITO DA ARMAZENAGEM NA QUALIDADE DE OVOS, COM E SEM  
ANORMALIDADES DO ÁPICE DA CASCA, PRODUZIDOS POR GALINHAS  
NATURALMENTE INFECTADAS POR *Mycoplasma synoviae*

Niterói, RJ

2014

MARIZA DINAH MANES BRANDÃO

EFEITO DA ARMAZENAGEM NA QUALIDADE DE OVOS, COM E SEM  
ANORMALIDADES DO ÁPICE DA CASCA, PRODUZIDOS POR GALINHAS  
NATURALMENTE INFECTADAS POR *Mycoplasma synoviae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virginia Léo de Almeida Pereira

Co-orientador:

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento

Niterói, RJ

2014

MARIZA DINAH MANES BRANDÃO

EFEITO DA ARMAZENAGEM NA QUALIDADE DE OVOS, COM E SEM  
ANORMALIDADES DO ÁPICE DA CASCA, PRODUZIDOS POR GALINHAS  
NATURALMENTE INFECTADAS POR *Mycoplasma synoviae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virginia Léo de Almeida Pereira – MSV/UFF

---

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – MSV/UFF

---

Dr.<sup>a</sup> Nilce Maria Soares – UPD-Bastos/Instituto Biológico

Niterói, RJ

2014

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Hélio Brandão e Rosângela Manes, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando ao longo da minha vida acadêmica;

Ao meu querido noivo e grande incentivador, Felipe Faccini, que esteve ao meu lado em todos os momentos, inclusive os difíceis na realização deste trabalho;

A minha nova família, Jane Faccini e José Carlos dos Santos, que me acolheram, sempre torcendo por mim e especialmente por terem viajado 2.000 Km para me auxiliar na coleta dos ovos para a dissertação;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virginia Léo de Almeida Pereira pela orientação sempre presente, conselhos e aprendizados;

A Dr.<sup>a</sup>. Nilce Maria Soares pelo apoio e cooperação técnica durante o experimento;

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento, pela co-orientação, pela colaboração com seus bons e indispensáveis ensinamentos;

Aos meus colaboradores imprescindíveis, durante as coletas: Mariane Verinaud Soares e Leandro Machado;

Aos amigos do laboratório de Sanidade Avícola, Juliana Oliveira, Raquel Gouvêa, Lídia Marques, Thiago Faria, Wanda Meira, Dani Sabroza José, à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dayse Abreu e à Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Figueira Silva pela colaboração, apoio e amizade;

Aos proprietários e funcionários da granja em que foram realizadas as coletas;

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O *Mycoplasma synoviae* (MS) tem sido relacionado a problemas específicos na casca de ovos, como Anormalidades no Ápice da Casca (“Eggshell Apex Abnormalities” - EAA) de ovos. Todos os estudos relacionados à EAA realizados até o momento buscaram elucidar a etiologia e epidemiologia da lesão, no entanto, poucos dados existem sobre a qualidade dos ovos com EAA sob o ponto de vista comercial, principalmente durante o armazenamento. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a qualidade interna e externa de ovos comerciais, com e sem EAA armazenados em temperatura e umidade controladas, durante a estocagem por 28 dias. As variáveis analisadas foram: perda de peso ao longo do armazenamento, espessura, resistência e peso e porcentagem da casca e Unidade Haugh (UH). Foram coletados ovos de poedeiras brancas, de várias idades, em uma granja avícola, em Bastos, São Paulo, Brasil. Foram utilizados 232 ovos no verão e 400 ovos no inverno, sendo a metade deles com EAA e a outra metade considerados ovos normais, em cada uma das duas estações do ano estudadas. Foram analisados ovos aos 02, 07, 14, 21 e 28 dias após a postura. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) na média do peso entre os ovos em todos os períodos de análise, mas em ambas as estações a perda de peso dos ovos com EAA foi aproximadamente 40% maior do que a perda nos normais aos 28 dias de armazenamento. As perdas dos valores de UH entre a primeira e última análise foram próximas de 40%, independente do tipo de ovo ou estação. No verão o ápice da casca de ovos com EAA foi menos espesso ( $p<0,0001$ ) do que nos ovos normais, mas no inverno o ápice da casca dos EAA ( $p<0,0001$ ) e a lateral ( $p=0,03$ ) foram mais finos que na casca dos ovos normais. A Presença de EAA em ovos não afetou o peso da casca ( $p>0,05$ ) e nem a porcentagem da casca ( $p>0,05$ ). A resistência da casca de ovos de EAA foi inferior ( $p<0,0001$ ) a dos ovos normais, sendo 16,57 % no verão e 19,86 % no inverno.

**Palavras-chave:** *Mycoplasma synoviae*, resistência da casca, peso do ovo, espessura de casca

## ABSTRACT

*Mycoplasma synoviae* infection of hens has been associated to problems on eggshell quality, being called as Eggshell Apex Abnormalities (EAA). Previous studies investigating EAA addressed the epidemiology and etiology of the lesion, therefore, little is known about the quality of EAA eggs under the commercial aspects, especially during its storage. The objective of this study was to access differences between EAA and normal eggs comparing internal and external quality parameters during storage under controlled conditions for 28 days. It was analyzed the following variables during storage: weight loss of eggs, thickness, strength, weight and percentage of shell and Haugh Unit (HU). The eggs were collected, from layers hens of various ages, in a poultry farm in Bastos, São Paulo, Brazil. It was collected 232 eggs in summer and 400 eggs in winter, being half of them with EAA and the other half considered normal, in each of the two seasons of year studied. The eggs were analyzed at 02, 07, 14, 21 and 28 days after lay. There was no difference ( $p>0.05$ ) in the average egg weight of EAA and normal eggs in all the days studied, but in both seasons the weight loss in EAA eggs were approximately 40% higher than normal eggs at 28 days of storage. The losses in HU scores from the first to the last measurement were close to 40% regardless of egg type or season of production. In the comparison of eggshell thickness, in the summer the apex of EAA eggs was thinner ( $p<0.0001$ ) than normal eggs, but in the winter for the EAA apex ( $p<0.0001$ ) and side ( $p=0.03$ ) were thinner. The presence of EAA in eggs did not affect the eggshell weight ( $p>0.05$ ) or eggshell percentage ( $p>0.05$ ). The eggshell strength of EAA eggs was lower ( $p<0.0001$ ) than normal eggs, being 16.57% in the summer and 19.86% in the winter.

**Keywords:** *Mycoplasma synoviae*, eggshell strength, egg weight, eggshell thickness

## SUMÁRIO

**RESUMO**, p. 5

**ABSTRACT**, p. 6

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**, p. 9

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**, p. 10

**1 INTRODUÇÃO**, p. 11

**2 REVISAO DE LITERATURA**, p. 13

2.1 **PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE OVOS**, p. 13

2.2 **DEFINIÇÃO, FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO OVO**, p. 14

2.2.1 **Formação e estrutura do ovo**, p. 14

2.2.1.1 Casca, p. 15

2.2.1.2 Albume, p. 18

2.2.1.3 Gema, p. 18

2.3 **QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS**, p. 19

2.3.1 **Qualidade externa de ovos comerciais**, p. 20

2.3.1.1 Peso de ovos, p. 20

2.3.1.2 Qualidade de casca, p. 21

2.3.1.2.1 *Resistência de casca*, p. 23

2.3.1.2.2 *Espessura de casca*, p. 24

2.3.1.2.3 *Porcentagem de casca*, p. 25

2.3.2 **Qualidade Interna de ovos**, p. 26

2.3.2.1 Unidade Haugh, p. 27

2.4 **FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE INTERNA DE OVOS**, p. 28

2.4.1 **Armazenamento de ovos comerciais**, p. 28

2.5 **FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE EXTERNA DE OVOS**, p. 30

2.5.1 **Idade da ave**, p. 31

2.5.2 **Manejo nutricional**, p. 32

2.5.3 **Estresse térmico**, p. 32



2.5.4 Anormalidades no ápice da casca (“Eggshell Apex Abnormalities” – EAA), p. 34
3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 38
3.1 COLETA DO MATERIAL, p. 38
3.1.2 Seleção dos ovos, p. 38
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS, p. 39
3.2.1 Avaliação do estado sanitário das granjas para <i>Mycoplasma synoviae</i> e Bronquite Infecciosa das Galinhas, p. 39
3.3 ANÁLISE DE QUALIDADE EXTERNA E INTERNA DOS OVOS, p. 40
3.3.1 Análise da qualidade externa dos ovos, p. 41
3.3.1.1 Pesagem, p. 41
3.3.1.2 Resistência de casca, p. 42
3.3.1.3 Peso e porcentagem da casca , p. 42
3.3.1.4 Espessura de casca, p. 42
3.3.2 Análise da qualidade interna dos ovos, p. 42
3.3.2.1 Unidade Haugh, p. 42
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 44
5 CONCLUSÃO, p. 52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 53
7 APÊNDICE, p. 63

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** Seleção de ovos com anormalidade durante ovoscopia, p. 39

**Figura 2** Ovo com translucência aumentada em região bem delimitada no ápice da casca, p. 39

**Figura 3** Ovos normais e com Anormalidade no Ápice da Casca (EAA) armazenados em sala com temperatura e umidade controladas no período do verão, p. 41

**Figura 4** Ovo em prato plano para análise digital da altura do albume pelo equipamento Digital Egg Tester, p. 43

**Tabela 1** Médias de peso de ovos comerciais de galinha normais e com Anormalidades no Ápice da Casca durante 28 dias de armazenamento no verão e no inverno, p. 44

**Figura 5** Médias de perda de peso durante estocagem de ovos normais no verão (NV = ○) e no inverno (NI = ●), e ovos com Anormalidades no Ápice da Casca no verão (EAAV = □) e no inverno (EAAI = ■). Linhas de regressão polinomial estão representadas (NV = ---; NI = ---; EAAV = -●-●-; EAAI = ●●●), p. 45

**Tabela 2** Médias dos valores de espessura da casca, peso de casca e resistência de casca de ovos comerciais de galinha normais e com Anormalidades no Ápice da Casca no verão e no inverno, p. 48

**Tabela 3** Médias de Unidade Haugh (UH) e perda de UH dos ovos comerciais normais e com Anormalidades no Ápice da Casca ("Eggshell Apex Abnormalities"-EAA) durante 28 dias de armazenamento no verão e no inverno, p. 50

**Figura 6** Médias dos valores de Unidades Haugh (UH) em cada dia de análise para ovos normais no verão (NV = ○) e inverno (NI = ●), e para ovos com Anormalidades no Ápice da Casca (EAA) no verão (EAAV = □) e inverno (EAAI = ■). Linhas de regressão polinomial estão representadas (NV = ---; NI = ---; EAAV = -●-●-; EAAI = ●●●), p. 51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BIG	Bronquite Infecciosa das Galinhas
Ca	Cálcio
CaCo <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Carbonato
°C	Grau Celsius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de Variação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAA	“Eggshell Apex Abnormalities”
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
GM	Média geométrica
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion bicarbonato
IEC	<i>International Egg Commission</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
N	Newton
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P	Fósforo
pH	potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UBA	União Brasileira de Avicultura
UE	União Européia
UH	Unidade Haugh
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
ZCT	Zona de Conforto Térmico
Zn	Zinco

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura de postura brasileira tem evoluído muito nos últimos anos, ocupando a sétima posição entre as dez maiores produções mundiais de ovos comerciais. Entretanto, as exportações e o consumo *per capita* brasileiro, apesar de estarem aumentando, ainda são muito baixos quando comparados aos dos maiores produtores (FAO, 2012).

Para garantir os crescentes volumes de produção, assim como a qualidade do produto, exigida pelo consumidor, é necessário garantir alimentação, manejo e sanidade adequados às aves.

A avaliação da qualidade de ovo é dividida em parâmetros de qualidade externa, como o percentual, limpeza, espessura e resistência da casca; e qualidade interna, como Unidade Haugh (UH), tamanho da câmara de ar, coloração e índice da gema, manchas no albume e na gema e pH (STADELMAN, 1994; COUTTS; WILSON, 2007). A qualidade externa ou da casca é de grande importância desde o produtor até o consumidor, pois essa embalagem natural do ovo é garantia da qualidade interna. A principal perda econômica ocorre devido à má qualidade de casca (SOLOMON, 1997) e é influenciada por outros fatores além dos infecciosos, como genética, dieta, idade da ave, condições de ambientação (COUTTS; WILSON, 2007). Além disso, a perda de umidade pelos ovos ao longo da estocagem pode ser aumentada pela má qualidade de sua casca (PEEBLES, MCDANIEL, 2004).

No período de armazenamento dos ovos, a temperatura e a umidade relativa do ar são fatores que afetam a qualidade interna dos ovos, sendo as características do albume e da gema do ovo, os atributos utilizados para avaliação da qualidade interna e perda de peso. (ALLEONI; ANTUNES, 2001). A queda na qualidade interna, durante um armazenamento prolongado afeta as propriedades funcionais dos ovos, como a coagulação do albume e da gema, formação da espuma pelo albume e a emulsificação da gema, fatores nutricionais e o sabor e a cor conferidas ao alimento preparado com ovos (MANO et al., 2002).

A presença de distúrbios fisiológicos, como o estresse térmico, ou lesão nos tecidos do sistema reprodutivo das galinhas pode prejudicar a formação do ovo, comprometendo a qualidade externa e interna. Entre as doenças aviárias que

podem causar impactos diretos sobre a produção e a qualidade dos ovos, estão as Micoplamoses, Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), Doença de Newcastle, Síndrome da Queda de Postura e indiretamente outras doenças que acarretam diminuição no consumo de ração e conseqüentemente, na absorção de nutrientes (SESTI; ITO, 2009).

O *Mycoplasma synoviae* (MS) atualmente tem sido relacionado a problemas específicos na casca de ovos, como Anormalidades no Ápice da Casca (“Eggshell Apex Abnormalities” - EAA) de ovos de galinha, quando até então era descrito apenas como agente causador de problemas respiratórios e articulares nas aves (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). A EAA tem sido relacionada com a presença de MS no oviduto de poedeiras, resultando em produção de ovos com o ápice da casca fino, acarretando prejuízos econômicos pela maior susceptibilidade à ocorrência de quebras, além da queda na produção de ovos (FEBERWEE et al., 2009a). Há relatos também de redução do peso médio dos ovos, tendo como conseqüência a redução no número de ovos classificados como extra e grande (CATANIA et al., 2010; FEBERWEE; LANDMAN, 2008). Todos os estudos relacionados à EAA até o momento foram realizados para elucidar a etiologia e epidemiologia da doença, no entanto, poucos dados existem sobre a qualidade de ovos com EAA, principalmente durante o período de armazenamento.

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais, com e sem EAA armazenados em temperatura e umidade controladas, durante a estocagem por 28 dias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE OVOS

Os países que ocupam as sete primeiras posições no ranking da produção mundial de ovos são: China, Estados Unidos, Índia, Japão, México, Rússia e Brasil, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Desde 2007 houve uma grande evolução na avicultura de postura brasileira e o Brasil ocupa o sétimo lugar na produção mundial desde então, mas ainda está na 21ª posição no ranking mundial de consumo *per capita* (FAO, 2012).

A produção brasileira no ano de 2013 foi de 34,1 bilhões de ovos, concentrada principalmente na região sudeste, sendo os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo os maiores produtores com participação de 34,33%, 12,37% e 8,68%, respectivamente. Praticamente toda a produção nacional de ovos é comercializada no mercado interno e o mercado interno aquecido em 2013 favoreceu a evolução do setor. O volume de exportações no Brasil é considerado baixo, com apenas 1% da produção é destinada para exportação (UBABEF, 2013).

O consumo nacional está em expansão. Em 2012, o consumo foi de 168,7 ovos/habitante/ano, mas ainda pode ser considerado baixo quando comparado com a média mundial que foi de 210 ovos/habitante/ano ou ao consumo de países como o México, que é o campeão mundial em consumo de ovos com média per capita de 360 unidades, seguido pelo Japão (347) e China (310) (UBABEF, 2013).

Em 1996 foi criado pelo *International Egg Commission* (IEC) o Dia Mundial do Ovo (*World Egg Day*) que tem como finalidade destacar e celebrar o produto como um dos mais nutritivos e versáteis alimentos. No Brasil, o Instituto Ovos Brasil, foi criado em 2007, tendo como objetivo principal promover o produto “ovo” como um alimento saudável, de alto valor nutritivo, além de esclarecer a sociedade sobre a segurança alimentar deste produto. Hoje, suas ações são disseminadas para todas as regiões do país (INSTITUTO OVOS BRASIL, 2012). Essas instituições contribuem para que o consumo aumente nos próximos anos. Para atender as exigências do consumidor há a necessidade de contínua implementação de programas que garantam elevado padrão de qualidade dos ovos e dos produtos à base de ovo.

## 2.2 DEFINIÇÃO, FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO OVO

O ovo é uma estrutura composta por gema, albume e casca e possui em sua estrutura química proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos, sendo assim um alimento de alto valor nutricional. O ovo possui esses nutrientes para suprir a necessidade do crescimento embrionário e fetal, além da presença das membranas da casca e a própria casca que protegem o embrião do ambiente externo, pois as aves são ovovivíparas (OLIVEIRA, 2006).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), a designação “ovo” refere-se a ovos de galinha em casca, sendo os ovos comerciais de outras espécies de aves acompanhados da indicação da espécie que procedem (BRASIL, 1997). A classificação dos ovos é realizada em grupos, classes e tipos, segundo a coloração da casca, qualidade e peso.

### 2.2.1 Formação e estrutura do ovo

O aparelho genital feminino das galinhas é composto por ovário e oviduto, sendo apenas o lado esquerdo desenvolvido e ativo. O oviduto é subdividido em cinco regiões funcionais. A partir do final do ovário, encontram-se, o infundíbulo e na sequência, magno, istmo, útero (glândula da casca) e vagina.

O ovário é constituído por vários folículos variando de pequenos, pouco desenvolvidos, até maiores, capazes de ovular. O desenvolvimento do ovário ocorre pelo aumento da produção de hormônios androgênicos e estrogênicos. Os hormônios esteróides também são produzidos no ovário, sendo uma de suas principais funções. Estes hormônios são essenciais para o desenvolvimento e função do trato reprodutivo da ave. A progesterona é o hormônio responsável pela secreção do albume. Os estrogênios induzem a síntese de lipídeos para a gema no fígado e são responsáveis pela mobilização de cálcio do osso medular para a formação da casca.

O infundíbulo é aglandular, exceto na região que ocorre transição gradual para as glândulas do magno. A sua função é englobar a gema liberada, durante a

ovulação. Membranas constituídas de mucina são produzidas no infundíbulo as quais, junto com as proteínas secretadas pelo magno, formarão a calaza que mantém a gema centralizada no ovo.

A gema então, passa do infundíbulo para o magno o qual, possui a função de secretar as proteínas do albume. Esta porção do oviduto é a mais longa. Sua mucosa é rica em glândulas tubulares e após 3 horas ocorre a formação do albume, composto por mais de 40 tipos de proteínas. A próxima porção do oviduto está separada do magno por uma faixa não glandular perceptível a olho nú, o istmo. Nesta porção ocorre a secreção das membranas da casca compostas por uma rede de fibras protéicas, chamadas de membranas interna e externa. Além dessa secreção, ocorre também no istmo, a adição de proteínas ao albume e uma pequena quantidade de água.

A produção da casca é a última etapa da formação do ovo. Para a formação da casca, o ovo permanece na glândula da casca por 18 a 20 horas. A calcificação no início do processo é lenta, ocorrendo mais ativamente nas últimas 15 horas. O ovo na luz uterina absorve água, sais e glicose e vai aumentando de tamanho, acarretando em distensão da parede do útero, sendo esse, o estímulo para a fase de calcificação rápida (MACARI; MENDES, 2005).

#### 2.2.1.1 Casca

A casca possui a função de proteger o ovo contra danos, contaminação microbiana e de troca de gases para o embrião em crescimento. Fatores como nutrição, balanço adequado de nutrientes da ração; a saúde e idade das aves; manejo e condições ambientais da granja são responsáveis pela qualidade de casca (NEOSPARK, 2012).

A casca é constituída em 96% por parte mineral, sendo 94% de carbonato de cálcio; 1% de carbonato de magnésio; 1% de fosfato de cálcio e 4% de uma matriz orgânica que é composta por proteínas (STADELMAN; COTTERILL, 1994). Somente o cálcio é responsável por cerca de 38% do peso da casca e o fósforo é depositado no período final de formação do ovo (NYS et al., 1999).

Estudos sobre a qualidade de casca podem ser realizados através da análise da ultraestrutura da casca dos ovos utilizando o Microscópio Eletrônico de



Varredura (MEV). Com esta ferramenta, foi possível visualizar seis camadas na estrutura da casca de ovos. São elas: membranas da casca (interna e externa), camada mamilar, camada paliçada, camada de cristal vertical e cutícula. A matriz orgânica é formada por membranas da casca, núcleos mamilares, matriz da casca e cutícula. Já a parte inorgânica da casca consiste em cristais de carbonato de cálcio, normalmente, sob a forma de calcita, aragonita e vaterita, que são três formas de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), que é o principal formador da casca (ROBERTS, 2004; ROBERTS, 2010). Os minerais fósforo e magnésio são encontrados em pequenas quantidades, além de traços de sódio, potássio, ferro, zinco, manganês e cobre (NASCIMENTO; SALLE, 2003).

Para que ocorra a calcificação é preciso concentrações adequadas de íons cálcio no útero e presença de íons carbonato suficientes para a formação de cristais de  $\text{CaCO}_3$ . Nesta etapa, ocorre a deposição de aproximadamente 2g de cálcio no ovo. Os cristais de  $\text{CaCO}_3$  são depositados sobre a membrana externa da casca, especificamente na região chamada de núcleos mamilares. À medida que ocorre a calcificação, mais  $\text{CaCO}_3$  é depositado, formando assim, o corpo principal da casca, a camada paliçada (SWENSON; REECE, 1993; MACARI; MENDES, 2005).

A camada mamilar é formada por múltiplas estruturas em forma de cone, os núcleos mamilares e está situada, após a membrana externa da casca. Microesferas de calcita crescem a partir de centros de cristalização, que são sítios mamilares de nucleação. No centro de cada sítio há uma pequena massa proteica ligada a membrana externa da casca. A partir destes sítios, cristais de calcita crescem radialmente em todas as direções, inserindo-se nas fibras da membrana e, assim, ligam firmemente a parte calcificada da casca às membranas. Os cristais de calcita continuam se formando, originando a camada de núcleos mamilares e a precipitação subsequente forma a camada paliçada, que são colunas de cristais perpendiculares à superfície da casca, finalizando com a deposição cristais superficiais, que possuem orientação vertical e a cutícula (NASCIMENTO; SALLES, 2003). A camada paliçada consiste em alongamentos verticais, justapostos à camada mamilar, sendo a mais espessa. A camada de cristais verticais é uma estreita coluna verticalmente orientada acima da camada paliçada (SOLOMON, 1997; ROBERTS, 2004). Os espaços entre algumas colunas da camada em paliçada dão origem na superfície externa da casca, os poros, os quais permitem trocas gasosas entre o ovo e o

ambiente externo. De acordo com Romanoff e Romanoff (1949), durante a calcificação da casca, ocorre a formação dos poros que correspondem áreas de cristalização incompleta. Os poros funcionam como um mecanismo de comunicação física entre o ovo e o ambiente externo, para ocorrer trocas gasosas de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e vapor de água, por difusão passiva.

A maior fonte de cálcio para a formação da casca é oriunda da alimentação da ave. Na dieta das poedeiras, o mineral cálcio, seguido do fósforo e o sensível balanço eletrolítico, são de grande importância para a manutenção da homeostasia desses minerais e, conseqüentemente, para a integridade da casca produzida, além da reabsorção do osso medular (ARAÚJO et al., 2008). Os íons carbonato ( $\text{CO}_3$ ) e o  $\text{CO}_2$  são produtos do metabolismo da ave e passam para a mucosa da glândula da casca por difusão pelo sangue ou pela própria respiração celular da mucosa, principal fonte do  $\text{CO}_2$ . Na mucosa da glândula da casca encontra-se a enzima anidrase carbônica, que promove a hidratação do  $\text{CO}_2$  transformando-o em ácido carbônico (BAIÃO e LÚCIO, 2005). Ainda na mucosa, a formação dos íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) é resultado da dissociação do ácido carbônico. Os íons carbonato e o cálcio passam da mucosa, para o lúmen da glândula da casca. No lúmen, os íons  $\text{CO}_3$  são oriundos dos íons  $\text{HCO}_3^-$  e finalmente aqueles se ligam ao cálcio para a formação do  $\text{CaCO}_3$ . (BAIÃO; LÚCIO, 2005; MACARI; MENDES, 2005).

Segundo Persson (2009), a enzima anidrase carbônica possui grande importância no processo de formação da casca de ovos. Macari e Mendes (2005) relataram que há diminuição da qualidade de casca, devido à inibição da anidrase carbônica. O zinco é cofator dessa enzima e qualquer diminuição desse mineral pode interferir na atividade enzimática (BAIAO; CANÇADO, 1997). A inibição desta enzima reduz a secreção de íons dióxido de carbono e conseqüentemente influencia, de forma negativa na produção da casca, por exemplo, no peso da casca (NYS et al., 2001).

A formação da casca é, então, um processo dependente de vários fatores, como: escolha da linhagem da poedeira, ração balanceada, condições ambientais e de manejo que favoreçam a formação de uma casca de boa qualidade. O trato digestório é a principal via de absorção do cálcio oriundo da alimentação. O cálcio para a formação da casca proveniente da reabsorção óssea e absorção intestinal é

transportado através do sangue até o lúmen da glândula da casca. O rim é responsável pela regulação plasmática do cálcio, sendo tamponado por cálcio de reserva, principalmente óssea. (CHANG et al., 2008).

No final da formação da casca ocorre deposição de pigmentos e de uma camada orgânica não calcificada na superfície do ovo, chamada de cutícula. Esta possui função de proteção contra a entrada de microrganismos e regulação da perda de umidade e gases para o ambiente externo.

Na parte mais larga do ovo, as membranas se separam logo após a oviposição pela diminuição da temperatura do ovo, formando a câmara de ar. A câmara de ar é um espaço formado dentro do ovo que permite trocas gasosas entre o embrião e o ambiente (MACARI; MENDES, 2005).

#### 2.2.1.2 Albume

A estrutura do albume é composta por uma camada líquida que envolve a gema, uma camada intermediária densa, e uma camada externa próxima à casca (STADELMAN; COTERILL, 1994). De toda a água, presente no ovo, 88% está nesta parte. O albume é uma solução de proteínas e a ovomucina está presente em 54% do conteúdo total. Estão ainda presentes a ovalbumina, conalbumina, ovomucoide, lisozima, globulina e avidina. Há somente cerca de 1% de carboidratos no albume e o conteúdo de lipídios é de 0,1 a 0,2% (ORDÓNEZ, 2005). A sua função é de absorver impacto, protegendo a gema, e como fonte de nutrientes (STADELMAN; COTTERILL, 1994).

O albume representa 58% do peso total do ovo, e como a maior parte da água presente no ovo está armazenada no albume, a perda de umidade que ocorre ao longo do armazenamento afetará o peso do ovo durante a estocagem. Em condições de baixa umidade, a perda de peso será maior devido a uma maior diferença entre as pressões de vapor de água entre o ovo e ambiente (ALLEONI; ANTUNES, 2001).

#### 2.2.1.3 Gema

A gema compreende 30 a 33% do peso total do ovo. Segundo Stadelman e Cotterill (1995) é um sistema complexo contendo uma variedade de partículas suspensas, como lipoproteínas em uma solução de proteínas. É uma grande reserva de elementos nutritivos, sendo a principal fonte de alimentos para o embrião. Sua estrutura consiste em: látebra, disco germinativo e camadas concêntricas claras e escuras, envolvidas pela membrana vitelina. A gema é envolvida pela membrana vitelina, formada por mucina de propriedades antibacterianas, é permeável e confere a forma esférica. O blastodisco é o ponto germinativo, contendo as informações genéticas. A látebra faz a conexão do blastodisco ao centro da gema, sendo a estrutura envolvida com o desenvolvimento do embrião. Na sua composição, estão proteínas (como a ovovitelina), lipídeos (triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol) e vitaminas.

A presença de lipídios permite a emulsão de outras substâncias, devido ao elevado conteúdo de fosfolipídios. A proteína vitelina associa-se a lipídios para formar a lipovitelina e a fosvitina. A gema é constituída de aproximadamente 65,5% de triglicerídeos, 28,3% de fosfolipídios e 5,2% de colesterol. A quantidade de carboidratos da gema é de cerca de 1,0%.

Quando um ovo fresco é quebrado em uma superfície plana, podemos visualizar a gema esférica, túrgida e situada centralmente, pois está mantida pelas calazas circundada pelo albume denso e delgado. A cor da gema é proporcionada por pigmentos presentes na dieta da galinha. Por exemplo, a coloração amarela é pelo consumo de ração, que contém carotenóides, como a xantofila, que estão presentes em alguns vegetais (GALOBART, 2004). A sua coloração é importante para a culinária por agregar ao alimento valor visual e varia conforme a quantidade de xantofila e carotenóides presentes na dieta da poedeira.

### 2.3 QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS

De acordo com a legislação brasileira as condições mínimas internas de qualidade do ovo são: gema translúcida, firme, consistente; albume transparente, consistente, límpido e sem manchas e tamanho da câmara de ar (BRASIL, 1997). Ou seja, um ovo considerado fresco apresenta albume límpido, transparente, consistente com as camadas densas e altas bem definidas e com pequena porção

mais fluida e a gema translúcida túrgida e localizada centralmente, circundada pelo albume denso e delgado e bem fixada pelas calazas (MURAKAMI et al., 1994). Em relação à qualidade externa são avaliados: limpeza, textura e formato da casca.

Na sala de classificação de ovos, é possível observar pela ovoscopia, as características de qualidade da casca e os parâmetros da qualidade interna em ovos inteiros, pela incidência de um foco de luz. Podem ser avaliados através deste exame: a textura da casca, o tamanho da câmara de ar, ovos trincados, falhas na calcificação e partículas de sangue. As partículas de sangue aparecem como resultado da ruptura de pequenos vasos enquanto o ovo está se formando.

Para uma boa qualidade de ovo, primeiramente, deve ser feita a escolha adequada da linhagem genética da galinha a ser criada. O principal aspecto da qualidade do produto fica a critério do manejo alimentar das aves destinadas à postura e finalmente em processo de postura, uma vez que sua nutrição está diretamente relacionada com a composição final do produto, o ovo (BERTECHINI, 2004). Outros aspectos, como a ambiência, estão diretamente relacionados para prover ao animal todas as condições de bem estar.

### **2.3.1 Qualidade externa de ovos comerciais**

#### **2.3.1.1 Peso de ovos**

A avaliação do peso do ovo, utilizada na tipificação dos ovos, não é indicador de qualidade nutricional e tem a finalidade de padronizar a comercialização. O ovo comercial é tipificado no Brasil como: jumbo (mínimo de 66g/unidade), extra (60 a 65g/unidade), grande (55 a 60g/unidade), médio (50 a 55g/unidade) e pequeno (45 a 50g/unidade) (BRASIL, 1991). Os ovos com pesos inferiores a 45g geralmente são destinados às indústrias panificadoras, por exemplo. Ovos com peso maior que 66g, também não serão destinados ao comércio, pois não cabem nas embalagens.

O peso do ovo sofre alteração de acordo com a idade da poedeira. Aves mais novas produzem ovos com menor peso quando comparados aos das mais velhas, (SCOTT; SILVERSIDES, 2000; ROBERTS, 2004; XAVIER et al., 2008). Em aves mais velhas ocorre aumento de até 20% no peso do ovo, porém não ocorre aumento proporcional no peso da casca, o que significa que todo cálcio utilizado para

formação da casca do ovo precisa ser distribuído por uma superfície maior nos ovos mais pesados.

A casca do ovo possui poros que são parcialmente selados pela cutícula, dificultando a penetração de bactérias, mas facilitando as trocas gasosas. Além disso, há passagem de vapor de água do albume para o meio externo, causando a perda de peso ao longo do tempo de armazenamento (STANDERMAN; COTTERILL, 1977). Este processo acontece de forma contínua, logo após a postura, e a velocidade dessas reações também é acelerada pelas temperaturas mais altas de estocagem, assim como pela baixa umidade (VÉRAS et al., 2000). Devido às reações químicas ocorridas no albume, ocorre a redução no seu peso, acarretando também a redução no peso do ovo (SCOTT; SILVERSIDES, 2000). Vérias et al. (2000) observaram que a perda de peso dos ovos aumentava, quanto maior era o tempo de armazenamento e a intensidade dessas perdas aumentava em função da temperatura e umidade do ambiente, onde os ovos eram armazenados. Para minimizar os efeitos da perda de peso decorrentes da perda de umidade, Standelman e Cotterill (1977) recomendaram a estocagem em umidade relativa controlada entre 75% a 80%. Alleoni e Antunes (2001) comparando a qualidade de ovos armazenados sob refrigeração e em temperatura ambiente observaram que em temperatura ambiente, houve maior perda de peso, do que os que foram armazenados sob refrigeração. Houve diminuição mais acentuada na altura do albume em ovos armazenados a 25 °C quando comparados àqueles armazenados a 8 °C.

#### 2.3.1.2 Qualidade de casca

A qualidade de casca é um aspecto muito importante da comercialização de ovos. O objetivo das avaliações de qualidade externa do ovo, ou seja, da casca, está relacionado principalmente com a sua resistência. Isso porque uma das principais perdas econômicas na produção de ovos é por quebras e rachaduras (SOLOMON, 1997). Assim, o ovo é considerado um produto frágil, pois a sua embalagem natural, a casca, pode ser quebrada nos diversos pontos de manipulação, da coleta até o consumidor final.

O ovo que possui uma boa qualidade de casca na classificação é aquele que se apresenta sem trincas e/ou quebras e com valores de espessura de casca acima de 0,33mm (SAMPLI et al., 2006). Para a obtenção de uma boa qualidade da casca, deve ser considerado um conjunto de fatores ao longo da vida de uma poedeira, começando pela linhagem, manejo nutricional com níveis adequados de cálcio e fósforo na ração; programa de vacinação, principalmente, para o controle de doenças que afetam a qualidade dos ovos, como a Síndrome da Queda de Postura, BIG, Doença de Newcastle, micoplasmose por MS entre outras (ITO, 2000); além do controle da temperatura ambiente (TOGASHI et al., 2009), pois, o conforto térmico é um dos fatores que influenciam a produção da casca de ovo.

A qualidade da casca também interfere na qualidade microbiológica do ovo. Os principais fatores que facilitam a penetração bacteriana no ovo são: a presença de trincas, o tempo de armazenamento e as condições de temperatura e umidade relativa do ar no ambiente de estocagem. Temperaturas elevadas favorecem a multiplicação bacteriana e o excesso de umidade predispõe a penetração de microorganismos no ovo (ITO, 1998; REU, 2006).

Para analisar a qualidade da casca do ovo, são realizados testes de resistência, espessura, porcentagem e peso da casca. A avaliação da qualidade de casca pode ser feita por métodos diretos e indiretos. Segundo Baião e Cançado (1997), a espessura de casca e a porcentagem de casca são definidas como métodos diretos. Segundo Lin et al. (2004), as medidas indiretas da força da casca são: densidade, espessura, porcentagem de casca, gravidade específica e deformação não destrutiva, que também é conhecida, como firmeza estática. A força e a deformação são utilizadas para calcular a firmeza estática, que medem a propriedade estrutural do ovo e a primeira pode ser usada para estimar a força requerida para quebrar a casca.

### 2.3.1.2.1 Resistência de casca

A análise da resistência de casca é um importante parâmetro de qualidade, pois ovos com casca de baixa resistência ficam sujeitos à quebra, o que acarreta prejuízos na comercialização. Esta avaliação sofre interferência do peso do ovo e da espessura de casca.

Um dos testes utilizados é o de compressão, que é do tipo destrutivo. O ovo é colocado longitudinalmente entre duas placas paralelas e comprimido, sendo a carga aumentada regularmente. A força e a deformação são registradas, e o resultado é fornecido em termos de força em Newton (N) necessária para romper a casca íntegra. Outros tipos de testes medem a força através do impacto e testes de perfuração (STADELMAN; COTTERILL, 1977; SOLOMON, 1997; RODRIGUEZ-NAVARRO, 2002). Os testes de compressão e impacto possuem a desvantagem de permitirem somente uma medida por ovo, enquanto que, nos testes de perfuração, mais de uma medida pode ser realizada. Nos testes de perfuração são utilizadas sondas com diâmetro de até 0,4 mm.

Com o avançar da idade, a força necessária para romper a casca também se altera. Já foi observado que a resistência é maior até as 42 semanas de idade, seguida de baixos valores de força para romper a casca a partir daí (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2002). Além da idade, outros fatores como a linhagem, a alimentação podem também, afetar a qualidade de casca.

A resistência da casca também é relacionada à temperatura do meio ambiente em que a poedeira vive. Devido ao estresse térmico, as aves consomem menos ração e por isso, a oferta de cálcio é menor, acarretando maior fragilidade na casca nos meses mais quentes do ano. Para tentar melhorar a produção nesses meses, deve ser realizada uma suplementação com os minerais envolvidos na formação da casca para a manutenção da sua integridade.

Segundo Romanoff e Romanoff (1949) a resistência da casca dos ovos possui uma relação direta com a sua espessura.



### 2.3.1.2.2 Espessura de casca

Samli et al. (2006) determinaram que ovos com valores de espessuras de casca maiores que 0,33 mm possuem maior resistência a danos físicos. Além disso, cascas mais espessas contribuem para preservação da qualidade interna, pois nos ovos com cascas de espessura maior ou igual a 0,33 mm, a perda de umidade e CO<sub>2</sub> para o ambiente é dificultada e com isso, não ocorrerá alteração do pH interno dos ovos reduzindo as reações químicas que degradam o albume ao longo do armazenamento (SOLOMON, 1997).

A resistência da casca é considerada como um método indireto, para avaliar a qualidade externa do ovo (KHATKAR et al., 1997). A avaliação da espessura da casca, em milímetros (mm), é feita com auxílio de um micrômetro digital, após a quebra do ovo, lavagem e secagem da casca. Foi observado que, em geral, as regiões do ápice, lateral e fundo da casca não apresentam a mesma espessura. Geralmente, o ápice apresenta-se com mais espesso, a lateral com valor menor e no fundo do ovo, valores intermediários (MACARI; MENDES, 2005). Porém, Sun et al. (2012) encontraram valores de espessura da lateral maiores, em relação tanto ao fundo, como o ápice.

A espessura de casca pode variar devido a vários fatores, como a linhagem da poedeira até o tempo de permanência na glândula da casca e a taxa de deposição de CaCO<sub>3</sub>, durante a formação da casca. Se o ovo passa um curto período, a espessura será menor (NEOSPARK, 2012).

O clima também interfere na qualidade de casca, pois em altas temperaturas, os níveis de cálcio e íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> do sangue são reduzidos, devido a alcalose respiratória, pois a ave em uma tentativa, de controlar a temperatura corporal, entra em ofegação, alterado o equil. Simultaneamente, o ambiente quente acarreta redução no consumo alimentar, determinando assim, diminuição na ingestão de cálcio, e nos limites da disponibilidade de cálcio, além de fósforo e vitamina D3, no sangue da galinha para a formação da casca de ovo.

Camerini (2012) observou que devido a exposição à altas temperaturas ambientais (32°C), levou a alterações no equilíbrio ácido básico de aves, provocando queda acentuada no valor médio da espessura de casca dos ovos. Barbosa Filho (2004) também observou diferença significativa quando comparou os ovos

produzidos em condição de conforto e estresse térmico, levando à produção de ovos com casca mais fina.

A idade da ave afeta a espessura de casca, sendo que as cascas mais finas aparecem depois de 10-12 meses de postura. Segundo Ketelaere et al. (2002), algumas linhagens de poedeiras possuem diferenças nos valores de espessura da casca com a idade e em outras, permanece constante.

Peebles e Brake (1985) observaram que a espessura de casca está relacionada também, ao excesso de porosidade na casca do ovo, o que, além de afetar a qualidade pelas modificações ocorridas por envelhecimento, também, favorece a deterioração por ação microbiana.

#### *2.3.1.2.3 Porcentagem de casca*

A porcentagem de casca é a relação entre o peso de casca e o peso de ovo. Segundo Solomon (1997), a porcentagem de casca corresponde a 8-12% do peso total, do ovo. Por exemplo, se há grande quantidade de fissuras na casca, maior será a perda de água para o ambiente externo, sendo menor o peso desse ovo e conseqüentemente, maior será a porcentagem de casca. Isso ocorre devido ao menor peso de casca nos ovos com fissura. Essa diminuição nos valores de peso é explicada pela maior perda de água e CO<sub>2</sub> no albume, através da fissura na casca (STADELMAN E COTTERILL, 1977).

Ramos et al. (2010) relataram que a porcentagem de casca é afetada pela idade da poedeira. Aves mais jovens apresentam maior porcentagem de casca em relação as mais velhas. Segundo Oliveira et al. (1992), a quantidade de cálcio depositado na casca permanece constante durante todo o ciclo de postura, porém, com o aumento da idade e, conseqüentemente, do tamanho do ovo, há uma menor quantidade de cálcio depositada por unidade de superfície, durante a formação da casca. O aumento do peso do ovo em aves mais velhas não é acompanhado pelo aumento proporcional do peso da casca, resultando em uma menor porcentagem de casca em relação ao peso do ovo. (ROBERTS, 2004).

O peso de casca não muda de acordo com a temperatura de estocagem, entretanto há uma interferência nos valores médios de porcentagem da casca. Figueiredo et al. (2011) observaram que ovos armazenados em temperatura

ambiente obtiveram maior porcentagem de casca quando comparado aos mantidos sob refrigeração. Este resultado é explicado, pela menor perda de peso dos ovos mantidos em refrigeração.

### 2.3.2 Qualidade Interna de ovos

Segundo Stadelman e Cotterill (1994), após a postura, naturalmente, inicia-se o declínio da qualidade interna do ovo. Os fatores que mais afetam a qualidade do albume são as condições de temperatura, umidade e o tempo de armazenamento dos ovos (ALLEONI; ANTUNES, 1991, STALDEMAN; COTTERILL, 1994). As perdas de CO<sub>2</sub> e de umidade para o ambiente ocorrem pelas modificações físico-químicas ocorridas no albume, que são aceleradas em altas temperaturas no ambiente.

A qualidade interna do ovo está diretamente relacionada com as características do albume e da gema. À medida que o ovo envelhece, ocorrem alterações na camada densa. A proporção de albume líquido aumenta, diminui a altura do mesmo, sendo o processo chamado de fluidificação do albume, que é um dos sinais visíveis da perda de qualidade interna.

Quanto maior for o período de armazenamento e menor a umidade do ambiente em relação a do interior do ovo, maior a perda de umidade e liberação de dióxido de carbono, através dos poros da casca. A perda de CO<sub>2</sub>, que é o produto da dissociação do ácido carbônico presente no albume, altera o sistema tampão com aumento do pH do albume, que em um ovo fresco é de aproximadamente 7,9. A alcalinidade leva a uma alteração na estrutura do gel do albume, com diminuição da viscosidade, tornando-o fluidificado e com alteração das propriedades organolépticas e tecnológicas do ovo (SCOTT; SILVERSIDES, 2000).

O pH do albume é o principal fator que modifica a qualidade interna do ovo, à medida que o ovo envelhece. Essa perda de CO<sub>2</sub> ocorre em qualquer método ou processo de conservação, mas é acelerada quando o armazenamento ocorre em temperatura elevada. A fluidificação ocorre pela aproximação do ponto isoelétrico das proteínas do albume com a elevação do pH, com isso menos água fica retida às proteínas, havendo a fluidificação do albume (CARBÓ, 1987). A importância, na qualidade do albume interfere na capacidade de formação de espuma e obtenção de emulsões adequadas para a indústria de processamento de alimentos, conferindo

boa qualidade sensorial. O pH da gema também sofre alteração, mas o aumento é menos acelerado que o ocorrido no albume. A gema de um ovo fresco apresenta valores próximos de 6,0 e com as alterações decorrentes do armazenamento podem chegar ao valor de 6,9 (ORDONEZ, 2005).

### 2.3.2.1 Unidade Haugh

A Unidade Haugh (UH) é um dos parâmetros mais considerados para expressar a qualidade interna dos ovos. Quanto maior o valor da UH, melhor será a qualidade dos ovos analisados. Como o período de armazenamento é um dos fatores que afeta a qualidade interna, acarretará também diminuição dos valores da UH (SCOTT; SILVERSIDES, 2000; CARVALHO et al., 2003). Assim, UH é considerada uma medida padrão de qualidade do albume para aferir também a qualidade interna do ovo durante o período de estocagem.

Haugh (1937) observou que a qualidade do ovo varia com o logaritmo da altura do albume espesso. Com isso, desenvolveu um fator de correção para o peso do ovo, que multiplicado pelo logaritmo da altura do albume espesso e corrigido por 100, resulta na UH. Ou seja, criou-se uma expressão matemática que correlaciona o peso do ovo com a altura do albumem espesso. Eisen et al. (1962) modificaram a fórmula para deixá-la mais simples e de cálculo mais rápido. O cálculo é feito a partir do peso do ovo quebrado em superfície plana e da altura do albume, utilizando a fórmula:  $UH = 100 \log (H + 7,57 - 1,7W^{0,37})$ , onde H é a altura do albume em milímetros, W é o peso do ovo em gramas, 7,57 = fator de correção para altura do albume e 1,7 = fator de correção para peso do ovo.

O *United States Department of Agriculture* (USDA) adota como padrão para a classificação dos ovos, os valores de UH. Ovos com UH superiores a 72 são classificados como AA; de 71 a 60, como A; de 59 a 30, como B; e valores iguais ou menores a 29, como C (Egg-Grading Manual, 2005).

A diminuição dos valores de UH pode ser explicada devido à fluidificação do albume que ocorre rapidamente nos primeiros dias após a postura. Alleoni e Antunes (2001) constataram que a UH diminuiu de  $83,66 \pm 5,72$  no dia da postura para  $41,71 \pm 4,01$  quando armazenados durante sete dias a uma temperatura de 25°C. Xavier et al. (2008) compararam o armazenamento em temperatura ambiente

e sob refrigeração e verificaram que a qualidade interna sofre influência tanto da temperatura quanto no tempo de armazenamento, ou seja, quanto maior for o período de armazenamento sem refrigeração, menor serão os valores de UH. Alleoni e Antunes (2001) observaram ainda que a partir da segunda semana de armazenamento, valores de UH para ovos armazenados em refrigeração apresentaram melhor qualidade interna por maior período de tempo quando comparados com ovos armazenados em temperatura ambiente.

Na análise de UH, a idade da galinha também deve ser considerada, pois foi observado que ovos de poedeiras novas apresentaram melhor qualidade interna do que os de poedeiras velhas (FIGUEIREDO et al., 2011).

## 2.4 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE INTERNA DE OVOS

### 2.4.1 Armazenamento de ovos comerciais

No Brasil, como não há legislação que exija a refrigeração dos ovos comerciais para venda em comércio, a maioria desse produto é acondicionada, desde os pontos comerciais até a distribuição final, em temperatura ambiente. A temperatura e a umidade relativa do ar são os fatores mais importantes, que afetam a qualidade dos ovos, durante o armazenamento (LEANDRO et al., 2005). Quanto maior for a temperatura e o tempo de estocagem, maior será a velocidade da perda de qualidade interna (SCOTT; SILVERSIDES, 2000; SANTOS, 2005).

De acordo com as normas de comercialização dos ovos na União Europeia (2008), a data de durabilidade mínima deve ser fixada em não mais de 28 dias após a postura. É recomendado também, que evite oscilações de temperaturas na câmara frigorífica, pois acarretam em perda de peso nos ovos, além de facilitar a penetração microbiana através dos poros da casca. No armazenamento para períodos longos, recomenda-se a utilização de temperaturas em torno de 0°C, sem atingir o ponto de congelamento e com umidade relativa do ar entre 70% a 80%. O principal método para a conservação de ovos é a refrigeração, porém a conservação em refrigeração nos pontos de venda torna-se inviável financeiramente.

A qualidade interna é perdida ao longo do armazenamento prolongado do ovo, devido às alterações ocorridas no albume e na gema (STADELMAN;

COTTERILL, 1995). A velocidade dessas alterações está relacionada com a temperatura ambiente. A umidade do ambiente de estocagem também interfere na qualidade do ovo. Quanto mais abaixo de 99,6% estiver à umidade relativa mais rapidamente o ovo perderá umidade, ocorrendo, assim, redução de peso e aumento da câmara de ar (SANTOS, 2005).

O albume do ovo fresco possui um pH de aproximadamente 7,8 e quando se torna velho, ocorre liberação de CO<sub>2</sub>, atingindo-se valores de pH de até 9,5 (ALLEONI; ANTUNES, 2001). O pH alcalino promove a sua liquefação, que é um sinal da perda da qualidade. Ao longo do armazenamento, então, o abúme clareia, perde a viscosidade e se torna alcalino. Esta alcalinização acarreta mudanças nas características físico-químicas, como a transformação do albume denso em líquido, devido à alteração no ponto isoelétrico de suas proteínas, resultando também, em alteração no sabor do ovo em decorrência do aumento da alcalinidade (MORENG; AVENS, 1990). Esta, por ser um processo bioquímico, é acelerada com o aumento da temperatura e está também, associado à destruição da calaza, o que ocorre após um longo período de estocagem (RUTZ et al., 2005).

De acordo com Solomon (1997) parte da umidade, produto da dissolução do ácido carbônico, além de ser perdida através dos poros, passa para a gema durante o período de armazenamento do ovo, devido a maior pressão osmótica da mesma. O excesso de água na gema ocasiona um aumento, levando a um enfraquecimento da membrana vitelínica (LEANDRO et al., 2005), fazendo com que a mesma pareça maior e achatada, quando quebrada em uma superfície plana. Portanto, o conteúdo em umidade pode variar, dependendo do tempo e condições de armazenamento. De acordo com Alleoni e Antunes (2001), com o aumento da temperatura de armazenamento há um movimento da água do albume, para a gema, o que proporciona o alargamento da mesma. Este movimento ocorre devido à elevada pressão osmótica da mesma e redução da pressão osmótica do albume durante o armazenamento. Um ovo considerado velho é aquele que ao ser quebrado, apresenta a gema flácida, frequentemente localizada em um lado, e circundada por uma área ampla de líquido (SOLOMON et al., 1997), resultante da dissociação do ácido carbônico, levando a fluidificação do albume, que é um dos sinais da perda da qualidade do ovo (CARBÓ, 1987).

A perda de umidade acarreta diminuição da altura do albume, conseqüentemente, os valores da UH diminuirão. A gema de ovos velhos é achatada e flácida, podendo ter manchas escuras. Neste caso, a sua membrana se rompe com facilidade, deixando escorrer o conteúdo, prejudicando sua utilização (SOLOMON, 1997). A altura do albume denso e o índice da gema são parâmetros de qualidade interna que possuem relação com a perda de peso. A evaporação é maior quanto maior a fluidificação do albume, o que leva a diminuição da altura do albume denso e, conseqüentemente, a um menor índice de gema (STADELMAN; COTTERILL, 1994).

Scott e Silversides (2000), após um experimento com ovos armazenados por diferentes períodos à temperatura de 20,2°C, concluíram que durante a estocagem o peso do albume diminuiu, causando uma diminuição no peso do ovo. Os pesos da gema e da casca não sofreram mudança com a estocagem. Segundo Stadelman; Cotterill (1994) e Fassenko et al. (1992) para minimizar a perda de peso de ovos, deve ser feito o armazenamento em umidade relativa entre 75 a 80. A temperatura recomendada, pela legislação vigente, para armazenamento do ovo fresco, está entre 8°C e 15°C com umidade relativa do ar entre 70 a 90% (BRASIL, 1990).

Segundo Oliveira et al. (2000), a validade máxima de ovo, armazenados em temperatura ambiente, sem a perda de sua qualidade interna, varia de quatro a quinze dias após a data de postura. À temperatura de geladeira (5°C) a perda de qualidade interna ocorre mais lentamente comparada com a armazenagem realizada em temperatura ambiente (25°C).

## 2.5 FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE EXTERNA DE OVOS

O estudo dos fatores que afetam a qualidade da casca de ovos é de grande importância para os produtores, pois na produção de ovos há grandes prejuízos econômicos, devido a trincas e quebras da casca (JARDIM FILHO et al., 2002). Este estudo vem sendo cada vez mais abordado, pois aproximadamente 6,7% dos ovos comerciais não vão para os pontos de venda, por não apresentarem casca, envoltos apenas com as membranas testáceas, trincados ou até mesmo quebrados. Outros 6,7% são quebrados durante a coleta, o processamento, a embalagem e o

transporte (HESTER, 1999). Segundo Coutts et al. (2007) 10 a 15% dos ovos comerciais são perdidos por apresentarem má qualidade de casca.

### 2.5.1 Idade da ave

Independente da linhagem, a qualidade interna e da casca tendem a piorar, com o avanço da idade da ave. Quando a ave chega à idade reprodutiva, há um aumento, no número das proteínas ligadoras de cálcio, na mucosa intestinal e a absorção do mesmo torna-se mais eficiente. À medida que a idade da ave aumenta, as características físicas dos ovos revelam mudanças estruturais que tornam a qualidade da casca inferior.

Barbosa et al. (2012) observaram que ovos de poedeiras novas apresentavam menor peso e número de poros, além de maiores valores de espessuras e de resistência das cascas, quando comparados com ovos de aves mais velhas. A quantidade de cálcio depositado na casca permanece constante durante todo o ciclo de postura, porém, com o aumento no tamanho do ovo, háverá menor quantidade de cálcio depositada por unidade de superfície e, conseqüentemente a piora na sua qualidade durante a formação da casca (OLIVEIRA, 1992).

A queda na qualidade de casca, em aves mais velhas, pode ser atribuída à redução da absorção intestinal de cálcio (MACARI E MENDES, 2005), pois a taxa de retenção deste íon em aves jovens é de 60%, enquanto nas mais velhas é de 40% (KESHAVARZ; NAKAJIMA, 1993), além do aumento do tamanho do ovo, citado anteriormente.

Segundo, Bar e Hurwitz (1987) o aumento da idade da ave afeta a qualidade da casca, devido à alteração na hidroxilação da vitamina D3 no fígado ou no rim, resultando em uma ineficiente absorção de cálcio e fósforo, para formação óssea e de casca. Segundo Nakajima (1993) a queda na qualidade da casca, com o aumento da idade, também é resultado da diminuição da absorção de cálcio intestinal e mobilização do cálcio ósseo. Segundo Macari e Mendes (2005), as aves mais velhas possuem menor atividade da anidrase carbônica, enzima fundamental na formação da casca do ovo. Segundo Roberts (2010) os valores mais baixos da



espessura da casca durante o ciclo de postura, explica o peso da casca com o avançar da idade.

### **2.5.2 Manejo nutricional**

A ração é a maior fonte de cálcio para a formação da casca do ovo pelas poedeiras.

A formação da casca é influenciada pelo tamanho da partícula de calcário, principal fonte de cálcio nas rações. Com o uso de calcário muito fino, o cálcio passará rapidamente pela moela e não estará disponível durante a formação da casca. Como esta formação ocorre durante a noite, quando as aves não estão comendo, o uso de partículas maiores acarreta em uma passagem mais lenta pelo trato gastrointestinal, deixando o cálcio disponível para formação da casca e conseqüentemente menor ocorrência de mobilização do cálcio ósseo pela ave (MACARI; MENDES, 2005).

A suplementação de microminerais influencia durante o processo de deposição de carbonato de cálcio na casca do ovo. O zinco, por exemplo, é um cofator da anidrase carbônica, enzima fundamental para o suprimento de íons carbonato durante a formação da casca. A inibição desta enzima reduz a secreção de íons carbonato e conseqüentemente acarretará em diminuição do peso da casca (NYS et al., 2001). Sua suplementação em aves em estresse térmico é capaz de aumentar o peso e reduzir os defeitos de casca (NYS et al., 2004). O manganês faz parte de um dos componentes da matriz orgânica da casca. A sua deficiência pode comprometer a formação da camada mamilar da casca, o que leva ao aumento da incidência de áreas translúcidas, na casca (BAIAO; CANÇADO, 1997). A proporção de cálcio para fósforo na dieta é de grande importância na ração, pois elevados níveis de fósforo pode interferir na absorção intestinal de cálcio, resultando assim, em reduzida qualidade da casca.

### **2.5.3 Estresse térmico**

As aves são animais homeotérmicos, ou seja, buscam manter a temperatura corporal relativamente constante, independente da temperatura ambiental. A

temperatura e umidade elevadas dificultam a troca de calor com o ambiente, aumentando a temperatura corporal interna levando ao desconforto térmico e queda na produtividade (BORGES et al., 2003). A temperatura de uma poedeira é em torno de 41°C (MACARI; MENDES, 2005), e a interna do aviário pode variar entre 15 a 28°C com umidade relativa do ar entre 40 a 80%, para promover um ambiente termoneutro (FERREIRA, 2005).

Silva et al. (2012) observaram que a produção de ovos à temperatura de 26°C, foi superior quando comparada à de 32°C. A 26°C as galinhas se encontravam na sua Zona de Conforto Térmico (ZCT). Em ambientes acima da ZTC, ocorre uma redução no consumo alimentar, aumentando o consumo hídrico, interferindo negativamente na digestão e absorção dos nutrientes consumidos, comprometendo a produção de ovos (FURLAN, 2006; NAKANO, 1979). Franco et al. (2007) observaram diferenças significativas no consumo de ração e conseqüentemente, na produção de ovos, espessura da casca e gravidade específica de ovos de aves com estresse térmico.

O estresse causado por altas temperaturas ambientais associadas a uma elevada umidade é um dos fatores que afeta a produção de ovos. Lin et al. (2002) observaram que poedeiras expostas ao estresse térmico apresentaram menor ingestão de ração, resultando em prejuízo tanto na produção, como no peso dos ovos.

Expostas às elevadas temperaturas, as aves tendem a diminuir o consumo de ração, deixando de ingerir elementos essenciais, como aqueles para a formação do  $\text{CaCO}_3$ , desequilibrando assim, a composição mineral durante a formação do ovo. A capacidade de converter a vitamina D3 em sua forma ativa também é reduzida durante o estresse térmico (FURLAN, 2006). Essa redução na ingestão de nutrientes, aliada à alcalose respiratória provocada pelo aumento da frequência respiratória para dissipar o calor, leva a alterações no equilíbrio ácido-básico do sangue, acarretando alterações bioquímicas no albúme e na gema que afetam a qualidade do ovo. O plasma sanguíneo torna-se alcalino e além de ter a concentração de cálcio no sangue afetada, a ave passa a excretar grande quantidade de bicarbonato pela urina, levando a uma competição direta entre os rins e a glândula da casca por bicarbonato de cálcio, que é o principal componente da casca (MILLER; SUNDE, 1975; FRANCO; SAKAMOTO, 2007). Conseqüentemente

haverá interferência na formação e na qualidade de casca, podendo resultar em ovos pequenos e de casca fina, levando a prejuízos econômicos aos produtores, pela má qualidade de casca, resultando em redução da resistência de casca.

Gama et al. (2008) afirmaram que o consumo hídrico está intimamente relacionado ao consumo de ração, ou seja, fatores que alteram o consumo de água indiretamente influenciam no consumo de ração. Gutierrez et al. (2009) observaram que após fornecerem água gelada às aves com estresse térmico, houve um aumento no consumo de ração e conseqüentemente na produção de ovos, além da melhora na qualidade da casca. Silva et al. (2012) observaram em que aves que consumiram água resfriada tiveram melhor produção de ovos quando comparadas às que não obtiveram água resfriada.

O calor causa também, redução na secreção de FSH e com isso, diminui o tamanho da gema. Em ambiente com temperatura elevada, ocorre um direcionamento do fluxo sanguíneo preferencialmente para a periferia, diminuindo assim, a irrigação dos órgãos, como a glândula da casca. Com isso, diminui a quantidade de cálcio, que chega à glândula da casca, e de aminoácidos transportados para o magno (MILLER; SUNDE, 1975; SWENSON; REECE, 1993).

#### **2.5.4 Anormalidades no ápice da casca (“Eggshell Apex Abnormalities” – EAA.)**

Uma alteração denominada Anormalidade no Ápice da Casca (“Eggshell Apex Abnormalities” - EAA) de ovos foi descrita em 2008, na Holanda, relacionada com a presença de *Mycoplasma synoviae* (MS) no oviduto das poedeiras. Essa alteração resultava na produção de ovos com casca fina com maior propensão à quebra e ao aparecimento de trincas na casca (FEBERWEE et al., 2009a). Até então, as perdas econômicas atribuídas à infecção por MS eram associadas principalmente à doença articular, sinovite e/ou à doença respiratória, aguda ou crônica, que provocavam queda na postura e na qualidade interna do ovo, na eficiência alimentar, aumento na mortalidade e alto custo com medicamentos e implantação dos programas de controle, além do efeito sinérgico quando associado a outras doenças (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

A casca mais fina no ovo favorece o aumento na incidência de quebras e ao aparecimento de trincas e pode favorecer a contaminação do produto por microrganismos deteriorantes e patogênicos. Feberwee et al. (2009a) realizaram estudos de campo e comprovaram a associação entre a infecção por MS com tropismo pelo oviduto e a consequente produção de ovos com EAA. Esta relação foi confirmada pela infecção experimental por MS em galinhas que produziram ovos com esta anormalidade. A proporção dos ovos afetados por esta alteração atingiu 25% na produção diária. Foi observado que lotes entre 30 e 75 semanas de idade produziram 5% dos ovos com EAA, com uma perda econômica média estimada de cerca de 3% da receita bruta no preço desses ovos (FEBERWEE; LANDMAN, 2009a).

Na Itália também foi relatada a ocorrência de ovos com esta alteração, sendo detectado que em lotes afetados por MS houve aproximadamente 1,3% a 1,8% de ovos com EAA, resultando em grande quantidade de ovos quebrados, além da redução da média do peso desses ovos (CATANIA et al., 2010). Na Inglaterra foi relatada a ocorrência dessa anormalidade, em galinhas caipiras, com uma queda de 5% na produção total de ovos. Foi confirmada a presença de MS, concomitante com BIG. No Brasil também houve indícios de infecção por MS concomitantemente com o vírus da BIG favorecendo a produção de ovos com EAA em aves caipiras (SANTOS et al., 2012). Feberwee et al. (2009b) também observaram sinergia entre a infecção por MS e BIG afetando a produção de ovos, com até 25% de ovos afetados por EAA. Porém, não houve a ocorrência de EAA quando as aves estavam infectadas apenas por BIG, ao contrário, das poedeiras que estavam infectadas apenas por MS (FEBERWEE, 2009b).

A anormalidade se localiza na ponta fina do ovo, o ápice da casca, até aproximadamente dois centímetros do ápice e quase sempre possuem uma região bem delimitada. Esta região se apresenta áspera e fina, com aumento da translucência vista na ovoscopia, propiciando aumento na incidência de trincas e ovos quebrados (FEBERWEE et al., 2009). A translucência da casca é resultante de botões mamilares irregulares provavelmente devido à fusão de núcleos mamilares durante as fases iniciais da formação da casca do ovo. Uma deficiência de manganês, que é um dos componentes da matriz orgânica da casca compromete a formação da camada mamilar da casca e aumentando assim, a incidência de

áreas translúcidas. Nos ovos com EAA, foi observado que havia pouca quantidade de núcleos mamilares e com erosões, o que não era encontrado em ovos com casca normal.

A transmissão de MS entre as galinhas pode ser horizontal ou vertical (KLEVEN, 1997). A forma horizontal ocorre, através do contato direto com as aves infectadas que, de acordo com estudos de Kleven (1997), é a forma mais comum de infecção. A transmissão vertical se dá através do ovo e representa um importante fator na disseminação do MS em galinhas e perus, apesar de nem todas as aves nascidas de plantéis contaminados por MS estarem infectadas (KLEVEN, 1997).

O ovo é contaminado a partir de lesões dos sacos aéreos abdominais. A gema, ao ser liberada pelos ovários, contamina-se devido ao íntimo contato com os sacos aéreos abdominais, acarretando em contaminação ao longo do oviduto e conseqüentemente, os futuros ovos também se contaminarão (NASCIMENTO; PERREIRA, 2009). Em um estudo experimental realizado por Feberwee et al. (2008) o MS foi isolado no oviduto de aves que produziram ovos com EEA. Este resultado confirma a transmissão vertical do MS como importante fator na disseminação desse patógeno em plantéis avícolas.

Ainda não há maiores informações, de como o MS afeta o ápice da casca desses ovos. Foi realizado um estudo experimental com reprodução da doença pelo MS, para confirmar a etiologia da EAA e evidenciar assim, as lesões de casca. Os exames histopatológicos do oviduto não revelaram nenhuma lesão ao longo de sua extensão. Utilizou-se a microscopia eletrônica por varredura para analisar a casca dos ovos com EAA, fornecendo maiores explicações para a diminuição da translucência e a redução da resistência da casca desses ovos. Foi observada a ausência da zona de calcificação da camada mamilar, pois não havia a presença dos botões mamilares e parte da camada paliçada estava reduzida, em largura, no ápice dos ovos com EAA, além, das membranas da casca mais espessas (FEBERWEE et al., 2009). A espessura da camada calcificada, do ápice do ovo com EAA neste estudo, apresentou menor espessura (246.9µm), comparado aos ovos normais (286.7 µm).

No experimento de Feberwee et al. (2009b), os ovos com EAA apresentaram resistência da casca, 44% menor que a de ovos provenientes de aves não desafiadas por MS. Observaram também, que mesmo os ovos normais, de aves

desafiadas por MS, possuíram cascas mais frágeis quando comparadas com cascas dos ovos de galinhas não desafiadas. A fragilidade da casca e conseqüentemente aumento nas quebras é a principal causa das perdas econômicas devido à EAA (FEBERWEE; LANDMAN, 2008).

Feberwee (2009) e Catania et al. (2010) em seus estudos trataram as aves infectadas por MS e com produção de ovos com EAA, com antibióticos, como a oxitetraciclina e tilosina, respectivamente. Ambos obtiveram resultados positivos no tratamento, pois houve melhora na casca dos ovos produzidos. Porém, o efeito da antibioticoterapia pode ser temporário, pois segundo Kleven (2003), apenas o uso de antibiótico não é capaz de eliminar o MS do lote, além do risco da presença de resíduos do antibiótico nos ovos produzidos. Segundo o mesmo autor, a melhor estratégia na criação de poedeiras é a utilização de vacinas contra o MS.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DO MATERIAL

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, sob o número de registro 199. Os ovos foram colhidos em uma empresa avícola de produção, no município de Bastos, São Paulo, Brasil em dois períodos. No verão, no mês de novembro de 2012, a temperatura ambiente média da região foi de 27,2°C e no inverno, no mês de julho de 2013 foi de 12,3°C.

##### 3.1.2 Seleção dos ovos

Os ovos foram selecionados após a etapa de lavagem, durante a ovoscopia na sala de classificação (Figura 1), e acondicionados em cartelas de papelão utilizadas no comércio varejista. A seleção consistiu em identificar e coletar os ovos considerados do tipo EAA, ou seja, com alteração no ápice da casca, apresentando superfície rugosa, com casca fina e maior translucência no ápice (Figura 2). Os ovos do tipo normais, aqueles que não apresentavam EAA, foram coletados na mesma quantidade dos selecionados com a anormalidade. Foram coletados no total 300 ovos no período de verão e 600, no inverno, em um total de 900 ovos, sendo a metade com EAA e a outra metade considerada normal em cada estação. Após a seleção, todas as bandejas de ovos foram empilhadas dentro de caixas de papelão, lacradas e transportadas para o Laboratório de Sanidade Avícola da Faculdade de Veterinária da UFF.

No laboratório, foram avaliados 232 ovos no verão e 400 ovos no inverno, pois os ovos foram submetidos a uma segunda ovoscopia na chegada, que gerou retirada de 28 ovos no verão e 125, no inverno por quebras e trincas no transporte. Além disso, durante as análises, no verão foram perdidos 33 ovos por ruptura da gema e 7 deteriorados e no inverno 32 ovos foram perdidos por ruptura da gema, 5 deteriorados e 38 quebrados no manuseio.

Após a nova triagem, os ovos normais e com EAA foram separados em cinco grupos para as análises, a partir da chegada e por mais quatro semanas, constituindo cinco dias de análises (aos dois, sete, 14, 21 e 28 dias após a postura).



Figura 1. Seleção de ovos com anormalidade durante ovoscopia.



Figura 2. Ovo com translucência aumentada em região bem delimitada no ápice da casca.

### 3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

#### 3.2.1 Avaliação do estado sanitário das granjas para *Mycoplasma synoviae* e Bronquite Infecciosa das Galinhas

Para avaliar o estado sanitário da granja em relação à micoplasmose e ao vírus da BIG, foram realizados PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e MS e ELISA, para pesquisa de anticorpos contra o vírus da BIG e MS. As aves eram vacinadas contra MG e BIG e não vacinadas contra MS. Foram coletados suabes de traqueia de 20 galinhas poedeiras (10 verão e 10 inverno), de dois lotes da mesma granja, acondicionados e transportados em microtubos contendo 1,0mL de meio Frey modificado, refrigerados. Dos mesmos lotes foram coletadas também, 15 amostras de sangue da veia braquial em volume de 2,5 mL, usando seringas e agulhas descartáveis, para a obtenção de soro. A coleta de sangue foi feita em duas vezes com intervalo de quatro semanas nos dois períodos de coleta, inverno e verão.

A amostragem foi baseada na alta prevalência de MS, estimada por Buim et al. (2009), na região onde foram coletadas as amostras. As amostras foram



transportadas sob refrigeração, em caixas isotérmicas, com gelo reciclável, até aos Laboratórios de Sanidade Avícola e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFF, onde foram submetidas ao ELISA (IDEXX, São Paulo, Brasil) pelo uso de kits específicos para a detecção de anticorpos contra MS, MG e BIG, segundo as instruções do fabricante; e à PCR, com extração de DNA pelo método de Sambrook et al., 1989, seguida de amplificação pela utilização os seguintes pares de *primers* para MS: 5'-GAG AAG CAA AAT AGT GAT ATC A-3' e 5'-CAG TCG TCTCCG AAG TTA ACA A-3', que amplificam 211 pares de bases (pb) (LAUERMAN, 1998); e para MG: 5'-GGA TCC CAT CTC GAC CAC GAG AAA A-3' e 5'-CTT TTC AAT CAG TGA GTA ACT GAT GA-3', que amplificam 732 pb (NASCIMENTO et al., 1991). Como controles positivos foram utilizados cepas padrões e amostras de referência de MS. A reação para PCR continha: 5µL de Tampão para PCR10X, 200 µM de cada DNTP, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 5pM cada primer, 1U de Taq polymerase, 5µL do DNA extraído, obtendo um volume final de 50µL. Os tubos foram submetidos a desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minute e 72°C por dois minutos, e alongamento a 72°C por cinco minutos. O resultado da amplificação foi obtido em gel de agarose a 2% submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e submetido à eletroforese. Após a corrida eletroforética, a visualização dos *amplicons* foi realizada sob luz ultravioleta em transiluminador.

Dos 10 suabes de traqueia de galinha analisados pela PCR em cada estação do ano, cinco foram positivos para MS no verão e quatro, no inverno, e todos foram negativos para MG. Os títulos de anticorpos contra MS se elevaram no verão, com média geométrica (GM) de 8.613 (CV=49,5) passando para 16.842 (CV=25,9) ( $p < 0.0001$ ), enquanto os títulos contra BIG foram reduzindo, com GM de 4.909 (CV=33,9) para 2.007 (CV=42,6) ( $p < 0.0001$ ) na segunda coleta. Esses resultados se repetiram no inverno, com GM de 1.810 (CV=104,2) passando para 3.714 (CV=43,8) para MS ( $p = 0.0016$ ), e GM de 4.297 (CV=32,0) para 3.380 (CV=46,6) ( $p = 0.0977$ ) para BIG. Esses resultados comprovaram que as aves eram infectadas por MS e controladas para BIG e MG por vacinação.

### 3.3 ANÁLISE DE QUALIDADE EXTERNA E INTERNA DOS OVOS

Para a realização da análise de qualidade dos ovos, foi utilizado o equipamento Digital Egg Tester 6000 (Nabel).

Os ovos de cada grupo foram separados por pesos similares, identificados individualmente e armazenados em sala com temperatura e umidade controladas, sendo lidas diariamente no termohigrômetro, e registrados os valores mínimos e máximos (Figura 3). No período do verão, a temperatura média mínima da sala de estocagem foi de 24,6° C e máxima de 25,8° C e umidade relativa média mínima de 59% e máxima de 69%. No período do inverno, a temperatura média mínima da sala foi de 24° C e máxima de 25° C e umidade relativa média mínima de 66% e máxima de 73%.

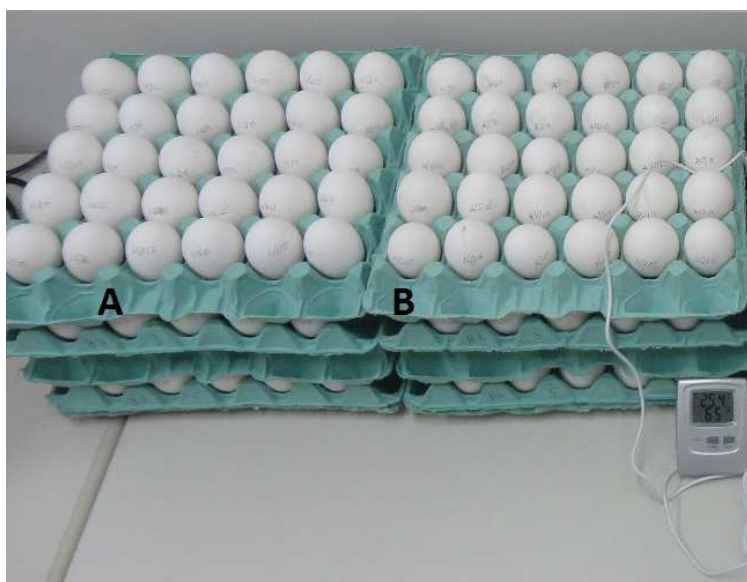


Figura 3. **A.**Ovos normais e **B.** Ovos com Anormalidades no ápice da casca (EAA) armazenados em sala com temperatura e umidade controladas, produzidos no período do verão.

### 3.3.1 Análise da qualidade externa dos ovos

#### 3.3.1.1 Pesagem

Os ovos foram pesados na balança do equipamento Digital Egg Tester, que foi tarada com três casas decimais. Obteve-se a diferença entre os pesos dos

segundos dias, após a postura, utilizando os dados obtidos em casa período de análise.

#### 3.3.1.2 Resistência de casca

A resistência da casca foi medida por um dispositivo de compressão do mesmo equipamento que indicava a força em Newton (N), necessária para romper a casca. Individualmente, cada ovo era posicionado horizontalmente e comprimido com um pistão de alumínio chato a uma velocidade de cinco mm/s até que a casca do ovo trincasse.

#### 3.3.1.3 Peso e porcentagem da casca

Para o cálculo da porcentagem de casca, as cascas eram lavadas em água corrente, com o cuidado para não perder pedaços das mesmas e secas em temperatura ambiente por dois dias. Após este período, eram pesadas individualmente, em balança analítica (Bel) e feita a divisão pelo peso do ovo, multiplicando por 100.

#### 3.3.1.4 Espessura de casca

A espessura da casca foi aferida, com a presença das membranas da casca, em três regiões: fundo (ponta larga), lateral e ápice (ponta fina) da casca, com auxílio de um micrômetro digital.

Tanto no verão, quanto no inverno, foi realizada a comparação, entre as médias das espessuras, dos três pontos da casca (fundo, lateral e ápice), dentro de cada grupo e entre a mesma parte da casca entre os dois grupos.

### 3.3.2 **Análise da qualidade interna dos ovos**

#### 3.3.2.1 Unidade Haugh

Para as análises da qualidade interna, os ovos foram quebrados e em seguida, o conteúdo foi depositado na superfície plana e lisa, de uma bandeja circular de plástico, do equipamento, que faz a leitura e o cálculo da UH e altura do albume. Todas as análises foram realizadas e registradas pelo equipamento Digital Egg Tester. Os valores de unidade Haugh foram obtidos pela medição da altura do albume no ponto médio entre a gema e o limite do albume denso e do peso (Figura 4), utilizando a fórmula de unidade Haugh simplificada,  $UH = 100 \times \text{Log}(H - 1.7W^{0.37} + 7.57)$  (EISEN et al., 1962).

Foi analisada e comparada a média da UH dentro de cada grupo e entre os grupos, ao longo do armazenamento.



Figura 4. Ovo em prato plano para análise digital da altura do albumem pelo equipamento Digital Egg Tester.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações entre duas médias para os parâmetros de qualidade entre os ovos EAA e normais e para os títulos de anticorpos pelo ELISA foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. As médias dos períodos de análise para cada tipo de ovo foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn. As correlações entre as curvas de UH e a perda de peso foi feita pela comparação dos valores de melhor ajuste (Best-fit values). Foi utilizado o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA) em todas as análises.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao comparar a média dos pesos dos ovos normais e com EAA, não houve diferença significativa em nenhuma das semanas estudadas (Tabela 1), em ambas as estações, significando que não houve influência da anormalidade no peso dos ovos.

Ao analisar as médias dos pesos dos ovos ao longo das quatro semanas de estocagem, tanto normais quanto com EAA, verificou-se que foram significativamente menores aos 21 dias de estocagem no verão e aos 14 dias no inverno (Tabela 1).

Tabela 1 Médias de peso e perda de peso de ovos comerciais de galinha normais e com Anormalidades no Ápice da Casca ("Eggshell Apex Abnormalities"- EAA) durante 28 dias de armazenamento no verão e no inverno

Período de análise	n	Peso do ovo (g)		Perda de peso do ovo (g) <sup>1</sup>		Perda de peso do ovo (%) <sup>1</sup>	
		Normais	EAA	Normais	EAA	Normais	EAA
<b>VERÃO</b>							
2 dias	116	62,24aA	62,16aA	-	-	-	-
7 dias	91	61,94aA	61,83aA	0,27bA	0,36aA	0,43	0,58
14 dias	65	61,38aA,B	60,99aA,B	1,00bB	1,29aB	1,61	2,07
21 dias	42	60,56aB,C	59,99aB	1,82bC	2,30aC	2,92	3,70
28 dias	21	59,37aC	58,45aB	2,51bD	3,51aD	4,04	5,65
<b>INVERNO</b>							
2 dias	200	60,15aA	60,34aA	-	-	-	-
7 dias	165	59,89aA	59,77aA,B	0,37bA	0,56aA	0,62	0,93
14 dias	120	58,86aB	58,63aB,C	0,85bB	1,21aB	1,41	2,00
21 dias	82	58,58aB,C	58,02aC	1,40bC	1,94aC	2,33	3,21
28 dias	42	57,71aC	56,94aC	1,76bD	2,44aD	2,92	4,04

\*a,b: Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha e em cada medida diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). A,B: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e em cada grupo diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis/Dunn ( $p < 0,05$ )<sup>1</sup> Ao comparar com valores aos 2 dias de estocagem.

A perda de peso acumulada ao longo do armazenamento, comparando os dois tipos de ovos, foi maior nos ovos com EAA em todas as semanas, em ambas as estações, ou seja, a presença da alteração na casca influenciou na perda de peso dos ovos (Tabela 1). Por ser mais fina no ápice, a casca dos ovos com EAA pode ter favorecido uma maior permeabilidade ao vapor de água e conseqüente perda de peso, segundo Peebles e Brake (1985).

A diferença de peso também foi verificada ao comparar as curvas de regressão geradas pelas médias das perdas ( $p < 0,05$ ) (Figura 5).

O peso do ovo é um importante parâmetro de qualidade, pois é utilizado para a classificação dos ovos e posterior escolha pelo consumidor na seleção para compra. A EAA interferiu na perda de peso dos ovos e com isso, compradores que armazenam ovos sejam para distribuição ou o para consumo, podem ser prejudicados caso adquiram os ovos sem atentar para essa lesão.

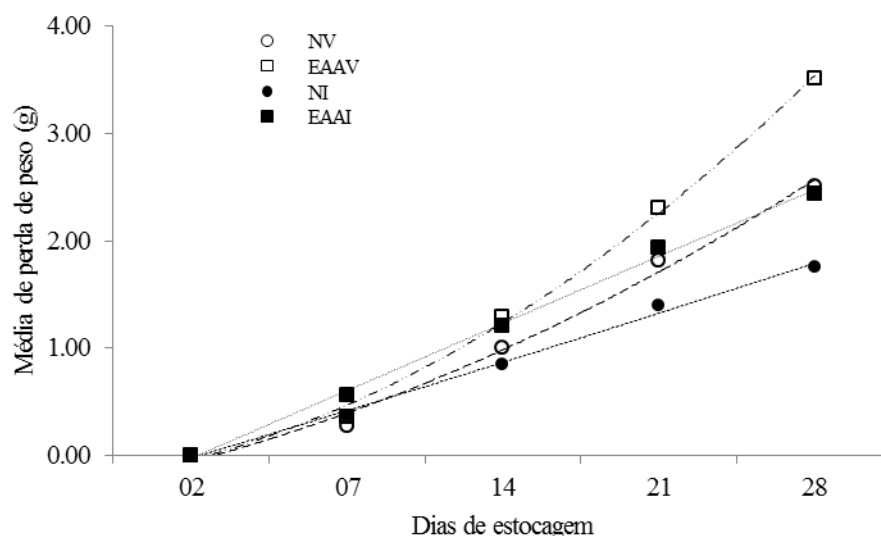


Figura 5. Médias de perda de peso durante estocagem de ovos normais no verão (NV = ○) e no inverno (NI = ●), e ovos com Anormalidades no Ápice da Casca no verão (EAAV = □) e no inverno (EAAI = ■). Linhas de regressão polinomial estão representadas (NV = - - -; NI = ---; EAAV = -●-●-; EAAI = ●●).

Em relação às estações do ano, a perda de peso foi maior no verão, provavelmente pela umidade da sala de estocagem que foi ligeiramente menor nesta estação e/ou às altas temperaturas ambientais a que as galinhas estavam

submetidas nesse período e que podem ter levado à produção de ovos com casca mais fina (Tabela 1). Mesmo com valores absolutos distintos, em ambas as estações a perda de peso pelos ovos com EAA foi aproximadamente 40% maior que por ovos normais aos 28 dias, significando que a EAA teve a mesma influência na perda de peso independentemente da estação em que os ovos foram produzidos.

Não houve diferença ( $p > 0.05$ ) ao longo do armazenamento para nenhum dos parâmetros de qualidade da casca: espessura, peso e porcentagem de casca e resistência à quebra. Jones e Musgrove (2005) também observaram que a resistência da casca do ovo não se alterava ao longo do tempo de estocagem. De acordo com ROMANOFF; ROMANOFF (1949), possíveis alterações ocorrem apenas durante a formação da casca, pela interferência de fatores extrínsecos e intrínsecos.

Comparando as espessuras, das três regiões da casca, em cada tipo de ovo, foi observado que os valores da lateral da casca, geralmente foram maiores que os do ápice e do fundo, assim como no trabalho de Sun et al. (2012). Foi observado que no verão, não houve diferença ( $p > 0.05$ ) entre as três médias nos ovos normais, porém, nos ovos com EAA a média da lateral da casca foi maior que as do ápice ( $p < 0.001$ ) e do fundo ( $p < 0.01$ ). O mesmo comportamento foi observado no inverno, no entanto, como as médias foram maiores que no verão, as diferenças entre os pontos de medição da espessura da casca foram mais pronunciadas no inverno. A medida da lateral da casca foi maior que a do ápice ( $p < 0.05$ ) e do fundo ( $p < 0.001$ ) para ovos normais, enquanto nos ovos com EAA houve diferença significativa entre as médias nos três pontos, sendo a lateral a maior que a do ápice ( $p < 0.001$ ) e do fundo ( $p < 0.05$ ) e o fundo maior que o ápice ( $p < 0.01$ ).

A casca mais fina no verão pode ter ocorrido devido à exposição das galinhas às temperaturas ambientais mais elevadas, pois o desconforto térmico interfere, prejudicando a formação da casca. Com o aumento da temperatura ocorre a redução da ingestão de alimentos e conseqüentemente, diminuição dos níveis de cálcio ionizado disponíveis e hiperventilação com redução parcial do  $\text{CO}_2$  nos tecidos. Ocorre um desequilíbrio ácido-básico, provocado pela alcalose respiratória, pois a ave tenta dissipar o calor e sua respiração se torna ofegante, eliminando mais  $\text{CO}_2$ . Também devido à alcalose, os níveis de cálcio e fósforo sanguíneos caem. Todo esse processo interfere então, na espessura da casca e com isso no peso do ovo (MAHMOUD et al, 1996; EBEID et al, 2012). Barbosa Filho (2004) observou

diferença significativa quando comparou ovos produzidos em condição de conforto e estresse térmico. Há também, queda acentuada no valor médio da espessura de casca dos ovos de poedeiras submetidas às condições de temperatura ambiente elevada, levando às alterações no equilíbrio ácido básico, acarretando assim em produção de ovos com casca mais fina. As aves diminuem a capacidade de dissipar calor a medida que a temperatura e a umidade relativa do ambiente se elevam acima da zona termoneutra. Devido ao estresse térmico, a ave reduz o consumo de ração, evitando maior produção de calor e, com isso, a disponibilidade de cálcio no sangue diminui, prejudicando a formação da casca (FRANCO; SAKAMOTO, 2007).

Analisando as diferenças entre os tipos de ovos, a espessura no ápice da casca de ovos com EAA foi menor ( $p < 0,0001$ ) que na de ovos normais no período do verão, enquanto no inverno, foram mais finas no ápice ( $p < 0,0001$ ) e na lateral ( $p = 0,03$ ) da casca de ovos com EAA. Feberwee et al. (2009) também observou diferenças significativas na espessura da casca entre ovos com EAA e ovos não afetados pela anormalidade. Estes valores foram importantes para quantificar a diferença na área afetada e estabelecer sua relação com outras características, como resistência e peso da casca.

Considerando a média total da espessura da casca nos três pontos de medida, não houve diferença entre os ovos normais e com EAA no verão ( $p > 0,05$ ), mas no inverno, os ovos com EAA obtiveram menor espessura de casca ( $p = 0,0003$ ). As cascas foram mais espessas no inverno e, com isso, as diferenças entre os normais e EAA foram mais evidentes, resultando em diferença. A diferença de espessura também foi observada por Feberwee et al. (2009a) entre os ovos de galinhas infectadas, experimentalmente com MS e os ovos do grupo controle em ambiente controlado.



Tabela 2. Médias dos valores de espessura de casca, peso de casca e resistência de casca de ovos comerciais de galinha normais e com Anormalidades no Ápice da Casca (EAA) no verão e no inverno.

	Normais	EAA	Diferença absoluta	Diferença percentual (%)
<b>VERÃO</b>				
Espessura do ápice ( $\mu\text{m}$ )	368,8aA	354,5bB	1,43	3,88
Espessura da lateral ( $\mu\text{m}$ )	367,7aA	370,9aA	-0,32	-0,87
Espessura do fundo ( $\mu\text{m}$ )	361,7aA	359,3aB	0,23	0,65
Espessura média ( $\mu\text{m}$ )	366,0a	361,6a	0,45	1,22
Peso da casca (g)	5,81a	5,73a	0,09	1,53
Porcentagem de casca (%)	9,34a	9,21a	-	0,13
Resistência de casca (N)	39,83a	33,23b	6,60	16,57
<b>INVERNO</b>				
Espessura do ápice ( $\mu\text{m}$ )	390,6aB	369,7bC	2,09	5,35
Espessura da lateral ( $\mu\text{m}$ )	398,9aA	392,2bA	0,67	1,69
Espessura do fundo ( $\mu\text{m}$ )	387,0aB	382,9aB	0,41	1,06
Espessura média ( $\mu\text{m}$ )	392,2a	381,6b	1,06	2,70
Peso da casca (g)	5,86a	5,78a	0,08	1,35
Porcentagem de casca (%)	9,89a	9,77a	-	0,12
Resistência da casca (N)	41,00a	32,86b	8,14	19,86

\*a,b:Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha e em cada medida diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). A,B: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e em cada grupo diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis/Dunn ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Ao comparar com valores aos 2 dias de estocagem.

A presença da EAA não influenciou nas médias dos pesos de casca ou da porcentagem de casca ( $p>0,5$ ). Considerando o efeito da estação do ano, a porcentagem de casca foi menor ( $p<0,0001$ ) no verão, mas nessa estação não houve diferença no peso da casca ( $p>0,05$ ). A menor porcentagem de casca também pode ser explicada pela elevada temperatura ambiental no verão pelos efeitos relacionados ao calor que interferem na formação da casca, já mencionados.

A resistência da casca dos ovos com EAA foi menor ( $p<0,0001$ ) do que a dos ovos normais, 16.57% no verão e 19.86% no inverno. A característica que mais sofreu variação entre ovos normais e com EAA foi a espessura do ápice da casca, portanto, a queda na resistência da casca de ovos com EAA foi principalmente devido à menor espessura do ápice. Feberwee et al. (2009b) observaram uma redução da resistência entre ovos normais e com EAA de 32.34% a 34.86% em um grupo de galinhas infectadas por MS. Destaca-se ainda que, ovos normais provenientes de aves contaminadas por MS também são afetados e possuem menor resistência à quebra que ovos normais, de aves não infectadas por esse micro-organismo (FEWERWEE et al., 2009b; GOLE, et al., 2012). O peso do ovo e a qualidade da casca também podem ser afetados em ovos normais produzidos por aves infectadas por MS (SILVA et al., 2012).

Para os ovos comerciais de galinha as cascas, com maiores valores de espessura e porcentagem de casca, são mais resistentes. Esta é a característica mais desejada por todas as empresas produtoras, pois ovos com a casca resistente possuem menor possibilidade de trincas e quebras, matendo também a qualidade interna, desde a postura até o consumidor final.

Analisando e comparando os valores da UH entre os ovos normais e com EAA não foi observado diferença entre eles, apenas no 7º dia. Comparando dentro de cada tipo de ovo e para ambas as estações, houve perda significativa em relação ao tempo de armazenamento (Tabela 3), como já era esperado, principalmente por estarem em temperatura ambiente. A qualidade interna sofre influência tanto da temperatura, quanto no tempo de armazenamento, ou seja, quanto maior for o período de armazenamento sem refrigeração, menor serão os valores de UH (EISEN et al, 1962; ALLEONI; ANTUNES,1999; STALDEMAN; COTTERILL, 1994). Ao longo do armazenamento, o pH do albume torna-se alcalino, devido à perda de  $\text{CO}_2$  para o ambiente, com isso há uma diminuição da altura do mesmo, pois ocorre

fluidificação do albume e conseqüente queda nos valores de UH (SCOTT; SILVERSIDES, 2000; ALLEONI; ANTUNES, 2001; LEANDRO et al., 2005, CARVALHO et al., 2007).

Tabela 3 Médias de Unidade Haugh (UH) e perda de UH dos ovos comerciais normais e com Anormalidades no Ápice da Casca ("Eggshell Apex Abnormalities"- EAA) durante 28 dias de armazenamento no verão e no inverno.

Período de análise	n	UH		Perda de UH (%) <sup>1</sup>	
		Normais	EAA	Normais	EAA
<b>VERÃO</b>					
2 dias	116	73,97aA	72,42aA	-	-
7 dias	91	62,10bA	60,37a,bA	16,05	16,64
14 dias	65	56,54b,cA	52,77b,cA	23,57	27,13
21 dias	42	48,14cA	46,91cA	34,92	35,23
28 dias	21	45,20cA	45,20cA	38,89	37,58
<b>INVERNO</b>					
2 dias	200	80,10aA	76,76aB	-	-
7 dias	165	63,20bA	64,93bA	20,99	15,42
14 dias	120	60,23bA	55,64cB	24,80	27,52
21 dias	82	50,51cA	47,77c,dA	36,95	37,76
28 dias	42	48,66cA	47,16dA	39,25	38,57

a,b: Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha e em cada medida diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). A,B: Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna e em cada grupo diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis/Dunn ( $p < 0,05$ ) <sup>1</sup> Ao comparar com valores aos 2 dias de estocagem.

As perdas nos valores de UH entre a primeira e última análise foram próximas a 40%, independentemente do tipo de ovo ou estação. Com exceção nos 2º ( $p = 0,003$ ) e 14º ( $p = 0,015$ ) dias de estocagem do inverno, não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os valores obtidos de ovos normais e com EAA (Tabela 3) para UH. Portanto, a presença da EAA não afetou a UH nos ovos ao longo do armazenamento. Esse resultado está de acordo com os apresentados por Feberwee et al. (2009a).

Ao analisar os valores de UH dos ovos com EAA e normais à regressão não linear, todos os valores encontrados ( $p>0,05$ ) foram explicados pela fórmula  $UH = 1.51x^2 - 16.35x + 90.36$ . Portanto, a presença da anormalidade ou as estações não influenciaram na taxa de perda da UH (Figura 6), talvez pelo controle do ambiente de armazenagem em relação à temperatura.

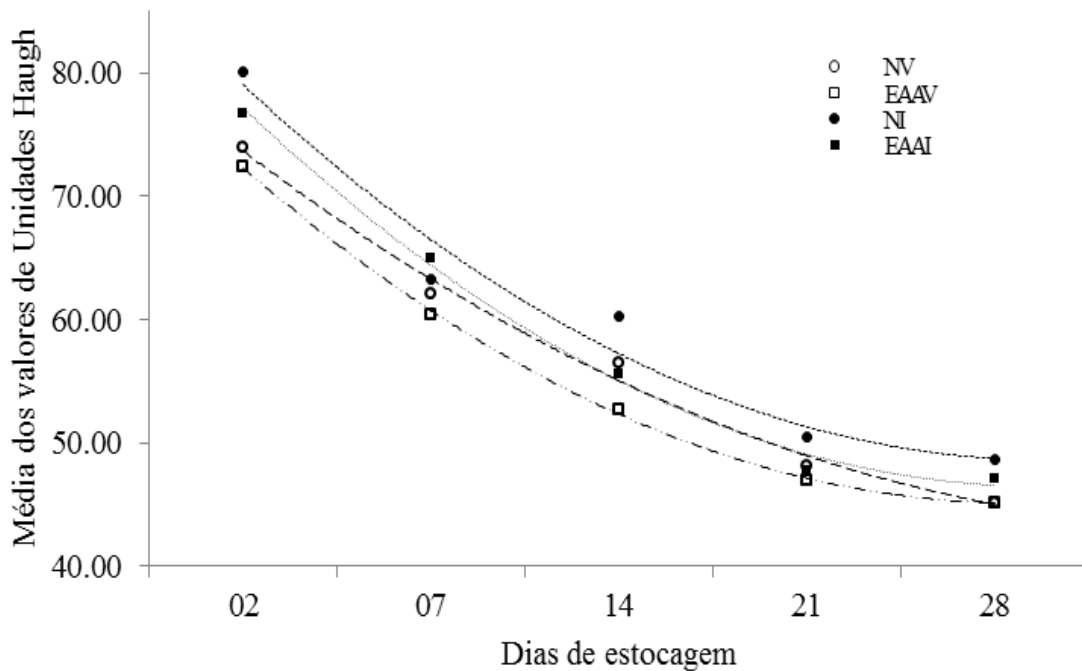


Figura 6. Médias dos valores de Unidades Haugh (UH) em cada dia de análise para ovos normais no verão (NV = ○) e inverno (NI = ●), e para ovos com Anormalidades no Ápice da Casca (EAA) no verão (EAAV = □) e inverno (EAAI = ■). Linhas de regressão polinomial estão representadas (NV = - - -; NI = ···; EAAV = -●-●-; EAAI = ···).

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, a presença de casca com EAA, embora não tenha afetado a qualidade interna do ovo, estava relacionada com a perda de qualidade externa.

Os ovos com EAA, ao longo do armazenamento, apresentaram maior perda de peso acumulada independente da época de produção, além de menores valores de espessura no ápice da casca com queda na resistência, propiciando as perdas por trincas e fissuras durante a coleta e a classificação, com consequentes quebras durante o manuseio, acarretando prejuízos econômicos para o produtor.

Estes resultados demonstraram que a produção de ovos com EAA é mais um fator a ser considerado no controle do *Mycoplasma synoviae* em poedeiras comerciais para prevenir perdas na qualidade dos ovos ao longo da estocagem.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Efeito da temperatura e do período de armazenamento no escore da Unidade Haugh e nas propriedades funcionais das proteínas da clara do ovo de galinha. *Resumo IN: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS*. CAMPINAS: Unicamp, 1999. p.151.

ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. *Scientia Agricola*, v.58, n.4, p.681-685, out./dez. 2001.

ANDRADE, E. L.; MARINO, E. R.; MARCHINI, F. T.; FERRARI, N. G.; ANDREO, N.; FIORAVANTI FILHO, R. S.; CAMARGO, T. C. M.; BRIDI, A.M., FONSECA, N. A.N. Valor de ph e cor da gema de ovos de galinhas poedeiras armazenados em diferentes métodos e períodos. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 39, 2009, Águas de Lindóia, SP. *Anais...*

ARAÚJO, J.A.; SILVA, J.H.; AMÂNCIO, A.L. et al. Fontes de minerais para poedeiras. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.3, p.53-60, 2008.

BAIÃO, N.C., CANÇADO, S.V. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo. *Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG*, Belo Horizonte, n.21, p.43-59, 1997.

BAIÃO, N.C.; LÚCIO, C.G. Nutrição de matrizes pesadas. In: MACARI, M.; MENDES, A.A (Eds). *Manejo de matrizes pesadas*. Campinas: FACTA, 2005. Cap.10, p.198-216.

BAIN, M.M. Eggshell strength: A relationship between the mechanism of failure and the ultrastructural organization of the mammillary layer. *British Poultry Science*, v.33, p.303-319, 1992.

BAIN, M.M.; MACLEOD, N.; THOMSON, R. et al. Microcracks in eggs. *Poultry Science*, v.85, p.2001-2008, 2006.

BALEN, L.O.; FIORENTIN, L. O *Mycoplasma synoviae* e seu impacto econômico sobre a avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO 1990 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...*Campinas: FACTA, 1990, p. 135-140.

BAR, A.; HURWITZ, S. Vitamin D metabolism and calbindin (calcium binding protein) in aged laying hens. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia v. 117, n. 10, p. 1775-1779, Oct. 1987.

BARBOSA FILHO, J. A. *Avaliação do bem-estar de aves poedeiras em diferentes sistemas de produção e condições ambientais, utilizando análise de imagens*. Piracicaba: ESALQ/USP, Dissertação Mestrado, 2004. 123p.

BARBOSA, V.M.; BAIÃO, N.C.; MENDES, P.M.M.; ROCHA, J.S.R.; POMPEU, M.A.; LARA, L.J.C.; MARTINS, N.R.S.; NELSON, D.L.; MIRANDA, D.J.A.; CUNHA, C.E.,

CARDOSO, D.M.; CARDEAL, P.C. Avaliação da qualidade da casca dos ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.4, p.1036-1044, 2012.

BERTECHINI, A. G. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. Disponível em: <<http://w.ovoonline.com.br>>, 2004.

BORGES, S. A.; MAIORKA, A.; FISHER DA SILVA, A. V. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 975-981, 2003.

BUIM, M. R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A. J. P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, v.27, n.7, p. 552-556, 2009.

BURKE, William. Reprodução das aves. In: SWENSON, Melvin e REECE, William. 11ªed. *Dukes Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,1993. 856p. cap 38, p. 660-680.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº30.691, de 29 de março de 1952, e alterações. DOU. Brasília atualizado em 1997.

CAMERINI, Nerandi Luiz. *Qualidade dos ovos de aves poedeiras comerciais submetidas a três condições ambientais em dois sistemas de criação*. Campina Grande – PB, 2012. 115f. Tese (Engenharia Agrícola)- Centro de tecnologia e recursos naturais, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2012.

CARBÓ, C.B. La gallina ponedora. Madrid, Espanha: Ediciones Mundi-Prensa, 1987.519 p.

CARVALHO, F.B.; STRINGHINI, J.H.; JARDIM FILHO, R.M.; LEANDRO, N.S.M.;PÁDUA, J.T.; DEUS, H.A.S.B. Influência da conservação e do período de armazenamento sobre a qualidade interna e da casca de ovos comerciais. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. supl. 5, p. 100-101, 2003.

CARVALHO, F. B.; STRINGHINI, J.H.; JARDIM FILHO,R. M.; LEANDRO , N. S. M.; CAFÉ, M. B. ; BORGES DE DEUS, H. A. S. Qualidade interna e da casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 1, p. 25-29, 2007.

CATANIA, S.; BILATO, D.; GOBBO, F.; GRANATO, A.; TERREGINO, C.; IOB, L.; NICHOLAS, R. A. J. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian diseases*, v.54, p. 961-964, 2010.

CATARINA Stefanello. *Microminerais orgânicos em dietas para poedeiras comerciais*. Maringá, 2012. Dissertação (Mestre em Zootecnia)- Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 2012.

CHANG, W.; TU, C.; CHEN, T.; BIKLE, D. SHOBACK, D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Science Signaling*, New York, V.1, n. 35, ra1, p.1-13, 2008.

COUTTS, J.A.; WILSON, G.C. *Optimum egg quality: a practical approach*. Sheffield (Reino Unido): 5M Publishing. 2007.64p.

CUNNINGHAM, F.E.; COTTERIL, O.J.; FUNK, E.M. The effect of season and age of bird. On egg size, quality and yield. *Poultry Science*, v.39, p.289-299, 1960.

DE KETELAERE, B.; GOVAERTS, T.; COUCKE, P.; DEWIL, E.; VISSCHER, J.; DECUYPERE, E.; BAERDEMAEKER, J. Measuring the eggshell strength of 6 different genetic strains of laying hens: techniques and comparisons. *British Poultry Science*, v. 43, p. 238-244, 2002.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 2006; 112:253-260.

EISEN, E.J., B.B. BOHREN, and H.E MCKEAN, 1962. The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poultry Sci.* 41:1461-1468.

FASENKO, G. M., F. E. ROBINSON, R. T. HARDIN, and J. L. WILSON. Variability in preincubation embryonic development in domestic fowl. 2. Effects of duration of egg storage period. 1992, *Poult. Sci.* 71:2129–2132.

FATHI, M.M.; ZEIN EL-DEIN, A.; EL-SAFETY, S.A. et al. Using scanning electron microscopy to detect the ultrastructural variations in eggshell quality of Fayoumi and Dandarawi chicken breeds. *International Journal of Poultry Science*, v.6, p.236-241, 2007.

FEBERWEE, A.; LANDMAN, W. A novel eggshell pathology induced by *Mycoplasma synoviae*. *World poultry*, v. 24, n. 7, p. 22-23, 2008. Disponível em: <[www.worldpoultry.net](http://www.worldpoultry.net)>. Acesso em: 27 abr. 2012.

FEBERWEE, A.; WIT, J. J.; LANDMAN, W. J. M. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology*, v. 38, n. 1, p. 77-85, fev. 2009a.

FERREIRA, R. A. Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos. Viçosa: *Aprenda Fácil*, 2005, 317p.

FIGUEIREDO, T.C.; CANÇADO, S.V.; VIEGAS, R.P.; RÊGO, I.O.P.; LARA, L.J.C.; SOUZA, M.R.; BAIÃO, N.C. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.712-720, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000300024>.



FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO. Disponível em: <[www.fao.org/](http://www.fao.org/)>. Acesso em 06 nov. 2013.

FRANCO, J.R. G.; SAKAMOTO, M. I. Qualidade dos ovos: uma visão geral dos fatores que a influenciam, 2007. *Revista AveWorld*. Disponível em: <http://www.aveworld.com.br/index.php?documento=102>. Consulta feita em: 24/09/13.

FRANCO JIMENEZ D.J.; SCHEIDELER S.E.; KITTOK R.J.; BROWN-BRANDL T.M.; ROBESON L.R.; TAIRA H., BECK M. M. Differential effects of heat stresses in three strains of laying hens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 2007, 16 (4): 628-634.

FUNK, E. M. IN: Egg Science and Technology. Westport, Connecticut, *the AVI Publishing Company INC*, pg.35, 1973.

FURLAN, R.L. Influência da temperatura na produção de Frangos de corte. In. VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Chapecó, SC. 2006. p. 104-135. Disponível em <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?ids=Sn6l70p1l&area=41>>. Acesso em: 12/09/2013.

FURTADO, I. M; OLIVEIRA, A. I. G; FERREIRA, D. F; OLIVEIRA, B. L; RODRIGUES, P. B. Correlação entre medidas da qualidade de casca e perda de ovos no segundo ciclo de produção. *Ciência Agrotécnica*. v. 25, n. 3, p.654-660, 2001.

GALOBART, J.; SALA, R.; RINCO'N-CARRUYO, X.; MANZANILLA, E.G.; VILA, B.; GASA, J. Egg yolk color as affected by saponification of different natural pigmenting sources. *Journal Applied of Poultry Research*, v.13, p. 328-334, 2004.

GAMA, N. S. Q.; TOGASHI; L, C. K. *Relato do desempenho de poedeiras comerciais consumindo água filtrada*. Comunicado Técnico. 2007. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=50](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=50) Acesso em: 15 dez. 2013.

GOLE, V. C., CHOUSALKAR, K. K., ROBERTS, J. R. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma synoviae* in laying hens and possible effects on egg shell quality. *Prev. Vet. Med.*, 2012.

GUTIERREZ, W.M.; Min, W.; CHANG, H.H. Effects of chilled drinking water on performance of laying hens during constant high ambient temperature. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v.22, n.5, p.694-699, 2009.

HAUGH, R.R. The Haugh unit for measuring egg quality. *United States Egg Poultry Magazine*, v.43, p.552-555, 1937.

HAMILTON, R.M.G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. *Poultry Science*, v.61, p. 2022-2039, 1982.

HESTER, P.Y. A qualidade da casca do ovo. *Avicultura industrial*, Porto Feliz, n. 1072, p. 20-30, 1999.

INSTITUTO OVOS BRASIL. Boletim do ovo. Disponível em: <<http://www.ovosbrasil.com.br>>. Acesso em: 27 jul. 2013.

ITO, R. I. Aspectos nutricionais relacionados à qualidade da casca de ovos. In: VII SIMPÓSIO TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS - APA, *Anais...* São Paulo, 1998. p. 119-138.

ITO, N.M.K. Enfermidades que comprometem a qualidade da casca. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 4, Goiânia, *Anais...* Goiânia, 2000, p.145-158.

JARDIM FILHO, R. M. *Influência das fontes e granulometria do calcário calcítico sobre o desempenho, qualidade da casca e resistência óssea de poedeiras comerciais*. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária – UFG.

JONES; MUSGROVE. Effects of Extended Storage on Egg Quality Factors *Poultry Science* 84:1774–1777, 2005.

KEENER, K. M.; LACROSSE, J. D.; CURTIS, P. A.; ANDERSON, K.; FARKAS, B. E. The Influence of Rapid Air Cooling and Carbon Dioxide Cooling and Subsequent Storage in Air and Carbon Dioxide on Shell Egg Quality<sup>1,2</sup>. *Poultry Science*, V. 79, p. 1067–1071, 2000.

KESHAVARZ, K.; NAKAJIMA, S. Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements of laying hens for optimum performance and eggshell quality. *Poultry Science*, Champaign, v. 72, n. 1, p. 144-153, Jan. 1993.

KHATKAR, M. S.; J. S. SANDHU.; G. S. BRAH.; M. L. CHAUDHARY. 1997. Estimation of egg shell breaking strength from egg characteristics in layer chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 32:111–113.

KLEVEN, S. H. *Mycoplasma synoviae* infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. *Diseases of Poultry: Mycoplasmosis*, 10<sup>th</sup> ed. Iowa State: University Press, Ames, Iowa, USA, 1997.p. 220-8.

KLEVEN, S.H. *Mycoplasma synoviae* infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry : Mycoplasmosis*, 11<sup>th</sup> ed. Iowa State: University Press, Ames, Iowa, USA, 2003.p. 756-66.

LAUERMAN, L.H. *Mycoplasma* PCR Assays: Nucleic Acid Amplifications Assays for diagnosis of animal diseases. Department of Agriculture and Industries, Alabama. 1998. 150p.

LEANDRO, N. S. M.; DEUS, H. A . B.; STRINGHINI J.H.; CAFÉ, M. B.; ANDRADE. M.A.; CARVALHO. F. B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. *Ciência Animal Brasileira* v. 6, n. 2, p. 71-78, abr./jun. 2005.

The chemistry of eggs and egg products. In: W. J. STADELMAN; O. J. COTTERILL (Ed) *Egg Science and Technology*. Haworth Press, Inc. 1994. Cap. 6, p. 105-176.

LIN, H.; WANG, L. F.; SONG, J. L.; XIE, Y. M. and YANG, Q. M. Effect of dietary supplemental levels of vitamin A on the egg production and immune responses of heat-stressed laying hens. *Poultry Science*, v. 81, p. 458-465, 2002.

MACARI, M.; MENDES, A.A. Manejo de matrizes de corte. Campinas, SP, 2005, FACTA Cap 6, p. 76-143, 421p. Autores: Fernando Rutz, Marcos Antonio Anciuti, Ederson Adriano Pan

MÁCHAL, L.; SIMEONOVÁ, J. The relationship of shortening and strength of eggshell to some egg quality indicators and egg production in hens of different initial laying lines. *Archiv für Tierzucht*, Dummerstorf, v. 45, n. 3, p. 287-296, 2002.

MAHMOUD, K. Z.; BECK, M. M.; SCHEIDELER, S. E.; FORMAN, M. F.; ANDERSON, K. P.; KACHMAN, S. D. Acute High Environmental Temperature and Calcium-Estrogen Relationships in the Hen. *Poultry Science* 75:1555-1562, 1996.

MANO, S.; QUEIROZ, M.; PARDI, H.; ALENCAR, A.; SOARES, P. Processamento tecnológico de ovos e derivados, 2002.

MEYER, R.; BAKER, R.C.; SCOTT, M.L. Effects of hen egg-shell and other calcium sources upon egg-shell strength and ultrastructure. *Poultry Science*, v. 52, p. 949-955, 1973.

MILLER, P.C.; SUNDE, M.L. The effects of precise constant and cyclic environments on shell quality and other performance factors with Leghorn pullets. *Poultry Science*, v. 54, p. 36-46, 1975.

MORENG, R.E.; AVENS, J.S. *Ciência e produção de aves*. São Paulo: Roca, 1990, p. 310.

MURAKAMI, A.E.; BARRIVIERA, V.A.; SCAPINELLO, C.; BARBOSA, M.J.; VALÉRIO, S.R. Efeito da temperatura e do período de armazenamento sobre a qualidade interna do ovo de codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) para consumo humano. *Revista Unimar*, v. 16, supl. 1, p. 13-25, 1994.

NAKANO, M. Problemas da avicultura no verão. *Avicultura Industrial*, Porto Feliz, v. 2, p. 22-27, 1979.

NASCIMENTO, E. R. *Mycoplasma synoviae* em Avicultura – Implicações Econômicas: Conviver ou Erradicar. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2001, Campinas, SP. *Anais...* Campinas: Facta. 2001. v. 01, p. 31 - 44.

NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P. O ovo. In: MACARI, M.; MENDES, A.A. (Ed.) *Manejo da Incubação*. Campinas: Facta, 2003. 34-50 p.

NEOSPARK. Eggshell defects and dietary essentials, 2012. Download da internet em: 23 set. 2013.

NYS, Y. et al. Avian eggshell mineralization. *Poultry and Avian Biology Reviews*, London, v. 10, p. 143-166, 1999.

NYS, Y. Recent developments in layer nutrition for optimizing shell quality. In Proc. 13th. European Symposium on Poultry Nutrition, Blankenberge, 2001, p. 42-52.

NYS, Y. et al. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, v.3, p.549-562, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631068304001393>>. Acesso em: 12 set. 2013. doi: 10.1016/j.crpv.2004.08.002.

OLIVEIRA, B.L. Pontos críticos do manejo de poedeiras. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícolas, Santos, 1992. *Anais...* Campinas: FACTA, 1992. p. 137-144.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.6, p.655-661,2000.

OLIVEIRA, G.E. *Influência da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e nos teores de aminas bioativas em ovos*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A. Ovos e produtos derivados. In: *Tecnologia De Alimentos. Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 269-279.

PEEBLES, E.D.; BRAKE, J. Relationship of eggshell porosity to stage of embryonic development in broiler breeders. *Poultry Science*; 64: 2388-2391. 1985.

PEEBLES, E.D.; McDANIEL, C.D. A practical manual for understanding the shell structure of broiler hatching eggs and measurements of their quality. Bulletin 1139, Abril 2004. Disponível em: <<http://msucares.com/pubs/bulletins/b1139.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

PEREIRA, D.F. et al. Correlations between thermal environment and egg quality of two layer commercial strains. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v. 10, n. 2, p. 81-88, Apr./Jun. 2008.

PERSSON, K. The effect of sodium chloride on eggshell quality in laying hens – A Review. Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Uppsala, 2009. Disponível em: <[http://stud.epsilon.slu.se/228/1/persson\\_k\\_090602.pdf](http://stud.epsilon.slu.se/228/1/persson_k_090602.pdf)>. Acesso em: 9 jun. 2013.

POLONE, G. Aspectos nutricionais relacionados à qualidade da casca dos ovos em poedeiras. Universidade Uniquímica, 2007. Disponível

em:<[http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=26235&tipo\\_tabela=cet&categoria=nutricao](http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=26235&tipo_tabela=cet&categoria=nutricao)>. Acesso em: 16/10/2013.

RADWAN, L.M.; GALAL, A.; FATHI, M.M. et al. Mechanical and ultrastructural properties of eggshell in two egyptian native breeds of chicken. *International Journal of Poultry Science*, v.9, n.1, p.77-81, 2010.

RAMOS, K. C. B. T.; CAMARGO, A. M.; OLIVEIRA, E. C. D.; CEDRO, T. M. M.; MORENZ, M. J. F. Avaliação da idade da poedeira, da temperatura de armazenamento e do tipo embalagem sobre a qualidade de ovos comerciais. *Rev. de Ci. Vida. Seropédica*, RJ, EDUR, v. 30, n. 2, jul-dez, 2010.

ROBERTS, J.R., 2004. Factors affecting egg internal quality and eggshell quality in laying hens. *J. Poult. Sci.*, 41: 161-177.

ROBERTS, J.R., 2010. Factors affecting egg shell quality and egg internal quality. 18th Annual ASAIM SE Asian Feed Technology and Nutrition Workshop, May 24-27, Le Meridien Siem Reap, Cambodia.

ROBINSON, D. S.; KING, N. R. 1970. The structure of the organic mammillary cores in some weak eggshells. *Br. Poult. Sci.* 11:39-44.

RODRIGUEZ-NAVARRO, A., O. Kalin, Y. Nys, and J. M. Garcia-Ruiz. 2002. Influence of the microstructure and crystallographic texture on the fracture strength of hen's eggshells. *Br. Poult. Sci.* 43:395-403.

ROMANOFF, A.L.; ROMANOFF, A.J. (Ed). *The Avian Egg*. New York: John Wiley and Sons, 1949. 918p.

ROSSI, M.; POMPEI, C. Changes in some egg components and analytical values due to hen age. *Poultry Science*, v.74, p.152-160, 1995.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; PAN, E.A. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. In: MACCARI, M.; MENDES, A.A. (Ed.) *Manejo de matrizes de corte*. Campinas: FACTA, 2005. cap.6, p.76-143.

SAMBROOK, J. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SAMLI, H.E.; SENKOYLU, N.; OZDUVEN, M.L. Effects of Storage Time on Egg Quality of Laying Hens Fed on the Diets with Various By-Product Oils from the Oilseed Extraction Refinery. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.5, n.2, p.406-409, 2006.

SANTOS, M. S. V. Avaliação do desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais, submetidas às dietas suplementadas com diferentes óleos vegetais. 2005. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SANTOS, M. S. V.; ESPÍNDOLA, G. B.; LÔBO, R. N. B.; FREITAS, E. R.; GUERRA, J. L. L.; SANTOS, A. B. E. Efeito da temperatura e estocagem em ovos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29(3): 513-517, jul.-set. 2009.

SAUVEUR, B. El huevo para consumo: bases productivas. Tradução por Carlos Buxadé Carbó. Barcelona: Aedos Editorial, 1993. 377 p.

SANTOS, F. F.; NASCIMENTO, E. R.; SOARES, M. V.; LOPES, H. P.; BRANDÃO, M. D. M.; BARRETO, M. L.; PEREIRA, V. L. A. Eggshell Apex Abnormalities in Free-range Layers Hens with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis Virus in Rio de Janeiro – Brazil. In: Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 19., 2012, Toulouse. *Anais...* Toulouse: International Organization for Mycoplasmaology, 2012. p. 120.

SCOTT, T.A.; SILVERSIDES, F.G. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poultry Science*, v.79, n.12, p.1725–1729, 2000.

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. *Fisiopatologia do sistema reprodutor*. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2009. Cap. 3.8, 1.104p.

SILVA, R. C.; DO NASCIMENTO, J. W. B.; Oliveira, D. L.; Camerini, N. L. ; Furtado, D. A.. Força de ruptura da casca do ovo em função das temperaturas da água e do ambiente. *Revista Educação Agrícola Superior*. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior - ABEAS - v.27, n.1, p.13-18, 2012. ISSN - 0101-756X - DOI: <http://dx.doi.org/10.12722/0101-756X.v27n01a02>.

SILVA, R.C.F.; PEREIRA, V.L.A.; BUIM, M.R.; SOARES, N.M.; BRANDAO, M.D.M.; NASCIMENTO, E.R. Quality of eggs from laying hens vaccinated with attenuated strain of *Mycoplasma synoviae*. In: XXIV World's Poultry Congress, 2012, Salvador/BA. *World's Poultry Science Journal*, v. 68, p. 01-04, 2012.

SILVERSIDES, F.G.; SCOTT, T.A. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poultry Science*, v.80, p. 1240-1245, 2001.

SILVERSIDES, F.G.; BUDGELL, K. The relationships among measures of egg albumen height, pH, and whipping volume. *Poultry Science*, v. 83, p. 1619-1623, 2004.

SOLOMON, S.E. *Egg & Eggshell quality*. Aylesbury: Wolfe Publishing, 1997, 149p.

SOLOMON, S.E. The eggshell: strength, structure and function Vigonac, 24310, Brantome, France. *British Poultry Science*, 51:S1,52-59, 2010. DOI: 10.1080/00071668.2010.497296.

STADELMAN, W.J.; COTTERILL, O.J. *Egg Science and Technology*. 4. ed. New York: The Haworth Press, 1994. 591 p.

SUMMERS, J.D.; LEESON, S. 1983. Factors influencing early egg size. *Poult. Sci.*, 62: 1155-1159.

SUN, C. J.; CHEN, S. R.; XU, G. Y.; Liu, X. M.; YANG, N. 2012. Global variation and uniformity of eggshell thickness for chicken eggs. *Poult. Sci.* 91:2718–2721.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos. Ed. Guanabara & Koogan, 11. ed., 856p, 1993.

TOGASHI, C.K.; KAKIMOTO, S.K.; SOARES, N.M. Avaliação dos danos nas cascas de ovos da postura ao processamento. *Avicultura Industrial*, n.05, p.41-4, 2009.

EBEID, T.; TŮMOVÁ, E. Effect of time of oviposition egg quality characteristics in cages and in a litter housing system. *Czech Journal of Animal Science*, Praga, v. 50, n. 3, p. 129–134, 2005.

EBEID, T. A.; SUZUKI, T.; SUGIYAMA, T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. *Poult. Sci.* 91:2282–2287, 2012.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBA. *Relatório Anual 2012 - 2013*. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/uba>>. Acesso em: 8 jan. 2014.

UNIÃO EUROPÉIA – UE. Commission Regulation (EC) nº 589, de 23 de junho 2008. Laying down detailed rules for implementing Council Regulation (EC) n. 1234/2007 as regards marketing standards for eggs. *Official Journal of the European Union*, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. *Egg-grading manual Agricultural Handbook*. Washington: Department of Agriculture. 2000. 56p. (Agricultural Marketing Service, 75). Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004502>>. Acesso em: 10 jul. 2013

VAN TOLEDO, B.; PARSONS, A.H.; COMBS, G.F. Role of ultrastructure in determining eggshell strength. *Poultry Science*, v.61, p.569–572, 1982.

VÉRAS, A. L.; VELLOSO, C. B. O.; MATIOTTI, T. G.; FARIA, T. C. Avaliação da qualidade interna de ovos armazenados em dois ambientes em diferentes tempos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Supl. 5, p. 55, 2000.

XAVIER, I.M.C.; CANÇADO, S.V.; FIGUEIREDO, T.C.; LARA, L.J.C.; LANA, A.M.Q.; SOUZA, M.R.; BAIÃO, N.C. Qualidade de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.4, p.953-959, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n4/26.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2013.

## 1 7 APÊNDICE

2

### 3 7.1 ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO POULTRY SCIENCE

4

5

#### 6 **THE EFFECT OF EGGSHELL APEX ABNORMALITIES ON EGG QUALITY**

7

#### 8 **The effect of eggshell apex abnormalities on table egg quality during storage in two** 9 **seasons of the year**

10

#### 11 **ABSTRACT**

12 *Mycoplasma synoviae* infection of hens has been associated with problems of eggshell quality  
13 called eggshell apex abnormalities (**EAA**). Little is known about the quality of EAA eggs  
14 from a commercial point of view, especially during their storage. The study aimed to examine  
15 the differences between EAA and normal eggs during storage under controlled conditions in  
16 two seasons, summer and winter, by comparing internal and external quality parameters. In a  
17 conventional egg production farm with white laying hens of varying ages in the city of  
18 Bastos, state of São Paulo, Brazil, 232 eggs were used in the summer season and 400 eggs in  
19 the winter season. Half of the eggs had EAA, and the other half were considered normal eggs  
20 for each season. The eggs were analyzed at 2, 7, 14, 21 and 28 days after being laid and  
21 stored from 24.6°C to 25.8°C in summer and from 24°C to 25°C in winter. There was no  
22 difference ( $P > 0.05$ ) in the average egg weight between EAA and normal eggs at any studied  
23 time point, but in both seasons, the weight loss in EAA eggs was higher than in normal eggs.  
24 The losses in Haugh unit (**HU**) scores from the first to the last measurements were  
25 approximately 40% regardless of egg type or season of production. In comparing eggshell



26 thickness, only the apices of the EAA eggs were thinner ( $P < 0.0001$ ) than normal eggs in the  
27 summer, but in the winter, the EAA egg apices ( $P < 0.0001$ ) and sides ( $P = 0.03$ ) were both  
28 thinner. The presence of EAA did not affect the eggshell weight ( $P > 0.05$ ) or eggshell  
29 percentage ( $P > 0.05$ ). The eggshell strength of the EAA eggs was lower ( $P < 0.0001$ ) than  
30 normal eggs in both the summer (16.57%) and winter (19.86%). The presence of EAA did not  
31 affect the internal quality of the egg, but was related to a greater loss of external quality and  
32 weight during storage.

33

34 Keywords: *Mycoplasma synoviae*, eggshell strength, egg weight, eggshell thickness

35

36

## INTRODUCTION

37 The quality of table eggs can be affected by many factors, including infectious  
38 bronchitis virus (**IBV**) and *Mycoplasma* infections. IBV is well known as a cause of eggshell  
39 and albumen problems and decreased egg production. *Mycoplasma gallisepticum* (**MG**)  
40 infection is characterized by chronic respiratory disease and is associated with reduced feed  
41 intake and egg production efficiencies. *Mycoplasma synoviae* (**MS**) is classically related to  
42 arthritic and respiratory symptoms (Kleven, 2003), but recently, it has been associated with  
43 eggshell apex abnormalities (**EAA**) (Feberwee et al., 2009a).

44 EAAs are related to infection by MS in the oviduct of layers, leading to the production  
45 of eggs characterized by a roughened shell surface, shell thinning and increased translucency  
46 that is confined to the thin end of the egg, and there is almost always a very clear demarcation  
47 zone. The proportion of affected eggs can be as high as 25%, resulting in economic losses due  
48 to higher susceptibility to breaks and cracking (Feberwee et al., 2009a). Previous studies

49 investigating EAA have only addressed the epidemiology and etiology of the disease  
50 (Feberwee et al., 2009a; Feberwee et al., 2009b); therefore, little is known about the quality of  
51 EAA eggs from a commercial point of view, especially during their storage.

52 Table eggs are of great importance as food and in marketed products; thus, there have  
53 always been concerns about their quality. Evaluation of egg weight alone is not an indicator  
54 of nutritional quality; however, it is used to standardize the marketing and classification of  
55 eggs (USDA, 2000). The loss of humidity by the eggs during storage affects egg weight and is  
56 influenced by the eggshell quality (Peebles and Brake, 1987). The internal quality of eggs  
57 normally decreases over time. Storage temperature and humidity are the main factors that  
58 influence in the rate of these changes (Coutts and Wilson, 2007). Internal quality is not only a  
59 measurement of egg freshness but also an important indicator of deterioration of its functional  
60 properties (Jones, 2007). External quality is of great importance for producers because 6% to  
61 20% of eggs produced by laying hens are lost due to poor shell quality (Roland, 1988;  
62 Mertens et al., 2006; Coutts and Wilson, 2007). External quality does not change during  
63 storage (Jones and Musgrove, 2005), but it can be affected during eggshell formation by a  
64 hen's genetics, diet, age and environmental conditions (Coutts and Wilson, 2007).

65 The objective of this study was to examine differences between EAA and normal eggs  
66 by comparing internal and external quality parameters during storage under controlled  
67 conditions in two seasons, summer and winter.

68

69

## MATERIAL AND METHODS

70

71 *Egg production conditions*

72           Sampling was performed in a conventional battery cage egg commercial farm with  
73 white Lohmann laying hens of varying ages in the city of Bastos, state of São Paulo, Brazil, in  
74 2 seasons: summer, in November 2012, when the average ambient temperature was 27.2°C;  
75 and winter, in July 2013, when the average ambient temperature was 12.3°C.

76           The use of animals for sample collection was approved by the Ethics Committee on  
77 Animal Use of the Universidade Federal Fluminense under registration number 199. The hens  
78 had been vaccinated against IBV and MG but not against MS. PCR was performed to test for  
79 mycoplasmas and ELISA was performed to test for MS and IBV to evaluate the sanitary  
80 status of the farm. The sampling was based on the prevalence estimated by Buim et al. (2009).

81           Tracheal swabs from 10 hens in two flocks were collected and transported in Frey  
82 media to detect MS and MG by PCR. The tubes containing the tracheal swabs were  
83 homogenized and centrifuged at 10,000 g for 10 minutes, the supernatants were removed, and  
84 the pellets were resuspended in 200 µL of PBS. DNA was extracted by the phenol-chloroform  
85 method (Sambrook et al., 1989). To detect MS, the primers used were 5'-GAG AAG CAA  
86 AAT AGT GAT ATC A-3' and 5'-CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A-3', which  
87 amplify a 211-bp product (Lauerman, 1998). To detect MG, the primers used were 5'-GGA  
88 TCC CAT CTC GAC CAC GAG AAA A-3' and 5'-CTT TTC AAT CAG TGA GTA ACT  
89 GAT GA-3', which amplify a 732-bp product (Nascimento et al., 1991).

90           The mix for the MS and MG PCRs contained 5 µL of 10X PCR buffer, 200 µM each  
91 of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 5 pM of each primer, 1 U of Taq  
92 polymerase, 5 µL of the sample DNA and water to a final volume of 50 µL. The tubes were  
93 denatured at 94°C for five minutes, followed by 40 cycles of 94°C for one minute, 55°C for  
94 one minute and 72°C for two minutes, and a final extension of 72°C for five minutes. The

95 amplified DNA products were visualized by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with  
96 ethidium bromide in  $0.5 \times$  TBE buffer.

97 A comparative blood sampling analysis collected from the brachial vein of 15 hens  
98 was performed in both sampling seasons, and the samples were collected after a four-week  
99 interval. The sera were tested for MS and IBV using commercial ELISA kits (IDEXX  
100 Laboratories, Inc., Maine, USA) to detect specific antibodies according to the manufacturer's  
101 instructions.

102

### 103 *Egg quality analysis*

104 A total of 232 eggs in the summer season and 400 eggs in the winter season were used,  
105 with half of the eggs having EAA and the other half considered normal in each season. The  
106 sample size in the summer season was smaller because the incidence of EAA was lower on  
107 the day of sampling. The eggs were washed following Brazilian Federal laws, by using a  
108 maximum of 50 ppm chlorinated water at environmental temperature and pH between 6.0 and  
109 9.5. After the washing step, the eggs were selected by candling in the classification room and  
110 packed into pulp cartons. Eggs with EAA were collected after visualization of their specific  
111 characteristics as described by Feberwee et al. (2009a), while normal eggs were considered  
112 the eggs that did not have any abnormalities.

113 The eggs of each type, EAA and normal, were divided into five groups of similar  
114 weights and identified individually. The initial weights were statistically similar among all of  
115 the groups and types of eggs for each season. The groups were identified according to each  
116 period of analysis: 2, 7, 14, 21 and 28 days after being laid.

117           The eggs were stored in a room with controlled temperature and humidity, and the  
118 maximum and minimum values were recorded daily. In summer, the average minimum and  
119 maximum temperatures of the storage room were 24.6°C and 25.8°C, respectively, and the  
120 average minimum and maximum relative humidities were 59% and 69%, respectively. In  
121 winter, the average minimum and maximum temperatures of the storage room were 24°C and  
122 25°C, respectively, and the average minimum and maximum relative humidities were 66%  
123 and 73%, respectively.

124           To evaluate the weight changes, all of the eggs were weighed weekly, and one group  
125 of each type was analyzed for the other quality parameter tests. The egg weights, eggshell  
126 strengths, eggshell thicknesses, and Haugh unit (**HU**) scores were obtained using the Digital  
127 Egg Tester 6000 (Nabel, Tokyo, Japan). Eggshell strength was determined by compressing  
128 the egg horizontally with a flat crosshead against a flat surface at the speed of 5 mm/s until it  
129 cracked, being registered the last value before a sudden drop in compression force. The HU  
130 score was calculated using a simplified formula (Eisen et al., 1962) that included the albumen  
131 height measured at the midpoint between the yolk and the limit of the dense albumen as well  
132 as the egg weight as previously measured.

133           The eggshells were cleaned and dried at room temperature for two days and then  
134 weighed on a high-precision scale (BEL Engineering<sup>®</sup>). After weighing, the eggshell  
135 thickness was measured with the Mitutoyo Absolute ID-C 543-400B micrometer (Mitutoyo  
136 Corp.) at three points: the bottom (blunt end), side and apex (sharp end).

137           Simple comparisons of mean values between EAA and normal eggs for the egg quality  
138 parameters and between ELISA titers were compared using the Mann-Whitney test. Multiple  
139 comparisons between means for the period of analysis for each egg type were made using the

140 Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. Correlations among curves  
141 of HU and weight loss means were performed by comparing best-fit values. All of the data  
142 analysis was accomplished using GraphPad Prism<sup>®</sup> version 5.00 (GraphPad Software, La  
143 Jolla, CA).

144

145

## RESULTS AND DISCUSSION

### 146 *Egg production conditions*

147 From the 10 swabs used for mycoplasma detection by PCR in each season, five were  
148 positive in the summer for MS, and four were positive in the winter. None of them were  
149 positive for MG.

150 The antibody titers against MS increased in the summer from a geometric mean (GM)  
151 of 8,613 (CV=49.5) to 16,842 (CV=25.9) ( $P < 0.0001$ ), while titers against IBV decreased  
152 from 4,909 (CV=33.9) to 2,007 (CV=42.6) ( $P < 0.0001$ ). These results were repeated in the  
153 winter, with the GM rising from 1,810 (CV=104.2) to 3,714 (CV=43.8) ( $P = 0.0016$ ) for MS  
154 and decreasing from 4,297 (CV=32.0) to 3,380 (CV=46.6) ( $P = 0.0977$ ) for IBV.

155 These results suggest infection by MS and a good serological response to IBV  
156 vaccination.

157

### 158 *Egg quality analysis*

159

160 *Egg weight.* There was no significant difference in the average egg weight between  
161 EAA and normal eggs at any of the studied time points for both seasons, which indicates that  
162 EAA did not influence egg weight during storage. Regarding the effect of storage on egg

163 weight, for both types of eggs, the weight was significantly lower after 21 days of storage in  
164 the summer and 14 days in the winter (Table 1). The results were similar, but in the winter,  
165 the changes in weight were more evident because the sample included a higher number of  
166 eggs.

167 EAA eggs had a higher cumulative egg weight loss during storage for all of the days  
168 studied for both seasons (Table 1). In the summer season, normal eggs lost 2.51g in 28 days  
169 of storage while EAA eggs lost 3.51g; therefore a loss of 39.84% higher than the normal eggs.  
170 Similar percentage was obtained in the winter season, when normal eggs lost 1.76g and EAA  
171 eggs lost 2.44g, i.e, an increase of 38.64%. This difference might have occurred because the  
172 thinner eggshell at the apex allowed a higher rate of water vapor passage through the eggshell.  
173 Eggshell thickness is negatively related to eggshell water conductance (Peebles and Brake,  
174 1987). Egg weight is an important quality parameter because egg classification affects retail  
175 prices.

176 Even with different absolute values, in both seasons, the approximately 40% higher  
177 weight loss for EAA eggs, indicates that EAA had the same effect on weight loss regardless  
178 of the season in which the eggs were produced. This result was also observed after  
179 comparison of the regression equations generated for the means of the egg weight losses,  
180 which were also different ( $P < 0.05$ ).

181

182 ***Internal quality.*** Regarding the HU results for each egg type and season, there was a  
183 significant loss during the storage period, as expected (Eisen et al., 1962; Jones and  
184 Musgrove, 2005). With the exception of the 2<sup>nd</sup> and 14<sup>th</sup> days of storage in the winter, there  
185 was no difference between values obtained for EAA and normal eggs (Table 2). The losses in

186 HU scores from the first to the last measurement were approximately 40% regardless of egg  
187 type or season of production; therefore, the EAA did not affect the rate of HU loss during egg  
188 storage. Feberwee et al. (2009a) also did not detect any influence of EAA on HU means.

189 When analyzing the adequacy best-fit values of the curves for a common nonlinear  
190 regression obtained for the HU scores of EAA and normal eggs, a single regression was able  
191 to explain all of the values found ( $P > 0.05$ ). The regression line is described by  $Y = 90.36 -$   
192  $16.35(x) + 1.51(x)^2$ ;  $r^2 = 0.96$  (Figure 1).

193

194 **External quality.** The means from all of the days of analysis showed no differences ( $P$   
195  $> 0.05$ ) for the eggshell quality results for thickness, weight, percentage and strength. Jones  
196 and Musgrove (2005) also observed that eggshell strength did not change throughout the  
197 storage period. For this reason, the eggshell analyses were performed using all of the data  
198 from the five days of analysis to generate a single average to increase the statistical strength.

199 In comparing the measurement points of eggshell thickness for the same egg types, the  
200 values of the sides were usually higher than of the apex and the bottom, as observed by Sun et  
201 al. (2012). In the summer, there was no difference ( $P > 0.05$ ) among the means for normal  
202 eggs, but for EAA eggs, the mean eggshell thickness of the side was higher than of the apex  
203 ( $P < 0.001$ ) or bottom ( $P < 0.01$ ). The same pattern observed in the summer was also  
204 observed in the winter; however, the differences among the points of the eggshell in the  
205 winter were more pronounced. The mean eggshell thickness of the side was higher than of the  
206 apex ( $P < 0.05$ ) or bottom ( $P < 0.001$ ) for normal eggs, while for EAA eggs, there were  
207 differences among all three means: the side thickness was higher than the apex ( $P < 0.001$ ) or  
208 bottom ( $P < 0.05$ ), and the bottom thickness was higher than the apex ( $P < 0.01$ ) (Table 3).



209 The thinner eggshell in the summer also could have occurred due to the higher ambient  
210 temperatures to which the hens were exposed because thermal comfort interferes with egg  
211 production and quality (Mahmoud et al., 1996; Ebeid et al., 2012).

212 In analyzing the differences between egg types in the summer, the apices of the EAA  
213 eggs were thinner ( $P < 0.0001$ ) than normal eggs, but in the winter, the EAA apices ( $P <$   
214  $0.0001$ ) and sides ( $P = 0.03$ ) were thinner. Feberwee et al. (2009a) also observed a significant  
215 difference between EAA and unaffected eggs on scanning electron microscopy. Even though  
216 this result was expected because the eggs were selected based on being more translucent  
217 (indicating a thinner shell), these values are important to quantify these changes and establish  
218 their relationship to other characteristics, such as eggshell strength and eggshell weight.

219 Considering overall thickness, there was no difference in the summer ( $P > 0.05$ ), but  
220 in the winter EAA eggs had thinner eggshells ( $P = 0.0003$ ) than normal eggs (Table 3).  
221 Because of the thicker eggshell in the winter, the differences between the EAA and normal  
222 eggs were more pronounced, resulting in a statistical difference. A difference in overall  
223 thickness was also observed between hens experimentally infected with MS and the control  
224 group (Feberwee et al., 2009a).

225 The presence of EAA in eggs did not affect the eggshell weight ( $P > 0.05$ ) or eggshell  
226 percentage ( $P > 0.05$ ). Considering the effect of the season, the eggshell percentage was lower  
227 ( $P < 0.0001$ ) in the summer, but there was no difference in eggshell weight ( $P > 0.05$ ). The  
228 lower eggshell percentage could also be explained by the higher ambient temperatures in the  
229 summer. The eggshell weight may not be a good parameter for comparisons because eggs are  
230 heavier in the summer; thus, the eggshell percentage would be more appropriate.

231           The eggshell strengths were: 39.83 and 33.23 in the summer season respectively for  
232 normal and EAA eggs; while in the winter season the values were 41.00 and 32.86. The  
233 eggshell strength of EAA eggs was lower ( $P < 0.0001$ ) than normal eggs (16.57% in the  
234 summer and 19.86% in the winter). The parameter that had the most variation was eggshell  
235 thickness at the apex; hence, it can be inferred that the lower eggshell strength was mostly  
236 related to the lower eggshell thickness at the apex. Feberwee et al. (2009b) also observed a  
237 reduction of 32.34% to 34.86% in the eggshell strength of EAA eggs from hens  
238 experimentally infected with MS. It should be highlighted that normal eggs from hens  
239 infected with MS are also affected and also have a lower eggshell strength (Ferberwee et al.,  
240 2009b, Gole et al., 2012; Silva et al., 2012).

241           Eggshell quality for table eggs is important, especially higher eggshell thickness and  
242 eggshell strength, because eggshells with those characteristics have a lower probability of  
243 having cracks or breaking between being laid and being purchased by the final consumer.

244           In summary, the presence of EAA, although they did not affect the internal quality of  
245 the egg, was related to a loss of external quality. EAA were associated with a greater weight  
246 loss in table eggs during storage, regardless of the season of production, as well as with a  
247 thinner apex of the eggshell and a significant decrease in eggshell strength, which cause  
248 higher loss during processing and transportation. These results demonstrate the importance of  
249 *Mycoplasma synoviae* control in flocks of laying hen with a new focus on the interference of  
250 infection in the quality of table eggs and with the aim of reducing losses and improving the  
251 quality of eggs.

252

253

## ACKNOWLEDGEMENTS

254 Authors thank CNPq and FAPERJ for the financial support.

255

256

## REFERENCES

257 Buim, M.R., E. Mettifogo, J. Timenetsky, S. Kleven, and A. J. P. Ferreira. 2009.

258 Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex

259 PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet. Bras.* 29:552-556.

260

261 Coutts, J. A., and G. C. Wilson. 2007. Optimum Egg Quality: A practical approach. 5M

262 Publishing, Sheffield, UK.

263

264 Ebeid, T. A., T. Suzuki, and T. Sugiyama. 2012. High ambient temperature influences

265 eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments

266 of laying hens. *Poult. Sci.* 91:2282–2287.

267

268 Eisen, E. J., B. B. Bohren, and H. E. McKean. 1962. The Haugh unit as a measure of egg

269 albumen quality. *Poult. Sci.* 41:1461-1468.

270

271 Feberwee, A., C. J. Morrow, S. A. Ghorashi, A. H. Noormohammadi, and W. J. M. Landman.

272 2009b. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex

273 abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious

274 bronchitis virus D1466. *Avian Pathol.* 38:333-340.

275

- 276 Feberwee, A., J. J. Wit, and W. J. M. Landman. 2009a. Induction of eggshell apex  
277 abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 38:77-  
278 85.
- 279
- 280 Gole, V. C., K. K. Chousalkar, and J. R. Roberts. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma*  
281 *synoviae* in laying hens and possible effects on egg shell quality. *Prev. Vet. Med.* 106:75–78.
- 282
- 283 Mahmoud, K. Z., M. M. Beck, S. E. Scheideler, M. F. Forman, K. P. Anderson, and S. D.  
284 Kachman. 1996. Acute high environmental temperature and calcium-estrogen relationships in  
285 the hen. *Poult. Sci.* 75:1555-1562.
- 286
- 287 Jones D. R. 2007. Egg functionality and quality during long-term storage. *Int. J, Poult. Sci.*  
288 6:157-162.
- 289
- 290 Jones, D. R., and M. T. Musgrove. 2005. Effects of extended storage on egg quality factors.  
291 *Poult. Sci.* 84:1774–1777.
- 292
- 293 Lauerma, L. H. 1998. *Mycoplasma* PCR Assays: Nucleic Acid Amplifications Assays for  
294 diagnosis of animal diseases. Department of Agriculture and Industries, Alabama.
- 295
- 296 Mertens, K., F. Bamelis, B. Kemps, B. Kamers, E. Verhoelst, B. De Ketelaere, M. Bain, E.  
297 Decuypere, and J. De Baerdemaeker. 1991. Monitoring of eggshell breakage and eggshell  
298 strength in different production chains of consumption eggs. *Poult. Sci.* 85:1670–1677.

299

300 Peebles, E. D., and J. Brake. 1987. Eggshell quality and hatchability in broiler breeders. *Poult.*

301 *Sci.* 66:596-604.

302

303 Kleven, S. H. 2003. *Mycoplasma synoviae* infections. Pages 756-766 in *Diseases of Poultry*.

304 Saif Y. M. ed. Iowa, USA.

305

306 Sambrook, J, E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

307 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

308

309 Silva, R. C. F., V. L. A. Pereira, M. R. Buim, N. M. Soares, M. D. M. Brandão, E. R.

310 Nascimento. 2012. Quality of eggs from laying hens vaccinated with attenuated strain of

311 *Mycoplasma synoviae*. *Proc. XXIV World's Poultry Congress*. 30-33. (Abstr.)

312

313 Nascimento, E. R., R. Yamamoto, K. R. Herrick, and R. C. Tait. 1991. Polymerase Chain

314 Reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 35:62-9.

315

316 Roland, D. A. 1988. Egg shell problems: Estimates of incidence and economic impact. *Poult.*

317 *Sci.* 67:1801-1803.

318

319 United States Department of Agriculture, Agricultural and Marketing Service. 2000. *Egg-*

320 *Grading Manual*. Agricultural Handbook Number 75. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

321

- 322 Sun, C. J., S. R. Chen, G. Y. Xu, X. M. Liu, and N. Yang. 2012. Global variation and  
323 uniformity of eggshell thickness for chicken eggs. *Poult. Sci.* 91:2718-2721.

**Table 1.** Mean values of egg quality parameters for weight of eggs with EAA<sup>1</sup> and normal eggs relative to days of storage in the summer and winter seasons.

Days of storage	n	Egg weight (g)		Egg weight loss (g) <sup>2</sup>		Egg weight loss (%) <sup>2</sup>	
		Normal	EAA	Normal	EAA	Normal	EAA
Summer							
2	116	62.24 <sup>A</sup>	62.16 <sup>A</sup>	-	-	-	-
7	91	61.94 <sup>A</sup>	61.83 <sup>A</sup>	0.27 <sup>bA</sup>	0.36 <sup>aA</sup>	0.43	0.58
14	65	61.38 <sup>A,B</sup>	60.99 <sup>A,B</sup>	1.00 <sup>bB</sup>	1.29 <sup>aB</sup>	1.61	2.07
21	42	60.56 <sup>B,C</sup>	59.99 <sup>B</sup>	1.82 <sup>bC</sup>	2.3 <sup>aC</sup>	2.92	3.70
28	21	59.37 <sup>C</sup>	58.45 <sup>B</sup>	2.51 <sup>bD</sup>	3.51 <sup>aD</sup>	4.04	5.65
Winter							
2	200	60.15 <sup>A</sup>	60.34 <sup>A</sup>	-	-	-	-
7	165	59.89 <sup>A</sup>	59.77 <sup>A,B</sup>	0.37 <sup>bA</sup>	0.56 <sup>aA</sup>	0.62	0.93
14	120	58.86 <sup>B</sup>	58.63 <sup>B,C</sup>	0.85 <sup>bB</sup>	1.21 <sup>aB</sup>	1.41	2.00
21	82	58.58 <sup>B,C</sup>	58.02 <sup>C</sup>	1.4 <sup>bC</sup>	1.94 <sup>aC</sup>	2.33	3.21
28	42	57.71 <sup>C</sup>	56.94 <sup>C</sup>	1.76 <sup>bD</sup>	2.44 <sup>aD</sup>	2.92	4.04

<sup>a-b</sup>Means within a line and an egg quality parameter lacking a common superscript differ (Mann-Whitney;  $P < 0.05$ ). <sup>A-D</sup> Means within a column and a type of egg lacking a common superscript differ (Kruskal-Wallis/Dunn;  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>EAA = eggshell apex abnormalities.

<sup>2</sup>Compared with the value obtained at day 2.

**Table 2.** Mean values of Haugh units of eggs with EAA<sup>1</sup> and normal eggs relative to days of storage in the summer and winter seasons.

Days of storage	n	Haugh unit		Haugh unit loss (%) <sup>2</sup>	
		Normal	EAA	Normal	EAA
Summer					
2	25	73.97 <sup>A</sup>	72.42 <sup>A</sup>	-	-
7	26	62.10 <sup>B</sup>	60.37 <sup>A,B</sup>	16.05	16.64
14	23	56.54 <sup>B,C</sup>	52.77 <sup>B,C</sup>	23.57	27.13
21	21	48.14 <sup>C</sup>	46.91 <sup>C</sup>	34.92	35.23
28	21	45.20 <sup>C</sup>	45.20 <sup>C</sup>	38.89	37.58
Winter					
2	35	80.10 <sup>aA</sup>	76.76 <sup>bA</sup>	-	-
7	45	63.20 <sup>aB</sup>	64.93 <sup>aB</sup>	20.99	15.42
14	38	60.23 <sup>aB</sup>	55.64 <sup>bC</sup>	24.80	27.52
21	40	50.51 <sup>aC</sup>	47.77 <sup>aC,D</sup>	36.95	37.76
28	42	48.66 <sup>aC</sup>	47.16 <sup>aD</sup>	39.25	38.57

<sup>a-b</sup>Means within a line and an egg quality parameter lacking a common superscript differ (Mann-Whitney;  $P < 0.05$ ). <sup>A-D</sup>Means within a column and a type of egg lacking a common superscript differ (Kruskal-Wallis/Dunn;  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>EAA = eggshell apex abnormalities.

<sup>2</sup>Compared with the value obtained at day 2.



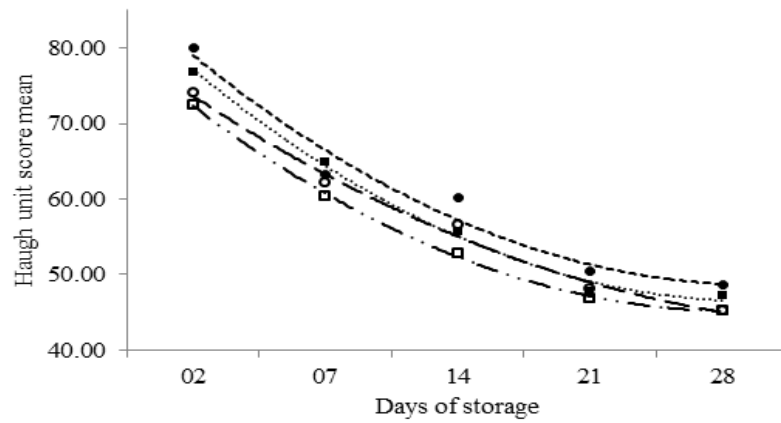
**Table 3.** Mean values of egg quality parameters for eggshell thickness and eggshell strength for eggs with EAA<sup>1</sup> and normal eggs in the summer and winter seasons.

	Normal	EAA	Absolute difference <sup>2</sup>	Percent difference <sup>2</sup> (%)
<b>Summer</b>				
Apex thickness (µm)	368.8 <sup>aA</sup>	354.5 <sup>bB</sup>	1.43	3.88
Side thickness (µm)	367.7 <sup>aA</sup>	370.9 <sup>aA</sup>	-0.32	-0.87
Bottom thickness (µm)	361.7 <sup>aA</sup>	359.3 <sup>aB</sup>	0.23	0.65
Mean eggshell thickness (µm)	366.0 <sup>a</sup>	361.6 <sup>a</sup>	0.45	1.22
Eggshell weight (g)	5.81 <sup>a</sup>	5.73 <sup>a</sup>	0.09	1.53
Eggshell percentage (%)	9.34% <sup>a</sup>	9.21% <sup>a</sup>	-	0.13
Eggshell strength (N)	39.83 <sup>a</sup>	33.23 <sup>b</sup>	6.60	16.57
<b>Winter</b>				
Apex thickness (µm)	390.6 <sup>aB</sup>	369.7 <sup>bC</sup>	2.09	5.35
Side thickness (µm)	398.9 <sup>aA</sup>	392.2 <sup>bA</sup>	0.67	1.69
Bottom thickness (µm)	387.0 <sup>aB</sup>	382.9 <sup>aB</sup>	0.41	1.06
Mean eggshell thickness (µm)	392.2 <sup>a</sup>	381.6 <sup>b</sup>	1.06	2.70
Eggshell weight (g)	5.86 <sup>a</sup>	5.78 <sup>a</sup>	0.08	1.35
Eggshell percentage (%)	9.89% <sup>a</sup>	9.77% <sup>a</sup>	-	0.12
Eggshell strength (N)	41.00 <sup>a</sup>	32.86 <sup>b</sup>	8.14	19.86

<sup>a-b</sup>Means within a line and an egg quality parameter lacking a common superscript differ (Mann-Whitney;  $P < 0.05$ ). <sup>A-D</sup>Means within a column and a type of egg lacking a common superscript differ (Kruskal-Wallis/Dunn;  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>EAA = eggshell apex abnormalities.

<sup>2</sup>Compared with the value obtained at day 2.



**Figure 1.** Weight loss means during storage of normal eggs in the summer (NS = ○) and winter (NW = ●) seasons and of eggshell apex abnormality (EAA) eggs in the summer (EAAS = □) and winter (EAAW = ■) seasons. Trend lines for each egg type are represented (NS = ----; NW = --- ; EAAS = -·-·-·- ; EAAW = ···).