

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AQUECIMENTO E ARMAZENAMENTO PRÉ-INCUBAÇÃO  
DE OVOS DE CODORNAS JAPONESAS

Autora: Marina Ximenes de Lima Oliveira  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março – 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AQUECIMENTO E ARMAZENAMENTO PRÉ-INCUBAÇÃO  
DE OVOS DE CODORNAS JAPONESAS

Autora: Marina Ximenes de Lima Oliveira  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março – 2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

O48a Oliveira, Marina Ximenes de Lima  
Aquecimento e armazenamento pré-incubação de ovos de codornas japonesas /  
Marina Ximenes de Lima Oliveira. -- Maringá, PR, 2022.  
88 f.: il., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências  
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2022.

1. Codornas (*Coturnix coturnix japonica*) - Desempenho reprodutivo. 2. Codornas -  
(*Coturnix coturnix japonica*) - Ovos. 3. Codornas - (*Coturnix coturnix japonica*) -  
Armazenamento de ovos. I. Santos, Tatiana Carlesso dos, orient. II. Universidade Estadual  
de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III.  
Título.

CDD 23.ed. 636.6




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

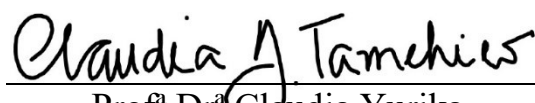
AQUECIMENTO E ARMAZENAMENTO PRÉ-INCUBAÇÃO  
DE OVOS DE CODORNAS JAPONESAS

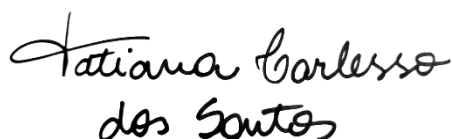
Autora: Marina Ximenes de Lima Oliveira  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de concentração - Produção  
Animal

APROVADA em 31 de março de 2022.

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simara Marcia Marcato

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Yurika  
Tamehiro



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos  
Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido força, sabedoria e muita resiliência.

A todos os membros da minha família que mesmo de longe me apoiaram e me ajudaram em todas as circunstâncias.

À minha mãe, Maria da Conceição Lacerda e ao meu irmão, Aurino Ximenes Júnior, que cuidaram de mim e estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de mestrado que viabilizou a estadia na cidade.

À professora Dr<sup>a</sup> Tatiana Carlesso dos Santos, pela orientação e por todos os ensinamentos durante o mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia e a todos os funcionários da Fazenda Experimental Iguatemi.

Ao meu companheiro de vida, Alan Castro por todo cuidado, carinho, amor e apoio incondicional que me concedeu ao longo dessa etapa.

A todos os colegas que me auxiliaram em todas as etapas do meu trabalho. Sem a colaboração de vocês, este trabalho não seria desenvolvido.

Aos amigos queridos que acompanharam a minha trajetória e confiaram no meu potencial. Eu amo vocês.

## BIOGRAFIA

Marina Ximenes de Lima Oliveira, filha de Maria da Conceição Lacerda de Lima Oliveira e Aurino Ximenes de Oliveira, nasceu em Recife-PE, no dia 04 de maio de 1996.

Concluiu sua graduação em Zootecnia pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, câmpus Recife em 12 de novembro de 2019.

Em março de 2020, ingressou no mestrado através do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração - Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá.

No mês de março de 2022, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

## ÍNDICE

	Páginas
LISTADE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
I – INTRODUÇÃO.....	13
1. Revisão bibliográfica.....	14
1.1 Idade da matriz.....	14
1.2 Qualidade dos ovos incubáveis.....	15
1.3 Pré-aquecimento dos ovos férteis.....	18
1.4 Efeitos do armazenamento dos ovos sobre o desenvolvimento embrionário.....	20
1.5 Processo de incubação artificial e seus fatores físicos.....	21
1.5.1 Temperatura .....	23
1.5.2 Umidade relativa .....	23
1.5.3 Viragem dos ovos .....	24
1.5.4 Trocas gasosas .....	25
1.6 Desenvolvimento embrionário .....	26
1.7 Referências .....	29
II – OBJETIVOS GERAIS.....	40

III – INFLUENCE OF BREEDERS AGE ON INITIAL EMBRYONIC DEVELOPMENT (FROM 0 TO 72 HRS) OF JAPANESE QUAILS DURING INCUBATIO.....	41
Abstract .....	41
Introduction.....	42
Materials and Methods.....	43
Results .....	45
Discussion .....	50
Conclusions .....	51
References .....	51
IV - EFFECTS OF SHORT HEATING PERIODS DURING FERTILE EGG STORAGE ON QUAIL EMBRYONIC DEVELOPMENT, INCUBATION PERFORMANCE, CHICK QUALITY AND CHICK PERFORMANCE UP TO 35 DAYS OF AGE.....	57
Abstract .....	57
Introduction .....	58
Materials and Methods.....	59
Results .....	65
Discussion .....	68
Conclusions .....	75
References .....	75
V- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

TABELA 1. Principais características no desenvolvimento de codornas.....	28
--	----

### Chapter III

TABLE 1. Mean characteristics of eggs from 31, 39, 48 and 59 weeks old breeder.....	46
TABLE 2. Mean classification of embryos from Japanese quail breeders at 31, 39, 48 and 59 weeks of age incubated After Laying to 72 hours.....	48

### Chapter IV

TABLE 1. Composition of experimental diets for quails in the initial phase, in growth and laying.....	82
TABLE 2. Quality and embryonic development in eggs submitted to preheating before incubation and different storage periods in Japanese quails (n=20).....	83
TABLE 3. Incubation performance of eggs submitted to preheating before incubation and different storage periods in Japanese quails.....	84
TABLE 4. Progeny quality (n=50) and organ morphometry (n=20) of Japanese quails from eggs submitted to preheating before incubation and different storage periods.....	85

TABLE 5. Productive performance of Japanese quail progeny (n=20) from eggs submitted to pre-heating before incubation and different storage periods.....	86
--	----

## LISTA DE FIGURAS

### Chapter III

FIGURE 1. Japanese quail embryo collected at laying and classified in stage XI. ....	55
FIGURE 2. Japanese quail embryo incubated for 24 hours in an artificial incubator at 37.4°C and classified at stage HH 6.....	55
FIGURE 3. Japanese quail embryos classified in HH stages between 12 and 13 with 48 hours of artificial incubation at 37.4°C.....	56
FIGURE 4. Japanese quail embryo classified at stage HH 18 of development with 72 hours of artificial incubation at 37.4°C.....	56

### Chapter IV

FIGURE 1. Japanese quail embryos classified in stages X and XI.....	87
FIGURE 2. Embryos of Japanese quails classified in stages XII and XIII.....	87

## RESUMO

Foram investigados os efeitos da idade das matrizes e do armazenamento prolongado dos ovos férteis de codornas japonesas. No primeiro experimento (I), os efeitos da idade das matrizes de codornas japonesas foram analisados sobre os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (de 0 a 72 horas). Foram utilizados 203 reprodutores de codornas japonesas alojadas em 29 gaiolas de postura convencionais com cinco fêmeas e dois machos com 31, 39, 48 e 59 semanas de idade e os ovos férteis provenientes dessas matrizes foram incubados imediatamente após a postura e foram analisados com 0, 24, 48 e 72 horas de incubação, assim como foram determinadas as variáveis comprimento, largura, volume e área dos ovos. Para a classificação dos embriões do grupo 0 horas, foi utilizada a escala de Eyal-Giladi e Kochav (1975) que classificam os embriões em números romanos de I a XIV e para os grupos 24, 48 e 72 horas foi utilizada a tabela HH de Hamburguer e Hamilton (1951), que classifica os embriões em 46 estágios. Nos períodos de incubação de 0, 24, 48, e 72 horas de incubação foram evidenciadas as seguintes médias de estágios de desenvolvimento embrionário: XI, HH6,1; HH12,7 e HH18,5 respectivamente, não havendo efeito da idade das matrizes. Conclui-se que entre 31 e 59 semanas os ovos tornam-se mais pesados, longos e largos, com maior volume e área e que a idade não afeta o desenvolvimento dos embriões até 72 horas em codornas japonesas. No segundo experimento (II), foram investigados os efeitos do pré-aquecimento de ovos férteis de codornas japonesas durante o armazenamento sobre o desenvolvimento embrionário, desempenho da incubação, qualidade dos pintinhos eclodidos e desempenho dos pintinhos até 35 dias de idade. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $3 \times 2 + 1$ , totalizando sete tratamentos, sendo três períodos de armazenamento de 3,5; 6,5 e 9,5 dias e dois períodos de pré-aquecimento de 0 e 04 horas a 37,5°C e 60% de UR. O pré-aquecimento foi realizado no terceiro dia de armazenamento dos ovos no interior da máquina incubadora. O tratamento controle constituiu do armazenamento de 12 horas sem aquecimento dos

ovos férteis. Os dados de todos experimentos foram submetidos à análise estatística e consideradas as diferenças significativas quando  $P < 0,05$ . Houve aumento no percentual de gema e casca, aumento no pH do albúmen, redução no percentual de albúmen, redução na taxa de eclodibilidade e aumento na taxa de mortalidade embrionária quando os ovos foram armazenados por um período superior a seis dias. O pré-aquecimento dos ovos, ocasionou redução no peso, comprimento e gema residual do pintinho recém eclodido. De modo geral, a idade da matriz de codornas japonesas não exerce influência sobre o desenvolvimento embrionário até 72 horas e o pré-aquecimento por 04 horas a 37,5°C e 60 % umidade relativa durante o período de armazenamento não produz melhorias em índices de incubação ou qualidade de pintinhos em codornas japonesas, sendo necessários mais estudos para determinar o melhor protocolo de pré-aquecimento para codornas japonesas.

Palavras-chave: codornas, idade das matrizes, ovos, pré-aquecimento.

## ABSTRACT

The effects of breeder age and prolonged storage of fertile Japanese quail eggs were investigated. In the first experiment (I), the effects of age of Japanese quail breeders were analyzed on the early stages of embryonic development (from 0 to 72 hours). 203 breeders of Japanese quail housed in 29 conventional laying cages with 5 females and 2 males at 31, 39, 48 and 59 weeks of age were used and the fertile eggs from these breeders were incubated immediately after laying and were analyzed with 0, 24, 48 and 72 hours of incubation, as well as the variables length, width, volume and area of the eggs were determined. The Eyal-Giladi and Kochav (1975) scale was used to classify embryos in the 0-hour group, classifying embryos in Roman numerals from I to XIV and for the 24, 48 and 72-hour groups, the HH table of Hamburger and Hamilton (1951), which classifies embryos into 46 stages. In the incubation periods of 0, 24, 48, and 72 hours of incubation, the following means of stages of embryonic development were evidenced: XI, HH6.1, HH12.7 and HH18.5 respectively, with no effect of breeder age. It is concluded that between 31 and 59 weeks the eggs become heavier, longer, and wider, with greater volume and area and that age does not affect the development of embryos up to 72 hours in Japanese quail. In the second experiment (II), the effects of preheating fertile Japanese quail eggs during storage on embryonic development, incubation performance, hatched chick quality and chick performance up to 35 days of age were investigated. The experiment was carried out in a completely randomized design in a  $3 \times 2 + 1$  factorial scheme, totaling seven treatments, with 3 storage periods of 3.5, 6.5 and 9.5 days and two preheating periods of 0 and 04 hours at 37.5°C and 60% RH. Preheating was performed on the third day of egg storage inside the incubator machine. The control treatment

is the storage of 12 hours without heating the fertile eggs. Data from all experiments were submitted to statistical analysis and considered significant differences when  $P < 0.05$ . There was an increase in the percentage of yolk and shell, an increase in albumen pH, a reduction in the percentage of albumen, a reduction in the hatchability rate and an increase in the embryonic mortality rate when the eggs were stored for a period longer than 06 days. The preheating of the eggs caused a reduction in the weight, length, and residual yolk of the newly hatched chick. In general, the age of the Japanese quail breeder does not influence embryonic development up to 72 hours and preheating for 04 hours at 37.5°C and 60% relative humidity during the storage period does not improve incubation rates or chick quality in Japanese quail, further studies are needed to determine the best preheating protocol for Japanese quail.

Key-words: quails, breeder age, eggs, preheating.

## I – INTRODUÇÃO

As codornas pertencem à família dos Fasianídeos (*Fhasianidae*) e da subfamília dos *Perdicionidae*, sendo da mesma família das galinhas e perdizes (Pinto et al., 2002). No Brasil foram inseridas na cadeia avícola no ano de 1959 por meio de imigrantes japoneses e italianos, sendo difundidas no país duas espécies: *Coturnix coturnix coturnix* (codorna europeia) para produção de ovos e carne; e a *Coturnix coturnix japonica* (codorna japonesa) para produção de ovos (Pastore et al., 2012).

No Brasil, a coturnicultura tem se difundido bastante em razão de algumas vantagens características dessas aves com destaque ao rápido crescimento, maturidade sexual (35 a 42 dias) e alta produtividade (média de 300 ovos/ano) (Pastore et al., 2012). Além disso, esta atividade vem se destacando no cenário socioeconômico do país porque os produtos provenientes dessa atividade são considerados como excelente alternativa para alimentação humana.

O avanço progressivo dessa atividade no país pode ser comprovado através dos dados obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE (2020) no último censo agropecuário, sendo constatado que em 2010 existiam aproximadamente 12,99 milhões de cabeça e em 2020 alcançou a marca de 16,51 milhões de cabeças.

A “codorna japonesa” (*Coturnix coturnix japonica*) caracteriza-se como a principal espécie produtora de ovos em razão da sua alta produção, uma vez que elas podem colocar mais de 253,08 ovos por ano, sendo a idade média do primeiro ovo de 38,9 dias com o pico de postura atingido em 09-12 semanas de idade (Narinc et al., 2013). Os ovos provenientes dessas matrizes são constituídos por três estruturas principais: a casca, a clara ou albúmen e



a gema; porém, as características dessas estruturas sofrem alterações por fatores como idade das matrizes, tempo e condições de armazenamento (Osei-Amponsah et al., 2014; Santos et al., 2016). Conseqüentemente, as mudanças ocorridas nas porções do ovo exercem influência sobre o desenvolvimento embrionário, desempenho de incubação e qualidade dos pintinhos recém eclodidos.

As matrizes mais velhas de codornas japonesas produzem ovos com qualidade inicial inferior aos de matrizes jovens. Ovos provenientes de aves velhas apresentam maior peso, diminuição na espessura da casca, menor quantidade de albúmen e maior peso de gema (Sarcinelli, 2012). Essas mudanças podem afetar o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, os índices de eclodibilidade (Nowaczewski et al., 2016).

O armazenamento de ovos férteis é um processo comumente realizado no interior dos incubatórios comerciais com o intuito de atender a demanda de mercado de pintinhos, por meio da obtenção de um número suficiente de ovos férteis para utilizar a capacidade máxima de produção das incubadoras e sincronizar todo o processo de incubação. Esse armazenamento deve ser realizado em ambiente com temperatura inferior ao “zero fisiológico”, para que não haja desenvolvimento embrionário nesse período (Meijerhof, 1992; Gonzáles & Cesario, 2003; Fassenko et al., 2001). No entanto, períodos longos de armazenamento mesmo em condições ideais também exercem influência sobre a qualidade dos ovos e as taxas de eclodibilidade. Quando os ovos de codornas japonesas são estocados por um período acima de quatro dias, ocorre redução nos índices de eclodibilidade (Shanaway, 1994).

Diante desta importância, objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos da idade das matrizes e do armazenamento prolongado dos ovos férteis e investigar possíveis alternativas para mitigar tais problema.

## **1. Revisão bibliográfica**

### **1.1 Idade da matriz**

A idade da matriz exerce influência sobre a qualidade dos ovos e sobre as taxas de eclosão (Silva et al., 2016). Com o avanço da idade ocorrem as seguintes modificações no ovo: há aumento em seu tamanho, diminuição no seu peso, a casca se torna mais fina, ocasionando piora em sua qualidade interna. Além das mudanças no ovo, a

produção das aves se reduz, porque os folículos pré-ovulatórios de aves com idade mais avançada maturam mais vagarosamente e ovulam quando alcançam maior tamanho, comparativamente a folículos pré-ovulatórios de aves mais jovens (Rutz et al., 2007).

Os ovos produzidos por matrizes mais velhas também apresentam na superfície da casca maior quantidade de poros, com maiores diâmetros o que confere elevadas trocas gasosas entre o embrião e o meio ambiente durante o processo de incubação, fazendo com que ocorra maior perda de peso dos ovos durante a incubação (Schadeck, 2020). A idade da matriz também apresenta alterações. Ou seja, com aumento da idade da matriz ocorre aumento na quantidade de gema, redução na quantidade de albúmen, elevando a proporção gema: albúmen. Além disso, há maior absorção de gema em embriões provenientes de ovos de matrizes mais velhas, exercendo desta forma, influência direta sobre o desenvolvimento embrionário inicial. Sendo assim, embriões oriundos de ovos de matrizes velhas apresentam melhor assimilação de nutrientes quando comparadas matrizes jovens (Nanguay et al., 2011).

Investigando o efeito da idade das matrizes de codornas japonesas (08, 14, 21 e 31 semanas de idade) sobre a qualidade dos ovos férteis, Hada (2013) notou que houve aumento significativo no comprimento do ovo entre a 14ª e 21ª semanas de idade e que os ovos provenientes de matrizes com 21 semanas de idade apresentaram índices médios de Unidade Haugh significativamente maiores, quando comparados com os da 31ª semana, havendo também aumento da relação gema/albúmen a partir da 14ª semana. Com relação às taxas de eclosão, Nogueira (2013), trabalhando com ovos provenientes de matrizes de corte de diferentes idades (36 e 55 semanas de idade), relatou que a eclosão do total dos ovos incubados de matrizes novas é superior (sendo representado pelo valor de 88,4%), quando comparada com ovos incubados de matrizes velhas (sendo o valor da taxa representada por 78,1%).

## **1.2 Qualidade dos ovos incubáveis**

Os ovos apresentam em sua constituição as seguintes estruturas: gema, membrana vitelina, albúmen, membrana da casca, blastodisco, calazas e câmara de ar (Nys & Guyot, 2011; Rose, 1997). De maneira geral, os ovos de codorna apresentam entre 25 e 34 mm de tamanho no sentido longitudinal e entre 20 a 25 mm no sentido transversal (Murakami &

Ariki, 1998) e seus principais constituintes são distribuídos na seguinte proporção: 56,5% de albúmen, 32,6% de gema e 9,9% de casca (Panda & Singh, 1990).

A produção de pintinhos viáveis e saudáveis, que atinjam seu máximo potencial produtivo nas granjas, depende diretamente da qualidade dos ovos férteis incubados. A qualidade dos ovos é determinada pelas características internas e externas que incluem: peso dos ovos, potencial hidrogeniônico (pH) do albúmen, unidade Haugh (UH), altura do albúmen, índice de gema e espessura da casca. Contudo, fatores como a idade da reprodutora e o tempo de armazenamento dos ovos exercem influência sobre a qualidade dos ovos férteis (Nowaczewski et al., 2010a). Durante o processo de produção de pintos de um dia nos incubatórios industriais, à medida que aumenta o período de armazenamento, os ovos férteis perdem qualidade. Isto ocorre em razão das mudanças na qualidade dos ovos com destaque para a diminuição da altura do albúmen, o aumento do pH do albúmen, perda de água e as alterações no teor de água da gema (Qiu et al., 2012).

Os ovos de codorna apresentam o peso variando de 09 a 13g, dependendo da idade e da espécie de codorna a ser criada (Albino & Barreto, 2003). Porém, o período de armazenamento exerce influência sobre o peso dos ovos, mesmo quando estes são submetidos a um ambiente com controle de temperatura e umidade (Moura et al., 2008). O peso do ovo sofre influência da idade das aves reprodutoras, havendo aumento no peso do ovo durante o envelhecimento das aves (Nowaczewski et al., 2010b).

Com relação à casca do ovo, essa é uma estrutura que fornece proteção contra danos mecânicos e infecções microbiológicas, como também regula as trocas de água e gases entre o embrião e o meio externo, além ser uma fonte de cálcio para o embrião em desenvolvimento (Solomon, 2010). A casca apresenta vários poros que são responsáveis pelas trocas gasosas que ocorrem no ovo e o tamanho desses poros está diretamente relacionado com a espessura da casca; por isso cascas mais espessas apresentam maior resistência à difusão gasosa. Portanto, a qualidade da casca do ovo afeta diretamente na perda de peso do ovo, mortalidade embrionária, taxas de eclodibilidade e de desenvolvimento embrionário do pintinho (Rahn & Paganelli, 1979; Roberts, 2004).

A qualidade da casca dos ovos está relacionada com a sua espessura e conforme Baptista (2002), as médias dos valores da espessura dos ovos de codorna mantêm-se entre 0,18 e 0,21mm sem sofrer alterações expressivas ao longo do período de armazenamento. A

gravidade específica também é uma técnica utilizada para determinar a qualidade da casca dos ovos. Para isto, conforme os princípios de Arquimedes, são usadas diferentes soluções salinas com densidades que variam de 1,050 a 1,100, com intervalo de 0,0025 unidades e na solução em que o ovo flutuar será a gravidade determinada, sendo os ovos com melhor casca aqueles que possuem maior gravidade específica (Araújo & Albino, 2011).

Já o albúmen é uma estrutura dos ovos que circunda a gema, apresenta aspecto denso, transparente, possui em sua constituição as calazas que são estruturas capazes de manter a gema centralizada. No decorrer do período de estocagem dos ovos, ocorre redução da altura do albúmen e elevação do pH dessa estrutura (Lapao et al., 1999). Essas mudanças acontecem durante o período de armazenamento em função da perda do dióxido de carbono para o ambiente externo ao ovo, sendo esse processo acelerado em temperatura elevada. A perda do dióxido de carbono nessa estrutura eleva o pH do albúmen de 7,6 para 9,5 (Brandão, 2014; Mueller et al., 2017).

A qualidade do albúmen é avaliada através da determinação da unidade Haugh (UH), uma medida expressa em função do peso do ovo e da altura do albúmen que é calculada pela expressão:  $UH = 100 \log (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37})$ , em que H representa a altura do albúmen em milímetros e W se refere ao peso do ovo em gramas (Haugh, 1937). À medida que aumenta o período de armazenamento, os valores de UH de ovos de codorna diminuem quando comparados aos valores de ovos frescos (Nowaczewski et al., 2010a). Akpinar et al., (2015) verificaram a redução de 13,03% no valor de UH de codornas submetidos ao armazenamento de 35 dias.

A gema é uma estrutura que está contida no centro do ovo e apresenta em sua superfície o blastodisco. Ela está envolvida pela membrana vitelina, que tem como função primordial, limitar as trocas de material entre o albúmen e a gema; e atuar como uma barreira contra a proteção bacteriana (Nys & Guyot, 2011). O conteúdo nutricional da gema dos ovos de codornas atua como fonte nutricional para o embrião, sendo sua composição química representada da seguinte forma: 49,7% de água, 16% de proteína, 31,5% de gordura e 1,8% de cinzas (Tolik et al., 2014). Já a composição mineral e vitamínica está representada por 1490 mg/kg de cálcio, 4880 mg/kg de fósforo, 111,41 mg/kg de magnésio, 39,39 mg/kg de ferro, 0,62 mg/kg de cobre e 18,98 mg/kg de zinco (Genchev, 2012). Os lipídeos da gema se constituem da principal fonte de energia durante a segunda metade da incubação e no início

do período pós-eclosão para o embrião, uma vez que eles conferem aproximadamente 90% de produção de energia embrionária utilizada para manutenção, crescimento corporal e desenvolvimento (Romanoff, 1960). Além dos lipídios, os aminoácidos presentes na gema são usados pelo embrião principalmente para a síntese de proteínas nos tecidos (Barri et al., 2011).

A qualidade da gema pode ser quantificada por meio do índice de gema que é definido pela relação entre a altura e largura da gema. Os valores de índice de gema obtidos entre 0,39 e 0,45 indicam ovos de boa qualidade interna. No entanto, durante o armazenamento, ocorre a migração da água do albúmen para a gema provocando desta forma, alargamento dessa estrutura provocando queda no índice de gema (Marinho, 2011; Oliveira & Oliveira, 2013).

### **1.3 Pré-aquecimento dos ovos férteis**

No período pré-incubação, as indústrias avícolas realizam o armazenamento dos ovos férteis a temperaturas inferiores ou iguais ao zero fisiológico para evitar que o desenvolvimento embrionário prossiga antes do início do processo de incubação, sendo essa temperatura relatada por Fasenko (2007) abaixo de 21°C. Nesse contexto, o período de armazenamento total dos ovos férteis pode variar entre alguns dias e várias semanas em razão à demanda variável do mercado por pintos de um dia de idade. No entanto, o armazenamento prolongado por mais de sete dias de ovos férteis de matrizes de postura (Mather & Laughlin, 1977; Dymond et al., 2013) e por mais de quatro dias de ovos férteis de codornas (Imai et al., 1986) ocasionam efeitos negativos nos índices de eclodibilidade (Fasenko, 2007), redução na qualidade do pintinho (Tona et al., 2004a) e diminuição no desempenho de crescimento da progênie (Tona et al., 2004b).

Com o intuito de mitigar os efeitos negativos provenientes dos períodos de armazenamento surgiram técnicas utilizadas em frangos de corte, de tratamento térmico aplicadas antes ou durante a estocagem dos ovos, que promovem a reposição celular e o incremento ao desenvolvimento embrionário através do estímulo térmico, fortalecendo o embrião e reduzindo as perdas ocasionadas pela estocagem. Para períodos de estocagem mais longos, o protocolo de tratamento térmico consiste no estímulo térmico aplicado durante o processo de estocagem, sendo os ovos retirados do estoque, estimulados com calor e em

seguida armazenados novamente até que se inicie o processo de incubação artificial (Kollmann Filho, 2018).

É aplicada a técnica do tratamento térmico durante o armazenamento com o intuito de imitar o processo de aquecimento natural dos ovos férteis que acontece no ninho e é realizado pelas aves. De forma natural, a ave coloca um ovo por dia no ninho até o final da postura e nesse processo acontece o aquecimento dos ovos mais velhos à medida que ela retorna ao ninho para a postura de mais um ovo, proporcionando um período curto de incubação (Elmenawey, 2019). Geralmente esse processo acontece entre 06 a 08 horas após a postura, quando ocorre avanço no desenvolvimento embrionário dos ovos (Jones, 1986).

O protocolo para aquecimento dos ovos durante o armazenamento é comumente realizado no interior de máquinas incubadoras sendo o tempo e o número de períodos curtos de aquecimento diferente para ovos armazenados em curtos e longos intervalos de tempo porque a viabilidade do embrião está ligada com a duração do armazenamento do ovo (Reijrink et al., 2010). Entretanto, para frangos de corte, a soma dos estímulos térmicos não pode ultrapassar o período de 12 horas, pois o tempo de aplicação do calor pode resultar em perda na taxa de eclosão (Dymond et al., 2013). Quando os ovos férteis de matrizes de frangos de corte são armazenados por até 14 dias e aquecidos a 37,8°C por 04 horas, há melhora nos índices de eclodibilidade, pois a utilização da técnica permite a formação do hipoblasto, o que torna o embrião menos sensível às mudanças no pH do albúmen (Reijrink et al., 2010).

Com relação aos protocolos de pré-aquecimento de ovos férteis de codornas japonesas também existem estudos que fornecem resultados positivos sobre o rendimento da incubação. Petek e Dikmen (2004) aplicaram o protocolo de aquecimento pré-incubação que consistiu no fornecimento de calor de 37,5°C por 08 horas antes do período de armazenamento e a partir da utilização dessa técnica foi possível aumentar os índices de eclodibilidade e melhorar o desempenho subsequente da progênie. Damaziak et al. (2021), obtiveram aumento na taxa de eclosão de ovos férteis e redução da mortalidade embrionária precoce e tardia quando aplicaram o protocolo de pré-incubação (37,8 ° C e 50-55% UR) e viragem dos ovos por 16 horas para ovos férteis de codornas japonesas armazenados pelo período de 12 dias.

#### **1.4 Efeitos do armazenamento dos ovos sobre o desenvolvimento embrionário**

Na indústria avícola é comum o armazenamento de ovos férteis destinados ao processo de incubação. No entanto, o armazenamento prolongado tende a reduzir a taxa média de desenvolvimento embrionário (Mather & Laughlin, 1977) e levam ao aumento da mortalidade embrionária precoce e tardia (Hyánková et al., 2013).

Durante o período de armazenamento, os ovos férteis são submetidos à temperatura de “zero fisiológico” que corresponde a 21°C (Fasenko, 2007), sendo as células embrionárias paradas na fase mitótica do ciclo celular. No entanto, quando os ovos são submetidos a este estado durante longo período de duração, ocorre o envelhecimento celular, aumentando desta forma a suscetibilidade das células aos processos naturais de morte celular através da via de apoptose (Konishi & Kosin, 1974), havendo redução na área do blastoderme (Mather & Laughlin, 1977) e redução na porcentagem de células viáveis. Hamidu et al. (2011) demonstraram que a porcentagem de células viáveis em ovos de matrizes foi significativamente maior quando os ovos foram armazenados por quatro dias (81,17%) quando comparados com os ovos armazenados por 14 dias (68,18%). Essa redução na proporção de células embrionárias viáveis tende a reduzir a taxa média de desenvolvimento embrionário e aumentar o número de embriões anormais ou mortos que ocorrem em ovos armazenados em longo prazo (Fasenko, 2007).

Além disso, períodos mais prolongados de armazenamento dos ovos ocasionam mudanças no pH do albúmen que afetam diretamente o desenvolvimento embrionário. O pH do albúmen do ovo recém-posto varia de 7,6 a 7,9 no entanto com o avanço do período de armazenamento, o pH dessa estrutura aumenta podendo chegar a 9,5 (Alleoni & Antunes, 2001). Esse fato acontece porque, durante nesse período, o ovo perde CO<sub>2</sub> e água através dos poros da casca. A perda de CO<sub>2</sub> para o ambiente externo ao ovo, aumenta rapidamente a alcalinidade do albúmen (Reijrink et al., 2008). Em contrapartida, a gema mantém-se levemente ácida, com pH em torno de 6,5 durante o período de armazenamento. Portanto, o blastoderma assumirá um pH intermediário, pois enfrenta um ambiente bastante alcalino na superfície dorsal do epiblasto e sua superfície ventral fica em contato com um ambiente levemente ácido. Porém, durante períodos de armazenamento mais prolongados, o pH de 8,2

considerado ótimo para gastrulação não é atingido, o que poderá prejudicar o desenvolvimento inicial do embrião (Gillespie & McHanwell, 1987; Rocha, 2011).

Além do aumento do pH do albúmen durante o armazenamento, ocorre a liquefação dessa estrutura, uma vez que a ovoalbumina se transforma em S-ovoalbumina quando ocorre a dissociação do complexo ovomucina-lisozima com a destruição do gel de ovomucina, que provoca a redução das propriedades gelificantes e espumantes da viscosidade do albúmen, tornando-o liquefeito (Seibel et al., 2005). O processo de liquefação do albúmen produz água que, por sua vez, atravessa a membrana vitelínica por osmose e é retida na gema, aumentando o volume dessa estrutura e ocasionando o enfraquecimento da membrana vitelínica (Pissinati et al., 2014). Em virtude da desintegração dessas estruturas que protegem o embrião no início da incubação, período que o âmnio ainda não está completamente formado, o desenvolvimento embrionário poderá ser afetado negativamente (Rocha, 2011).

O armazenamento prolongado de ovos também exerce efeito sobre o desempenho de incubação, uma vez que à medida que aumenta o período de armazenamento ocorre declínio na eclodibilidade dos ovos, aumentam as taxas de mortalidades embrionárias, e os embriões que sobrevivem tendem a se desenvolver lentamente (Ogbu & Oguike, 2019). Para ovos de codornas armazenados por cinco dias a 21°C, houve redução na eclodibilidade de 78,4% para 35,4% quando os ovos foram armazenados nas mesmas condições de temperatura, porém por um período de armazenamento de 15 dias (Garip & Dere, 2011). O armazenamento por 12 dias a 18°C de ovos férteis provenientes de matrizes de frangos de corte resultou no aumento da mortalidade embrionária nas fases inicial e tardia (Mello et al., 2021). Conforme Heba (2015), a redução nessas taxas está relacionada com a diminuição da viscosidade do albúmen e com o aumento do pH do albúmen.

### **1.5 Processo de incubação artificial e seus fatores físicos**

O processo de incubação artificial de ovos férteis é realizado nos incubatórios em máquinas incubadoras para obtenção de pintos de um dia, que serão destinados à produção de carne ou ovos nas granjas comerciais. Nesse sentido, o incubatório exerce grande importância sobre a cadeia produtiva, pois é a partir dele que a mesma é abastecida (Silva et al., 2016). Em razão da sua importância para a manutenção e o aperfeiçoamento da criação



de codornas, a incubação tornou-se um processo que tem se difundido bastante no Brasil nos últimos anos (Morais et al., 2009).

Esse processo surgiu de forma primitiva em meados 400 a.C. no Egito, sendo o aquecimento dos ovos férteis realizado em construções ou ladrilhos de barro, porém a primeira incubadora mecânica foi desenvolvida apenas em 1974 na França (Salazar, 2003). De forma geral, a incubadora consiste em um equipamento capaz de regular fatores como temperatura e umidade, e permite a renovação de ar e viragem dos ovos, proporcionando condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento embrionário, visando alcançar altos índices de eclodibilidade, que estão diretamente relacionados com a sobrevivência e o desempenho dos pintinhos no campo (Boleli et al., 2016).

Envolvidas nesse processo, existem dois tipos de incubadoras: de estágio único e de estágio múltiplo. As incubadoras com sistema de estágio único são carregadas totalmente com um único lote de ovos férteis, de modo que todos os embriões estão no mesmo estágio de desenvolvimento permitindo dessa forma que haja o ajuste de fatores como temperatura, umidade e ventilação de acordo com a necessidade dos embriões. Em contrapartida, as incubadoras com sistema de estágio múltiplo são carregadas com três ou quatro cargas de ovos férteis por semana, de modo que diferentes lotes de ovos com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento são incubados em uma única máquina (Baracho et al., 2010; Molenaar et al., 2010).

Apesar da disponibilidade de ambos os sistemas, as incubadoras de estágio único apresentam melhores desempenhos de incubação. Comparando os dois sistemas de incubação, Mesquita et al. (2021) verificaram que o sistema único de incubação se mostrou melhor do que o sistema múltiplo, porque foi capaz de elevar os resultados de eclodibilidade e melhorar a qualidade do pintinho. Os ovos que foram incubados no sistema de estágio único apresentaram 92,12% de porcentagem de eclosão total e os ovos incubados em sistema múltiplo essa taxa foi de 90,25%. Com relação à qualidade do pintinho, os ovos incubados no sistema único obtiveram um escore médio de qualidade de 94,10 pontos, que foi maior do que os pintinhos incubados no sistema múltiplo, que obtiveram um escore médio de 91,79 pontos.

### **1.5.1 Temperatura**

A temperatura é um dos fatores físicos envolvidos e que está relacionada diretamente com o período de duração do processo de incubação, com os índices de eclodibilidade e com o desenvolvimento embrionário durante o armazenamento dos ovos férteis. A temperatura denominada de “ponto zero fisiológico” ou “zero biológico” deve ser mantida durante o período de armazenamento dos ovos para que não ocorra desenvolvimento embrionário (Barbosa & Leite, 2013). Em contrapartida, quando os ovos férteis são destinados ao processo de incubação, estes são submetidos a temperaturas mais elevadas. Para codornas, o processo de incubação tem duração de 17,5 dias e é realizado à temperatura de 37,5°C (Murakami & Ariki, 1998).

Quando ocorrem grandes variações de temperatura no interior das máquinas incubadoras, como a exposição do embrião a altas ou baixas temperaturas, diferentes efeitos negativos podem ser ocasionados sobre o desenvolvimento embrionário. Temperaturas muito altas durante o período de incubação resultam em aumento expressivo na mortalidade embrionária tardia, contudo, temperaturas muito baixas retardam o nascimento e aumentam o número de ovos não eclodidos e bicados (Mauldin, 2001). Além disso, temperaturas altas, causam o aparecimento de um grande número de pintos refugos, pequenos e com umbigos mal cicatrizados. Já as temperaturas baixas causam o aparecimento de pintos com o abdômen distendido, umbigo mal cicatrizado e ovos bicados e não eclodidos (Muraroli & Mendes, 2003; Molenaar et al., 2011). As baixas temperaturas de incubação (33°C) também retardam o crescimento embrionário e aumentam o período de incubação (Ipek et al., 2014).

### **1.5.2 Umidade relativa**

A umidade relativa do ar no interior das máquinas incubadoras durante o período de incubação é um importante fator a ser controlado pois ele está relacionado diretamente com o teor de perda de água nos ovos. O processo de perda de água para o ambiente externo ao ovo, se constitui de um processo essencial para o desenvolvimento embrionário adequado pois ele está associado diretamente com a perda de calor do ovo e com a formação da câmara de ar, no entanto perdas de água fora da faixa normal podem resultar em anormalidades de pintos ou morte (Boleli et al., 2016). Em ovos de codornas, o conteúdo de água corresponde a 73,4% do seu peso total e a perda de água evaporativa em relação ao peso inicial do ovo

que fornece a eclodibilidade ideal é em torno de 12 a 14% (Romanoff & Romanoff, 1949; Peebles & Brake, 1987).

Nos ovos, a perda de água acontece por meio do processo de difusão: a água atravessa os poros da casca movendo-se sempre do ponto mais úmido para o ponto mais seco (Mesquita, 2013). Em situações em que a umidade relativa está baixa, observa-se perda excessiva de peso e ocorre atraso na eclosão, em razão do déficit de fluídos nas cavidades amnióticas e alantóicas, que prejudica o desenvolvimento embrionário e a eclosão (Boleli et al., 2016). Em situação inversa, em casos de alta umidade, os embriões tendem a eclodir precocemente com o aspecto molhado e pegajoso, chegando até em alguns casos extremos a eclodir sem alcançarem o pleno desenvolvimento (Decuypere et al., 2003). Murakami & Arika (1998) obtiveram maior eclodibilidade durante o processo de incubação de ovos de codornas japonesas incubados a 60% de umidade relativa e, nos últimos dois dias, após transferência para o nascedouro, quando a umidade relativa foi elevada a 70%.

### **1.5.3 Viragem dos ovos**

A viragem dos ovos é realizada durante o processo de incubação com o intuito de reduzir o mau posicionamento embrionário, prevenir a adesão do embrião nas membranas da casca e garantir a utilização adequada do albúmen por parte do embrião (Wilson, 1991). Na incubação natural, a galinha vira os ovos muitas vezes, mais de 96 vezes em 24 horas e, por isso, essa prática foi incluída no processo de incubação artificial (Landeuer, 1967).

A realização do processo de viragem dos ovos depende de uma série de parâmetros como: o plano de rotação, o eixo em que o ovo é acondicionado nas bandejas no interior da máquina incubadora, o ângulo do eixo, a frequência e o estágio de incubação (Elibol et al., 2002). As máquinas incubadoras, realizam a viragem a cada 01 hora, o eixo de colocação dos ovos nas bandejas que apresenta melhor eclodibilidade é com a ponta mais estreita para baixo e o melhor ângulo de viragem é de 20° a 45° em relação ao eixo horizontal (Decuypere et al., 2003).

Quando a viragem dos ovos não é realizada, principalmente no período compreendido entre o terceiro ao sétimo dia de incubação, a troca gasosa por meio da membrana corioalantóide pode ser prejudicada, pois o albúmen não absorvido se interpõe entre esta

membrana e a membrana interna da casca, impedindo a expansão dos vasos sanguíneos (Deeming, 1989; Wilson, 1991).

Yoshizaki e Saito (2002) verificaram em seus estudos que os ovos de codornas incubados na posição vertical e dispostos com sua extremidade mais fina voltada para a bandeja, juntamente com a realização do processo de viragem a cada 02 horas apresentaram nível de eclodibilidade de 85%. Em contrapartida, ovos que foram dispostos com a extremidade mais larga do ovo (que abriga a câmara de ar) voltada para a bandeja, mesmo com a ação de viragem a cada 02 horas apresentaram percentual de eclodibilidade de 63%.

#### **1.5.4 Trocas gasosas**

O desenvolvimento embrionário das aves no interior dos ovos depende das trocas gasosas realizadas principalmente entre o ovo e o ambiente da incubadora, sendo esse processo realizado por mecanismos de difusão de gases por meio dos poros da casca do ovo, e pelo do fenômeno físico denominado de condutância. Quando a concentração de  $O_2$  externa dos ovos é maior que a presente no interior dos ovos, o gás oxigênio é difundido para dentro do ovo. Em contrapartida, se a concentração de  $CO_2$  é superior no interior dos ovos, o  $CO_2$  se difunde fora do ovo. As características dos ovos incubáveis (superfície, número de poros e geometria) e as condições de incubação alteram o sistema de trocas gasosas. Dessa forma, as áreas maiores da superfície do ovo, maior número de poros e diâmetro, e cascas de ovos mais finas aumentam a taxa de trocas gasosas entre os ovos e o meio ambiente (Boleli et al., 2016).

Conforme enunciado por Bamelis et al. (2008), no primeiro período do processo de incubação, a respiração do embrião ocorre por difusão dos gases através dos poros da casca. Nesse processo acontece a captura de  $O_2$ , liberação de  $CO_2$  e água metabólica. Já no segundo período de incubação, o ovo perde água e o gás entra para repor a água perdida, formando uma estrutura em uma das extremidades dos ovos denominada câmara de ar que aumenta seu tamanho até que ocupe aproximadamente 15% do volume interno do ovo. Após a formação dessa estrutura, o embrião passa a respirar o ar contido na câmara de ar, inflando os pulmões e os sacos aéreos (La Scala Jr., 2003; Piaia, 2005).

Nesse processo, o índice do gás  $O_2$  durante a incubação permanece em aproximadamente 21% (Oro, 2011). Em contrapartida, o valor máximo aceito nos níveis de

dióxido de carbono é de 01%. Quando são atingidos os valores elevados, ocorrem alterações nos níveis de eclodibilidade, podendo levar à mortalidade total dos embriões (Piaia, 2005). Portanto, boas máquinas incubadoras apresentam boa ventilação para manter a umidade dos ovos, garantir o suprimento adequado de O<sub>2</sub> e remoção de CO<sub>2</sub>, e permitir que haja a remoção do calor metabólico (Calil, 2007; Ramli et al., 2017).

## 1.6 Desenvolvimento embrionário

Nas aves o processo de desenvolvimento embrionário inicia-se no interior do corpo das matrizes durante o processo de fertilização que acontece no infundíbulo onde há a formação do blastoderma, estrutura que começa a se diferenciar em camadas germinativas, e com isso se inicia o processo de gastrulação (Barbosa, 2011). O embrião situa-se no topo da gema sob a membrana vitelina (Nájera & Weijer, 2020) e seus estágios de desenvolvimento embrionário iniciais são descritos em numerais romanos conforme Eyal-Giladi e Kochav (1991). No momento da oviposição o embrião de codornas japonesas atinge o estágio XI (Sellier et al., 2006).

No estágio XI, a superfície superior do blastoderma apresenta uma camada fina e suave através da qual camadas de células mais profundas podem ser observadas. Em frente à seção posterior da área opaca existe uma área transparente em forma de cinto cuja a borda anterior é demarcada por uma concentração relativamente estreita de aglomerados de células em forma de ferradura denominada de Foice de Koller e que do ponto de vista morfológico compreende o início do hipoblasto. Esse processo de formação do hipoblasto continua, e na fase XII o cinto posterior transparente anterior ao qual a camada inferior recém-formada, o hipoblasto, já reveste metade da superfície inferior da área pelúcida. No estágio XIII, a margem posterior do hipoblasto é muito acentuada no lado ventral e também pode ser visualizada do lado dorsal através do epiblasto transparente, com aspecto de superfície superior contínua. Quando o estágio XIV é atingido pelas células da camada média forma-se uma massa condensada na linha média posterior (Eyal-Giladi & Kochav, 1991).

Após esse período, os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário de codornas também são semelhantes aos estágios iniciais da embriogênese de frango de corte (estágio 04-28) que foram descritos por Hamburger e Hamilton (1951), portanto são similares as descrições morfológicas e os tempos de incubação.

No entanto, a partir do estágio 29 ao 35, o tempo de incubação para cada estágio referente ao desenvolvimento embrionário de codornas, torna-se reduzido e com base no tempo de incubação acelerado não é mais possível comparar e atribuir estágios equivalentes para ambas as espécies. De forma geral, o período total de desenvolvimento embrionário das codornas está compreendido em 46 estágios que foram documentados na tabela 1 (Ainsworth et al., 2010).

Durante o armazenamento dos ovos férteis, os estágios de desenvolvimento embrionário sofrem mudanças conforme o protocolo de temperatura aplicado nos ovos nesse período. Fasnko et al. (2001) ao aplicar períodos curtos de incubação durante o armazenamento de ovos férteis, permitiram a transição dos embriões para um estágio de formação significativamente mais desenvolvido após a postura, com a formação completa do hipoblasto.

Além da temperatura, a idade da matriz exerce influência sobre o desenvolvimento embrionário, uma vez que matrizes mais velhas produzem folículos maiores que resultam em ovos de tamanho maior, e embriões com maior tamanho (Vieira, 2001). Em contrapartida, ocorre redução na espessura da casca do ovo (Maiorka et al., 2003), permitindo maior condutância na casca dos ovos (Cardoso et al., 2002), que ocasiona maior taxa metabólica nos embriões fazendo com que estes se desenvolvam mais rapidamente, afetando o tempo total de eclosão (Joseph & Moran, 2005). Ulmer-Franco et al. (2010) verificaram que os embriões provenientes de aves jovens (com 29 semanas de idade) apresentaram tempo para bicagem externa (494,4h) e eclosão (503,8h) significativamente superior aos embriões das aves velhas (com 59 semanas de idade), que apresentaram 490,2h e 500,4h, respectivamente. Além disso, Damaziak et al. (2018) verificaram que embriões de matrizes de corte mais velhas atingem um estágio superior de desenvolvimento em 48 horas de incubação.

Com relação às taxas de eclodibilidade, Tona et al. (2004b) verificaram que os pintos que eclodiram com maior peso (49,05g) foram provenientes de ovos férteis de atrizes mais velhas (com 45 semanas de idade), enquanto que as matrizes mais jovens (com 35 semanas de idade) produziram pintos com peso de 45g, em decorrência do maior peso dos ovos das matrizes velhas no início do processo de incubação.

Tabela 1. Principais características no desenvolvimento de codornas

Estágios	Tempo de incubação	Principais características
4 HH	18–19 h	A linha primitiva está totalmente alongada
5 HH	19–22 h	Notocorda é visível
6 HH	23–25 h	A dobra cefálica é aparente
7 HH	23–26 h	Um somito evidente
8 HH	26–29 h	04 somitos evidentes
9 HH	29–33 h	07 somitos evidentes
10 HH	33–38 h	10 somitos evidentes
11 HH	40–45 h	13 somitos evidentes, coração inclinado à direita
12 HH	45–49 h	16 somitos evidentes e haste ótica evidente
13 HH	48–52 h	19 somitos evidentes
14 HH	50–53 h	22 somitos evidentes. Primeira e segunda fendas branquiais visíveis
15 HH	50–55 h	24-17 somitos evidentes. A terceira fenda branquial é definida
16 HH	51–56 h	26-28 somitos evidentes. Uma crista espessada define a primeira aparência dos brotos das asas. Ainda não existe evidência dos brotos das pernas nesta fase
17 HH	52–64 h	29-32 somitos evidentes. Os brotos das pernas são visíveis e os brotos das asas aumentaram ligeiramente
18 HH	72 h	O alantóide é o primeiro anexo aparente. O âmnion geralmente fechado
19 HH	3 dias	O processo maxilar torna-se distinto. Os olhos ainda não são pigmentados
20 HH	3,5 dias	Alantóide se torna vesicular e mais visível. Olhos levemente pigmentados
21 HH	3,5 dias	O processo maxilar excede o processo mandibular em comprimento
22 HH	4 dias	É visível a pigmentação dos olhos
23 HH	4 dias	Os brotos dos membros são iguais em largura e comprimento
24 HH	4 dias	Os brotos dos membros são maiores em comprimento do que em largura
25 HH	4,5 dias	As articulações de cotovelo e joelho são visíveis
26 HH	4,5 – 5 dias	Demarcação de dedos do pé
27 HH	5 dias	A região pressuposta do bico pode ser identificada
28 HH	5,5 dias	O crescimento do bico é nítido
29 HH	5,5 – 6 dias	A curvatura da asa é visível. O dente do bico ainda não é visível
30 HH	6 – 6,5 dias	São visíveis 01 a 02 papilas esclerais. O dente do bico é visível
31 HH	6,5 dias	São evidentes 6 papilas esclerais
32 HH	7 dias	São evidentes de 6-8 papilas esclerais. Os dedos do pé se alongaram e tornaram-se mais visíveis
33 HH	7 dias	13 papilas esclerais evidentes
34 HH	7,5 dias	Crescimento diferencial do 2° e 3° dedos do pé. 13-14 papilas esclerais
35 HH	8 – 8,5 dias	As pálpebras começam a sobrepor à superfície do globo ocular
36 HH	8 – 9 dias	A pigmentação preta e marrom começa a ser visível. Comprimento do bico = 1,2 mm, comprimento do terceiro dedo = 3,2 mm
37 HH	9,5 dias	A área de pigmentação preta expandiu-se para incluir a testa e a coroa. A pigmentação marrom já está presente na região lombo-sacral. Comprimento do bico = 1,5 mm, comprimento do terceiro dedo = 4,1 mm
38 HH	9,5 – 10 dias	Pigmentação preta visível nas laterais do crânio. Listras distintas de pigmentação marrom na região lombo-sacral. Comprimento do bico = 1,5 mm, comprimento do terceiro dedo = 4,7 mm
39 HH	10,5 – 11 dias	Aumento significativo no comprimento de todos os folículos de penas pigmentadas. Padrões de pigmentação expandidos na asa e pigmentação visível microscopicamente em torno das articulações intertarsais. Comprimento do bico = 2,0 mm, comprimento do terceiro dedo = 6,0 mm
40 HH	11 dias	Folículos de penas pigmentadas estão presentes na região periocular. Pigmentação agora evidente nos pés. Comprimento do bico = 2,0 mm, comprimento do terceiro dedo = 6,1 mm
41 HH	11,5 dias	Os folículos de penas brancas são evidentes ao longo do comprimento do embrião e proeminentes ao redor do olho. Comprimento do bico = 2,0 mm, comprimento do terceiro dedo = 6,1 mm
42 HH	12 – 13 dias	Pigmentação visível nos dedos dos pés. Comprimento do bico = 2,3 mm, comprimento do terceiro dedo = 8,6 mm
43 HH	14 dias	Comprimento do bico = 2,6 mm, comprimento do terceiro dedo = 9,4 mm
44 HH	15 – 16 dias	Comprimento do bico = 3,0 mm, comprimento do terceiro dedo = 10,8 mm
45 HH	16 – 16,5 dias	Comprimento do bico = 3,5 mm, comprimento do terceiro dedo = 11,9 mm
46 HH	17,5 dias	Eclosão

Fonte: Adaptado de Ainsworth et al. (2010).

## 1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth SJ, Stanley RL, Evans DJR. Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy* 2010; 216(1): 3-15.
- Akpinar GC, Canogullari SM, Baylan M, Alasahan S, Aygun A. The use of propolis extract for the storage of quail eggs. *Journal of Applied Poultry Reseachers* 2015; 24(1): 427-435.
- Albino LFT, Barreto SLT. Criação de codornas para produção de carne e ovos. In: Albino LFT, Barreto SLT. *Incubação artificial de ovos férteis*; 2003. p. 209.
- Alleoni ACC, Antunes AJ. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. *Scientia Agrícola* 2001; 58(4): 681 – 685.
- Araújo WAG, Albino LFT. *Comercial Incubation*. Viçosa, M.G. / Transworld Research Network; 2011.
- Bamelis FR, De Ketelaere B, Mertens K, Kemps BJ. Measuring the conductance of eggshells using the acoustic resonance technique and optical transmission spectra. *Computers and electronics in agriculture* 2008; 62(1): 35-40.
- Baracho MS, Nääs IA, Gigli A. Impacto das variáveis ambientais em incubatório de estágio múltiplo de frangos de corte. *Engenharia Agrícola* 2010; 30(4): 563-577.
- Barbosa VM, Leite RC. Efeitos do momento de transferência dos ovos para o nascedouro e da idade da matriz pesada sobre o rendimento de incubação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2013; 65(6):1823-1830, 2013.
- Barri A, Honaker CF, Sottosanti JR, Hulet RM, McElroy AP. Effect of incubation temperature on nutrient transporters and small intestine morphology of broiler chickens. *Poultry Science* 2011; 90(1): 118-125.
- BARBOSA VM. *Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário*. Belo Horizonte, MG :/ FEP MVZ; 2011.



- Baptista RF. Avaliação da qualidade interna de ovos de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) em função da temperatura de armazenamento. [Dissertation]. Niterói (RJ): Universidade Fluminense; 2002.
- Boleli IC, Morita VS, Matos Jr JB, Thimotheo M, Almeida VR. Poultry Egg Incubation: Integrating and Optimizing Production Efficiency. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2016; 18(2): 1-16.
- Brandão MDM. Efeito da armazenagem na qualidade de ovos, com e sem anormalidades do ápice da casca, produzidos por galinhas naturalmente infectadas por *mycoplasma synoviae*. [Dissertation]. Niterói (RJ): Universidade Fluminense; 2014.
- Calil TAC. Princípios básicos de incubação. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas; 2007; Santos, São Paulo. p.19-45.
- Cardoso JP, Nakage ES, Pereira GT, Boleli EI. Efeito da idade da matriz e peso do ovo sobre os componentes do ovo em frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2002; 4(1): 16.
- Damaziak K, Paweska M, Gozdowski D, Niemiec J. Short periods of incubation, egg turning during storage and broiler breeder hens age for early development of embryos, hatching results, chicks quality and juvenile growth. *Poultry Science* 2018; 97(9): 3264-3276.
- Damaziak K, Pyzel B, Zdanowska-Sąsiadek Z. Pre-incubation and turning during long storage as a method of improving hatchability and chick quality of Japanese quail eggs. *Annals of Animal Science* 2021; 21(1) :311–330.
- Decuypere E, Malheiros RD, Moraes VMB, Bruggeman V. Fisiologia do embrião. In: Macari M, Gonzales E. Manejo da Incubação. Campinas: FACTA; p.67-86, 2003.
- Deeming DC. Characteristics of unturned eggs: Critical period, retarded embryonic growth and poor albumen utilization. *British Poultry Science* 1989; 30(2): 239-249.
- Dymond J, Vinyard B, Nicholson AD, French NA, Bakst MR. Short periods of incubation during egg storage increase hatchability and chick quality in long-stored broiler eggs. *Poultry Science* 2013; 92(11) :2977–2987.

- Elibol O, Peak SD, Brake J. Effect of flock age, length of egg storage, and frequency of turning during storage on hatchability of broiler hatching eggs. *Poultry Science* 2002; 81(7): 945–950.
- Elmenawey MA. Effect of heat treatments during hatching eggs storage on hatchability traits and chick quality. *Egyptian Poultry Science Journal* 2019; 39(4): 791-808.
- Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* 1976; 49(2): 321-37.
- Fasenko GM, Robinson FE, Whelan AI, Kremeniuk KM, Walker JA. Prestorage incubation of long-term stored broiler breeder eggs: 1. Effects on hatchability. *Poultry Science* 2001; 80(10):1406–1411.
- Fasenko GM. Egg storage and the embryo. *Poultry Science* 2007; 86(5):1020-1024.
- French NA. Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry Science* 1997; 76(1): 124-133.
- Garip M, Dere S. The effect of storage period and temperature on weight loss in quail eggs and the hatching weight of quail chicks. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2011; 10(18): 2363-2367.
- Genchev A. Quality and composition of Japanese quail eggs (*Coturnix japonica*). *Trakia Journal of Sciences* 2012; 10(2): 91-101.
- Gillespie JJ, McHanwell S. Measurements of intra embryonic pH during the early stages of development in the chick embryo. *Cell and Tissue Research* 1987; 247(1):445-451.
- González E, Cesario MD. Desenvolvimento embrionário. In: Macari M, González E. Manejo da incubação, Jaboticabal: Facta; 2003. p.51-64.
- Hada FH. Fatores físicos e idade da matriz na incubação de ovos de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). [Thesis]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2013.

- Hamburger AG, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 1951; 195(1): 42–92.
- Hamidu JA, Uddin Z, Li M, Fassenko GM, Guan LL, Barreda DR. Broiler egg storage induces cell death and influences embryo quality. *Poultry Science* 2011; 90 (8): 1749-1757.
- Haugh RR. The Haugh unit or measuring egg quality. *U.S. Egg and Poultry Magazine* 1937; 43(1):552–573.
- Heba AB. Effect of storage period on egg weight loss, hatching weight and hatchability percentage of incubated Egyptian Balady eggs. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 2015; 47(1):216–220.
- Hyánková L, Novotná B. Divergent selection for shape of growth curve in Japanese quail. 7. Effect of egg storage at high temperature on embryo development and hatchability. *Brazilian Poultry Science* 2013; 54(6):695-703.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2020. Pesquisa de Pecuária Municipal. Disponível em :< <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado> >.
- Imai C, Mowlah A, Saito J. Storage stability of Japanese of quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs adds room temperature. *Poultry Science* 1986, 65(3): 474-480.
- Ipek A, Sahan U, Baycan SC, Sozeu A. The effects of different eggshell temperatures on embryonic development, hatchability, chick quality, and first-week broiler performance. *Poultry Science* 2014; 93(2): 464-472.
- Jones R. Improve hatchability. *Canada Poultryman* 1986; 20: 23.
- Joseph NS, Moran Jr ET. Effect of flock age and postemergent holding in the hatcher on broiler live performance and further-processing yield. *Journal of Applied Poultry Research* 2005; 14(3): 512–520.
- Kollmann Filho J. Efeito do tratamento térmico em ovos de peruas na pré estocagem sobre a incubação. [Dissertation]. Chapecó (SC): Universidade do Estado de Santa Catarina; 2018.

- Konishi T, Kosin IL. Morbidity of aging non-incubated chicken blastoderms: further cytological evidence and interpretation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1974; 32(3): 557-571.
- La Scala Jr. N. Aspectos físicos da Incubação. In: Macari M, Gonzales E. Manejo da Incubação. Campinas: FACTA; 2003. p.30-44.
- Landeuer W. The hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. [Monograph]. Storrs (US): University of Connecticut ; 1967.
- Lapao C, Gama LT, Soares MC. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poultry Science* 1999; 78(5): 640-645.
- Maiorka A, Luquetti BC, Almeida JG, Macari M. Idade da matriz e qualidade do pintainho. In: Macari M, Gonzales E. Manejo da incubação. Campinas: FACTA; 2003.p. 362-377.
- Marinho AM. Qualidade interna e externa de ovos de codornas japonesas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. [Dissertation]. Rio Largo (AL): Universidade Federal de Alagoas; 2011.
- Mather CM, Laughlin, KF. Storage of hatching eggs: the effect on total incubation period. *British Poultry Science* 1977; 18(5): 597-603.
- Mauldin JM. Factors affecting hatchability. In: Bell DD, Weaver WD. Commercial Chicken Meat and Egg Production (Eds), Boston: Springer; 2001.p. 725-770.
- Meijerhof R. Pre-incubation holding of hatching eggs. *World Poultry Science Journal* 1992; 48(1):57-68.
- Mello EF, Araújo ICS, Triginelli MV, Castro FLS, Baião NC, Lara LJC. Effect of egg storage duration and egg turning during storage on egg quality and hatching of broiler hatching eggs. *Animal* 2021; 15 (2): 100111.
- Mesquita MA. Resultados produtivos no incubatório e na granja de frangos de corte utilizando sistema de incubação em estágio múltiplo e estágio único. [Dissertation]. Goiânia(GO): Universidade Federal de Goiás; 2013.

- Mesquita MA, Araújo ICS, Arnhold E, Mascarenhas AG, Carvalho FB, Stringhini JH, Leandro NSM, Gonzales E. Results of hatching and rearing broiler chickens in different incubation systems. *Poultry Science* 2021;100(1): 94-102.
- Molenaar R, Hulet R, Meijerhof R, Maatjens CM, Kemp B, van den Brand H. High eggshell temperatures during incubation decrease growth performance and increase the incidence of ascites in broiler chickens. *Poultry Science* 2011; 90(3): 624-632.
- Molenaar R, Reijrink IAM, Meijerhof R, Van Der Brand Meeting H. Embryonic requirements of broilers throughout incubation: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2010; 12(3): 137-148.
- Morais TGV, Romão JM, Cardoso WM. Parâmetros da incubação e componentes dos ovos de codornas japonesas para corte (*Coturnix japonica*) submetidos à estocagem em baixas temperaturas ( $7,5 \pm 1$  °C). *Semina: Ciências Agrárias* 2009; 30(1): 233-242.
- Moura AMA, Oliveira NTE, Thiebaut TL, Melo TV. Efeito da temperatura de estocagem e do tipo de embalagem sobre a qualidade interna de ovos de codornas japonesas (*Coturnix cortunix japonica*). *Ciência e Agrotecnologia* 2008; 32(2):578-583.
- Mueller FP, Machado PR, Pinheiro TDLF. Conservação de ovos de galinha: avaliação da qualidade sob diferentes condições de estocagem. *Nutrição Brasil* 2017; 16(1): 144-153.
- Murakami AE, Ariki J. Produção de codornas japonesas. Jaboticabal; S.P: / Funep; 1998.
- Muraroli A, Mendes AA. Manejo da incubação, transferência e nascimento do pinto. In: Macari M, Gonzales E. Manejo da incubação. Campinas: FACTA; 2003. p. 180-199.
- Nájera GS, Weijer CJ. Cellular processes driving gastrulation in the avian embryo. *Mechanisms of Development*, 2020; 163 (1): 103624.
- Nangsuay A, Ruangpanit Y, Meijerhof R, Attamangkune S. Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens. *Poultry Science* 2011; 90(11):2648-2655.
- Narinc D, Karaman E, Aksoy T, Firat MZ. Investigation of nonlinear models to describe long-term egg production in Japanese quail. *Poultry Science* 2013; 92(6): 1676–1682.

- Nogueira WCL. Efeito da idade de matriz e da exposição gradual ao CO<sub>2</sub> na primeira fase de incubação sobre o desenvolvimento in ovo e desempenho de frangos de corte. [Thesis]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2013.
- Nowaczewski S, Babuszkiewicz M, Kaczmarek S. Effect of broiler breeders’ age on eggshell temperature, embryo viability and hatchability parameters. *Annals of Animal Science* 2016, 16(1): 235–243.
- Nowaczewski S, Kontecka H, Rosiński A, Koberling S, Koronowski P. Egg quality of japanese quail depends on layer age and storage time. *Folia biologica*, Warsaw 2010a ; 58(3-4):201-7.
- Nowaczewski S, Witkiewicz K, Kontecka H, Krystianiak S, Rosiński A. Eggs weight of Japanese quail vs. eggs quality after storage time and hatchability results. *Archives Animal Breeding* 2010b; 53(1):720-730.
- Nys Y, Guyot N. Egg formation and chemistry. In: Nys Y, Bain M, Van Immerseel F.(Eds.) *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2011. p. 83-132.
- Ogbu OC, Oguike MA. Hatchability of Fertile Eggs in Poultry Industry. *Journal of Agriculture and Sustainability* 2019; 12(1): 107-123.
- Oliveira BL, Oliveira DD. *Qualidade e tecnologia de ovos*. Lavras; M.G./ Editora da Universidade Federal de Lavras (UFLA); 2013.
- Oro JS. Desempenho de frangos de corte provenientes de ovos incubados com diferentes níveis de gás carbônico. [Dissertation]. Marechal Cândido Rondon (PR): Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2011.
- Osei-Amponsah R, Kayang BB, Manu H, Naazie A. Egg quality traits of local Ghanaian chickens and influence of storage period. *Animal Genetic Resources* 2014; 55(1): 93-99.
- Panda B, Singh RP. Developments in processing quail meat and eggs. *Worlds Poultry Science Journal* 1990; 46(3): 219–234.

- Pastore SM, Oliveira WP, Muniz JCL. Panorama da coturnicultura no Brasil. *Revista Eletrônica Nutritime* 2012; 09(6): 2041-2049.
- Peebles ED, Brake J. Egg shell quality and hatchability in broiler breeder eggs. *Poultry Science* 1987; 66(1):596-604.
- Petek M, Dikmen S. The effects of prestorage incubation of quail breeder eggs on hatchability and subsequent growth performance of progeny. *Animal Research* 2004; 53(6):527–534.
- Piaia JL. Aplicação da Inteligência Artificial no Monitoramento do processo de incubação. [Dissertation]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
- Pinto R, Ferreira AS, Albino LFT, Gomes PC, Vargas Júnior JG. Níveis de Proteína e Energia para Codornas Japonesas em Postura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2002; 31(4): 1761-1770.
- Pissinati A, Oba A, Yamashita F, Silva CA, Pinheiro JW, Roman JMM. Qualidade interna de ovos submetidos a diferentes tipos de revestimento e armazenados por 35 dias a 25°C. *Semina: Ciências Agrárias* 2014; 35(1): 531-540.
- Qiu N, Ma M, Zhao L, Liu W, Li Y, Mine Y. Comparative proteomic analysis of egg white proteins under various storage temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012; 60(31):7746–7753.
- Rahn H, Ar A, Paganelli CV. How bird eggs breathe. *Scientific American* 1979; 240(2):46-55.
- Ramli MB, Wahab MS, Zain BA, Raus AA, Raja P, Pahat B. Effect of incubation temperature on ikta's quail breed with new rolling mechanism system. *Journal of Mechanical Engineering* 2017; 4(3):78–88.
- Reijrink IA, Berghmans D, Meijerhof R, Kemp B, Van Den Brand H. Influence of egg storage time and preincubation warming profile on embryonic development, hatchability, and chick quality. *Poultry Science* 2010; 89(6):1225–1238.

- Reijrink IAM, Meijerhof MR, Kemp B, Van den Brand H. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. *World's Poultry Science Journal* 2008; 64(4) :581 – 598.
- Roberts J.R. Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *Poultry Science* 2004; 41(3) :161–177.
- Rocha JSR. Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário. [Thesis]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
- Romanoff AL. *The avian embryo: Structure and functional development*. Macmillan, New York, USA, 1960.
- Romanoff AL, Romanoff AJ. *The avian egg*, New York; N.Y / John wiley and sons; 1949.
- Rose SP. *Principles of poultry Science*. New York, N.Y/ CAB International; 1997.
- Rutz F, Anciuti MA, Xavier EG, Roll VFB, Rossi P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2007; 31(3): 307-317.
- Salazar AI. Retrospectiva de la incubation artificial y su futuro inmediato. *Industria avícola* 2003; 50(2): 36-41.
- Santos JA, Maciel LG, Seixá VNC, Araújo JA. Parâmetros avaliativos da qualidade física de ovos de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) em função das características de armazenamento. *Revista Desafios* 2016; 03(1): 54-67.
- Sarcinelli MF. Efeitos da temperatura de incubação e da idade da matriz no desenvolvimento in ovo, qualidade, desempenho e produção de ovos da progênie de codornas japonesas. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2012.



- Schadeck MM. Tipo de incubadora e idade de matrizes sobre o rendimento de incubação e qualidade de pintinhos. [Dissertation]. Dois Vizinhos (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2020.
- Seibel NF, Barbosa LN, Gonçalves PM, Souza-Soares LA. Qualidade física e química de ovos de codornas alimentadas com dietas modificadas. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 2005; 64(1):58-64.
- Sellier N, Brillard JP, Dupuy V, Baskt MR. Comparative staging of embryo development in chicken, turkey, duck, goose, guinea fowl, and Japanese quail assessed from five. *Journal Applied Poultry Science Research* 2006; 15 (2): 219-228.
- Shanaway MM. Quail production systems: a review. *Food. Animal Production and Health Division* 1994; 73-79.
- Silva MC, Noleto RA, Vaz RGMV, Costa ES, Sousa LF, Rodrigues KF, Sousa J PL, Cruz LA, Fonseca FLR. Gravidade específica de ovos de matrizes pesadas com diferentes idades no rendimento de incubação e no peso dos pintos pós-eclosão. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal* 2016; 17(2): 214-221.
- Solomon SE. A casca do ovo: Força, estrutura e função. *British Poultry Science* 2010; 51(1): 52–59.
- Tolik D, Polawska E, Charuta A, Nowaczewski S, Cooper R. Characteristics of Egg Parts, Chemical Composition and Nutritive Value of Japanese Quail Eggs - a Review. *Folia Biologica (Kraków)* 2014; 62(4): 287-292.
- Tona K, Onagbesan O, De Ketelaere B, Decuypere E, Bruggeman V. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight, and post hatch growth to forty-two days. *Journal Applied Poultry Research* 2004a; 13(1): 10–18.
- Tona K, Onagbesan OM, Jegu Y, Kamers B, Decuypere E, Bruggeman V. Comparison of embryo physiological parameters during incubation, chick quality, and growth performance of three lines of broiler breeders differing in genetic composition and growth rate. *Poultry Science* 2004b, 83(3): 507–513.

- Ulmer-Franco AM, Fassenko GM, O`dea EE. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. *Poultry Science* 2010; 89(12): 2735–2742.
- Vieira SL. Idade da matriz, tamanho do ovo e desempenho de pintinho. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícolas. Campinas; 2001; Campinas, São Paulo. Brasil. p.117-123.
- Wilson HR. Physiological requirements of the developing embryo: temperature and turning. In: Avian Incubation. *Poultry Science Symposium* 1991; 22(1): 145- 156.
- Yoshizaki N & Saito H. Changes in shell membranes during the development of quail embryos. *Poultry Science* 2002; 81(2): 246-251.

## **II- OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar os efeitos da idade das matrizes e do armazenamento prolongado dos ovos férteis e investigar possíveis alterações negativas para mitigar tais problemas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Experimento I:

- avaliar o desempenho reprodutivo das matrizes de codornas japonesas em função da idade;
- determinar os efeitos da idade das matrizes de codornas japonesas sobre as estruturas da casca do ovo;
- identificar os estágios de desenvolvimento embrionário inicial (de 0 a 72 horas) em função do período de incubação e da idade das matrizes de codornas japonesas.

Experimento II:

- determinar os efeitos do pré-aquecimento de ovos férteis durante o armazenamento sobre a qualidade dos ovos de codornas de postura;
- obter dados referentes às taxas de eclodibilidade e mortalidade na incubação de ovos;
- determinar características morfológicas de peso do vitelo residual (g) e do desenvolvimento dos órgãos (g) coração, intestinos, fígado, proventrículo e moela dos pintinhos recém-eclodidos;
- avaliar o desempenho da incubação e da progênie em função dos períodos curtos de aquecimento durante o armazenamento de ovos férteis.

### **III- Influence of breeders age on initial embryonic development (from 0 to 72 hrs) of Japanese quails during incubation**

Artigo redigido conforme as normas da revista *Brazilian Journal of Poultry Science*

#### **Abstract**

The initial stages of early embryonic development (from 0 to 72 hours) were analyzed as a function of the incubation period and age of the Japanese quail breeder. A total of 203 Japanese quails housed in 29 conventional laying cages with 5 females and 2 males at 31, 39, 48 and 59 weeks of age were used and the fertile eggs from these breeders (n= 15 age/incubation period) were selected and incubated immediately after laying and were analyzed at 0, 24, 48 and 72 hours of incubation. The eggs were opened, and the embryos were isolated, fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution pH 7.4 PBS 0.1M, analyzed under a stereomicroscope and classified according to the stage of development. The Eyal-Giladi and Kochav (1975) scale was used to classify embryos in the 0-hour group, classifying embryos in roman numerals from I to XIV and for the 24, 48 and for the 72-hour groups and it was used the HH table of Hamburger and Hamilton (1951), which classifies embryos into 46 stages. For the incubation periods of 0, 24, 48, and 72 hours of incubation, the embryos presented, on mean, the stages XI, HH 6.1, HH 12.7 and HH 18.5 respectively, with no effect of breeder age. For the morphological characteristics of the eggs, it was observed that,

between 31 and 59 weeks of age of the Japanese quail breeder, the eggs become longer and wider, with greater weight, volume, and area. Therefore, it is concluded that the age of the Japanese quail breeder influences the following egg quality parameters: weight, length, width, volume, and area. On the other hand, it does not influence embryonic development up to 72 hours.

**Key-words :** quails, embryo, egg.

## **Introduction**

The artificial incubation process of fertile eggs is one of the main stages of the quail production process (Romão, 2008). To improve this technique and ensure production maximization, research is carried out on factors that influence the process of artificial incubation of fertile eggs. One of the factors that influences this process is the age of the breed, since over time, parameters related to the composition of fertile eggs and hatchability rates change because of this factor (Nowaczewski *et al.*, 2010).

As the breeders age, internal and external components of the egg undergo modifications, such as a reduction in albumen height and shell thickness (Samiullah *et al.*, 2016). In addition, during the aging period, there is an increase in the interval between ovulations and the production of larger ovarian follicles, which leads to a reduction in the laying rate and production of larger eggs (Zakaria *et al.*, 1983). Larger eggs can cause changes in embryonic development during the incubation period, and affect hatchability rates, since larger eggs have greater difficulty in losing heat due to the reduction of the thermal conductance of the shell, thus making it difficult to eliminate the metabolic heat generated by the embryo (French, 1997).

In general, this process of embryonic development in quails is comprised of two phases, inside and outside the breeder. Inside the body of birds, the process begins when the ovum is fertilized in the infundibulum and then several cell divisions take place. After oviposition, the embryogenic process continues through evolution through the stages of blastula, gastrula, neurula, organogenesis until the complete formation of the embryo (Kamini & Galef, 2004). Each step of this process was described by Hamburger and Hamilton (1951) in 46 stages.

Thus, this work aims to identify the stages of early embryonic development (from 0 to 72 hours) as a function of the age of the Japanese quail breeders, as well as morphological characteristics of the eggs such as weight, volume, length, width, and area.

## **Materials and Methods**

The research carried out was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Experimentation of the State University of Maringa/Maringa/PR according to license number 8172270619. The experiment was carried out in the Coturniculture Sector of the Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), of the Universidade Estadual de Maringa - UEM located in the State of Parana (23°21'S, 52°04'W, at an altitude of 564 m).

## **Animals and Management**

The birds in the experiment were housed in a conventional laying shed, laid out with clay tile, floor and masonry side walls 1.20 m high, complete with wire mesh up to the roof and movable side curtains. A total of 203 Japanese quails were used (145 females + 58 males), which were selected by weight and posture ( $10.52 \pm 0.72$  g), housed in a ratio of 5 females to 2 males in galvanized wire cages (25 × 39 cm) with nipple on top and trough-type feeder

in front of the cages. The birds received food and water *ad libitum*, with the laying diet provided based on corn and soybean meal with 18.92% crude protein, 2.800 metabolizable energy (kcal/kg), 2.99% calcium and 0.309% of Phosphorus (disp.), according to the composition of ingredients and nutritional requirements of these birds in the laying phase according to the Brazilian tables of poultry and swine (Rostagno et al. 2017). The lighting regime adopted was 17 hours of light (natural + artificial) to maintain the posture stimulus for the birds. The means of temperature, maximum ( $28.71 \pm 5.20^{\circ}\text{C}$ ) and minimum ( $19.24 \pm 3.26^{\circ}\text{C}$ ) as well as humidity, maximum ( $66.50 \pm 10.15^{\circ}\text{C}$ ) and minimum ( $65.02 \pm 10.98^{\circ}\text{C}$ ), were measured using a digital thermohygrometer, daily, inside the shed.

### **Experimental design and egg collection**

The treatments consisted of 04 breeder ages (31, 39, 48, 59 weeks). Every 60 days, eggs from each treatment were collected immediately after laying (between 2:00 pm and 4:00 pm), weighed (mean weight  $\pm 5\%$ ), selected (eggs with shell problems were discarded). With the aid of a digital caliper (*Digimes*, with a precision of 0.02 mm) the length and width of the eggs were measured. Through these data, the variables volume (V) and surface area (SA) of the egg were determined, calculated by the equations proposed by Narushin (2005):  $V = (0.6057 - 0.0018) L \times W^2$ , where L = Egg Length (mm) and W = Egg Width (mm);  $SA = (3.155 - 0.0136 \times L + 0.0115 \times W) \times C \times L$ , where SA = Egg Surface Area in ( $\text{cm}^2$ ), L = Egg Length (mm) and W = Egg Width (mm) ). Then, 15 eggs were opened immediately after laying and 45 eggs were incubated for 24, 48 and 72 hours in a vertical incubator (Petersime®, Labo 13 model) at 60% humidity and  $37.4^{\circ}\text{C}$ , with automatic turning.

## **Embryo collection and analysis**

At 24, 48, and 72 hours of incubation, 15 eggs of each treatment were removed from the trays, opened, identified and the embryos were isolated, washed in phosphate buffer solution and fixed in 2.5% glutaraldehyde solution pH 7.4 PBS 0.1M according to the methodology described by Gupta and Bakst (1993). After collection, embryos were transferred to the laboratory and analyzed under a stereomicroscope with a digital camera and digital analysis software (MOTIC®). For classification of the embryos obtained immediately after spawning we used the morphological criteria described in the tables of Eyal-Giladi and Kochav (1975) that classify embryos in Roman numbers from I to XIV (the number was converted as a corresponding Arabic number for statistical analysis) and for the groups 24, 48 and 72 hours of incubation we used the table of Hamburger and Hamilton (1951), which classifies embryos in 46 stages.

## **Statistical analysis**

For statistical analysis each embryo and each egg were considered an experimental unit. The data obtained were analyzed using PROC GLM of SAS (SAS Inc.) (2011) at 5% level of significance to describe the influence of the age of the matrices and incubation hours and in case of significant difference, the means were compared using Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

## **Results**

Table 1 shows the means of the variables weight (g), length (mm), width (mm), volume (cm<sup>3</sup>) and total area of the eggs under study by age of the breeders (31, 39, 48 and



59 weeks). The overall means of the eggs from the breeder breeds under study were 10.65 g weight; 31.10 mm length; 24.47 mm width; 10.50 cm<sup>3</sup> volume and 2.10 cm<sup>2</sup> total area.

The variables weight, length, width, volume, and area were influenced ( $p < 0.05$ ) by the age of the breeder (Table 1). The 59 weeks old breeder produced eggs with the highest weight (10.97 g). Breeder with 31 and 39 weeks of age presented lower weight means statistically equal (10.57 and 10.48 g respectively) and the 39 weeks old breeder presented weight of 10.67 g.

Regarding the length variable, the 59 weeks old produced the longest eggs (31.66 mm). Breeders at 31 and 39 weeks of age presented means of 30.98 and 31.28 mm, respectively, and the eggs from 48-week-old birds had the shortest length (30.61 mm).

Regarding the width, eggs from 59-week-old hens had the greatest width value, followed by the width values of eggs from 39, 48 and 31 weeks old, which averaged 24.68, 24.34 and 24.20 mm, respectively. For the volume variable, the lowest means were obtained in eggs from 39, 31 and 48 weeks old breeders which were represented by the values of 10.73; 10.26 and 10.21 cm<sup>3</sup>, respectively. Older birds (59 weeks old) had the highest mean represented by 11.07 cm<sup>3</sup>.

Table 1 – Mean characteristics of eggs from 31, 39, 48 and 59 weeks old breeder.

Age	Number of eggs	Weight (g)	Length (mm)	Width (mm)	Volume (cm <sup>3</sup> )	Area (cm <sup>2</sup> )
31	145	10.57 b	30.98 bc	24.20 b	10.26 bc	2.08 bc
39	77	10.67 ab	31.28 ab	24.68 ab	10.73 ab	2.13 ab
48	58	10.48 b	30.61 c	24.34 b	10.21 c	2.06 c
59	58	10.97 a	31.66 a	24.96 a	11.07 a	2.18 a
Mean		10.65	31.10	24.47	10.50	2.10
SEM		0.044	0.083	0.065	0.069	0.008
<i>P</i> -value		0.004	0.001	0.0002	<0.0001	<0.0001

Legend: SEM: Standard error of mean; age of the breeders in weeks.

Equal letters do not present differences in the same column, different letters differ, by Tukey test.

Breeders at 59 weeks of age produced eggs with the highest mean area represented by 2.18 cm<sup>2</sup>. In contrast, 39 and 31 weeks old breeder produced eggs with lower means of 2.13 and 2.08 cm<sup>2</sup>, respectively. On the other hand, 48 weeks old breeder produced eggs with an area of 2.06 cm<sup>2</sup>.

Regarding embryonic development, there was no effect of the age of the breeder ( $p>0.05$ ) on the incubation hours for the stages of embryonic development (Table 2).

Seventeen of the embryos collected immediately after laying were in stage X, twenty-eight in stage XI (Figure 1), twelve in stage XII and three in stage XIII. Embryos in stage X show the completed formation of the zone pellucida and a demarcated area between the zone pellucida and the opaque area. At this stage the posterior-most region of the zone pellucida remains as a transparent sickle shaped band.

The embryos from stage XI (Figure 1) to XIII, which are part of period C described by Eyal-Giladi and Kochav (1975). In this work, seventeen in stage XI (Figure 1), twelve in stage XII and four in stage XIII.

In stage XI (Figure 1), on the upper surface of the blastoderm there is a thin, smooth layer through which layers of deeper cells can be seen. In front of the posterior section of the opaque area is a transparent belt shaped area whose anterior edge is demarcated by a relatively narrow concentration of horseshoe shaped cell clusters called Koller's sickle and which from a morphological point of view comprises the beginning of the hypoblast.

In stage XII embryos the posterior transparent anterior belt is observed to which the newly formed lower layer, the hypoblast, already coats half of the lower surface of the zone pellucida. The hypoblast at this time is not completely continuous and appears to be formed by the fusion of separate cell masses. In stage XIII, the posterior margin of the hypoblast is

very pronounced on the ventral side and can also be seen on the dorsal side through the transparent epiblast, with the appearance of a continuous upper surface.

Table 2 - Mean classification of embryos from Japanese quail breeders at 31, 39, 48 and 59 weeks of age incubated After Laying to 72 hours.

Age (weeks)	Number of embryos	After Laying	Hours of incubation		
			24	48	72
31	15	XI	HH 6,26	HH 12,76	HH 18,5
39	15	XI	HH 6,20	HH 12,09	HH 18,2
48	15	XI	HH 6,00	HH 13,11	HH 18,6
59	15	XI	HH 6,00	HH 13,10	HH 18,7
Mean		XI	HH 6,11	HH 12,74	HH 18,5
SEM		0,108	0,194	0,188	0,156
<i>P</i> -value		0,798	0,948	0,322	0,738

Legend: SEA: Standard error of mean

At 24 hours of incubation, two embryos were at stage HH3, four at stage HH4, eighteen at stage HH5, fifteen at stage HH6 (Figure 2), seven at stage HH7, ten at stage HH8, and four at stage HH9, most of which were found at stage HH5. The embryo when it reaches stage HH3, the primitive line extends from the posterior margin to approximately the center of the zone pellucida. When the HH4 stage is reached, the primitive line reaches its maximum length, there is the presence of the primitive groove, the primitive fossa and Hensen's node, and the zone pellucida takes on a pear shape. At stage HH5, the notochord also called "head process" is visible and extends forward from the anterior border of the node of Hensen. In stage HH6 (Figure 2) is considered a transitional stage and there are no somites, but the development of the first fold of the embryo head occurs.

When stage HH7 is reached, the second pair of somites becomes visible and neural folds are also visible in the head region. At stage HH8 the embryos have 4 pairs of somites,

with neural pairs at the level of the mesencephalon. At stage HH9 the optic vesicles are present, and the paired primordia of the heart begin to fuse.

At 48 hours of incubation the embryos were between stages HH8 to HH14, with most of them found at stage HH12 (Figure 3) and HH13 (Figure 3). Two embryos were found at stage HH8, nine at stage HH12 (Figure 3), twenty-four at stage HH13 (Figure 3), and fourteen at stage HH14. Embryos at stage HH12 (Figure 3) have sixteen pairs of somites, a left lateral-facing head, a closed anterior neuropores, an indicated telencephalon, primary optic vesicles, and a well-established optic rod. When stage HH13 (Figure 3) is reached, they have nineteen pairs of somites, the head becomes partially turned to the left, the cranial and cervical flexures form wide curves, and enlargement of the telencephalon occurs. Stage HH14 is characterized by the presence of 22 pairs of somites, the axes of the prosencephalon and rhombencephalon form a right angle and the broad cervical flexure forms a curve.

When they reached 72 hours of incubation, the embryos were in stages HH17 to HH20, with six in stage HH17, twenty-one in stage HH18 (Figure 4), nineteen in stage HH19 and thirteen in stage HH20. When the embryo takes shape from stage HH17, it reaches the number of 29 to 32 pairs of somites, the leg buds become visible and there is an increase in the wing bud. The cervical flexion becomes more pronounced than in the previous stages. Stage HH18 (Figure 4) is characterized by the existence of 30 to 34 pairs of somites, the trunk flexion changes to the lumbar region and there is the appearance of the allantoid, with the amnion generally closed.

At stage HH19 the embryos have both wing and leg buds, the leg buds being slightly larger than the wing buds. They have 37 to 40 pairs of somites that extend to the tail. Embryos at stage HH20 have 40 to 43 pairs of somites, nearly symmetrical wing buds and

asymmetrical leg buds, the rotation process is complete, and the eyes begin to show a light grayish pigmentation.

## **Discussion**

In general, the age of the breeders exerted an increase in the variables weight, length, width, volume, and area of the eggs. This same effect was evidenced by Saucedo (2017) in his work with semi-heavy layers of different ages (28, 65 and 110 weeks) found that young birds of 28 weeks produced lighter eggs when compared to older birds at 65 and 110 weeks of age. In addition, Abanikannda and Leigh (2007) described that in chickens with increasing age of the bird, egg weight, length and width increased. In Japanese quails, Nowaczewski et al. (2010) described that there is an increase in egg size when the breeders reach 31 weeks of age.

This happens because, as the broiler breeder's aging process occurs, eggs increase in size and weight (Pedroso et al., 2005), the interval between ovulations increases, generating a longer permanence time of the egg in the oviduct of the bird, thus enabling an increase in the deposition of nutrients in the yolk and albumen (Vieira, 2001; Garcia *et al.* 2015).

The age of the matrix had no influence on embryonic development between 0 and 72 hours of incubation. In general, the embryonic development during the incubation process of fertile eggs of Japanese quail without storage happens in 46 stages of morphological changes in the embryo during the 17.5 days incubation period. According to Sellier *et al.* (2006) quail embryos from eggs collected at the time of egg-laying (0 h) are at stage XI. For the 24 h incubation period, Sellier *et al.* (2006) and Ainsworth *et al.* (2010) reported that stage HH6 is the embryonic developmental stage evident for Japanese quails in this period. In contrast, Ainsworth *et al.* (2010) evidence that for the 48-hour incubation period, Japanese quail

embryos reach stage HH 12 or HH 13. For the 72-hour incubation period, Ainsworth *et al.* (2010) reports that the Japanese quail embryo reaches stage HH18.

It has been reported that the age of the matrix only exerts influence on embryo development in embryos from broiler and chicken matrices. According to Reijrink *et al.* (2009), at the time of egg-laying, embryos from younger dams at 28 weeks of age reach the EGK stage (Elyal-Giladi & Kochav, 1975) 9.22 while embryos from older dams at 61 weeks of age reach the EGK stage 11,67. Furthermore, Damaziak *et al.* (2018) recorded that at 48 hours of incubation embryos from 70 weeks old reached the HH13 stage and embryos from younger matrices at 49 weeks of age reached the HH12 stage. According to Fassenko *et al.* (1992) this happens because older chickens tend to produce eggs in which the embryo is more developed at the time of laying.

## **Conclusions**

With increasing age of the Japanese quail breeder, the weight, length, width, volume, and area of the eggs increase, with no effect on embryonic development between 0 and 72 hours of incubation.

## **References**

- Abanikanda OTF, Leigh AO. Allometric relationship between composition and size of chicken table eggs. *International Journal of Poultry Science* 2007; 6(3) :211-217.
- Ainsworth SJ, Stanley RL, Evans DJR Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy* 2010 ; 216(1): 3-15.

- Damaziak K, Paweska M, Gozdowski D, Niemiec J. Short periods of incubation, egg turning during storage and broiler breeder hens age for early development of embryos, hatching results, chicks quality and juvenile growth. *Poultry Science* 2018 ; 97(9): 3264-3276.
- Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* 1976; 49(2):321-337.
- Fasenko GM, Robinson FE, Hardin RT, Wilson JL. Variability in preincubation embryonic development in domestic fowl. 2. Effects of duration of egg storage period. *Poultry Science* 1992 ; 71(12) : 2129– 2132.
- French NA. Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry Science* 1997; 76(1): 124-133.
- Garcia ERM, Ávila LR, Cruz FK, Rosemary PPS, Natália RB, William BF, Naiara NA. Qualidade de ovos de codornas japonesas: efeito da idade da ave, temperatura de conservação e período de armazenamento. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 2015; 18(4): 211-220.
- Gupta SK, Baskt MR. Turkey embryo staging from cleavage through hypoblast formation. *Journal of Morphology* 1993 ; 217(3) : 313-325.
- Hamburger AG, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 1951; 88(1): 42–92.
- Kamini NP, Galef BG Fertilized female quail avoid conspecific males: female tactics when potential benefits of new sexual encounters are reduced. *Animal Behaviour* 2004 ; 68(1): 1411-1416.
- Narushin VG. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. *Poultry Science* 2005 ; 84(3) : 482-484.

- Nowaczewski S, Kontecka H, Rosiński A, Koberling S, Koronowski P. Egg quality of japanese quail depends on layer age and storage time. *Folia biologica*, Warsaw 2010 ; 58(1):3-4.
- Pedroso AA, Andrade MA, Café MB, Leandro NSM, Menten JFM, Stringhini JH. Fertility and hatchability of eggs laid in the pullet-to breeder transition period and in the initial production period. *Animal Reproduction Science* 2005 ; 90(3-4) : 355-364.
- Reijrink IA, Meijerhof R, Kemp B, Graat EA, Van den Brand H. Influence of prestorage incubation on embryonic development, hatchability, and chick quality. *Poultry Science* 2009 ; 88(12): 2649– 2660.
- Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Teixeira ML, Rodrigues PB, Oliveira RF, Barreto SLT, Brito CO. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 4ed. Viçosa, MG/UFV, 2017.
- Romao JM. Avaliação da temperatura, umidade e vacinação in ovo na incubação artificial de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*). [Dissertation]. Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará; 2008.
- Samiullah S, Omar AS, Roberts J, Chousalkar K. Effect of production system and flock age on eggshell and egg internal quality measurements. *Poultry Science* 2016, 96(1): 246– 258.
- Sauceda DR. Qualidade de ovos e metabolismo em poedeiras com diferentes idades e fitase na dieta em Sistema orgânico. [Dissertation]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2017.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.4: user's Guide. Cary, NC, 2011.



Sellier N, Brillar JP, Dupuy V, Bakst MR. Comparative staging of embryo development in chicken, turkey, duck, goose, guinea fowl, and Japanese quail assessed from five. *Journal Applied Poultry Science Research* 2006 ; 15(1) : 219-228.

Vieira SL Idade da matriz, tamanho do ovo e desempenho do pintinho. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas; 2001; Campinas, São Paulo. Brasil. p. 117- 23.

Zakaria AH, Miyaki T, Imai K The effect of aging on the ovarian follicular growth in laying hens. *Poultry Science* 1983 ; 62(4): 670–674.

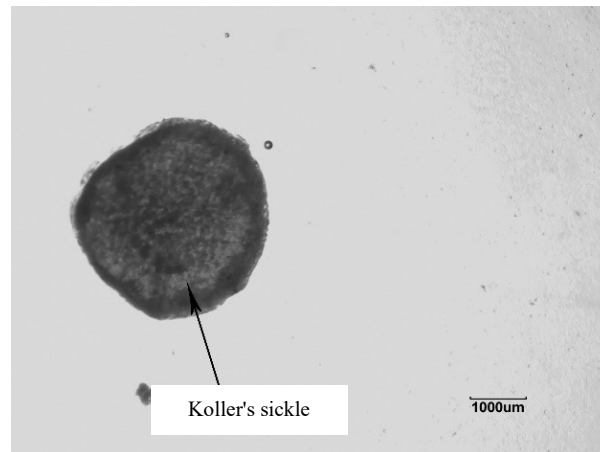


Figure 1- Japanese quail embryo collected at laying and classified in stage XI.

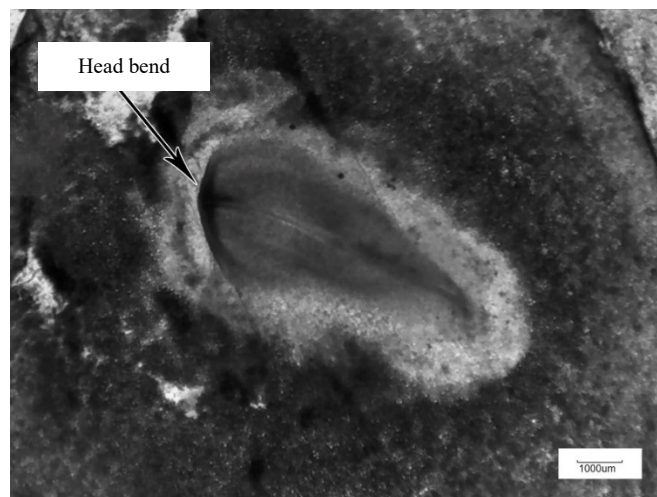


Figure 2- Japanese quail embryo incubated for 24 hours in an artificial incubator at 37.4°C and classified at stage HH 6.

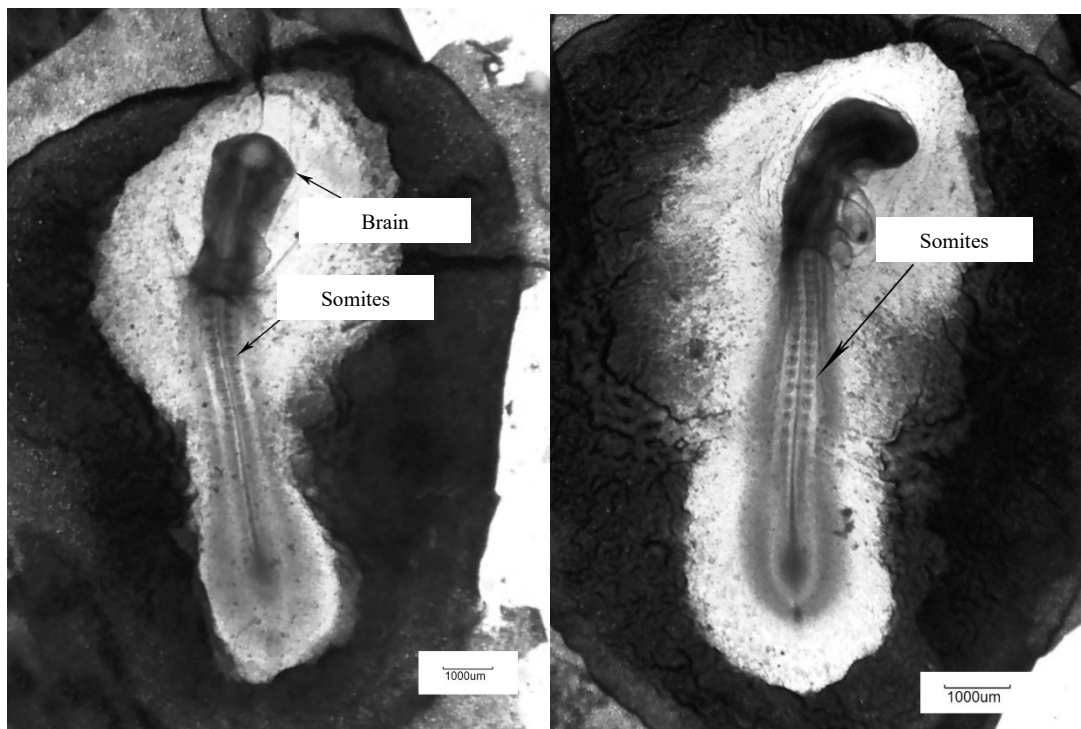


Figure 3- Japanese quail embryos classified in HH stages between 12 and 13 with 48 hours of artificial incubation at 37.4°C.

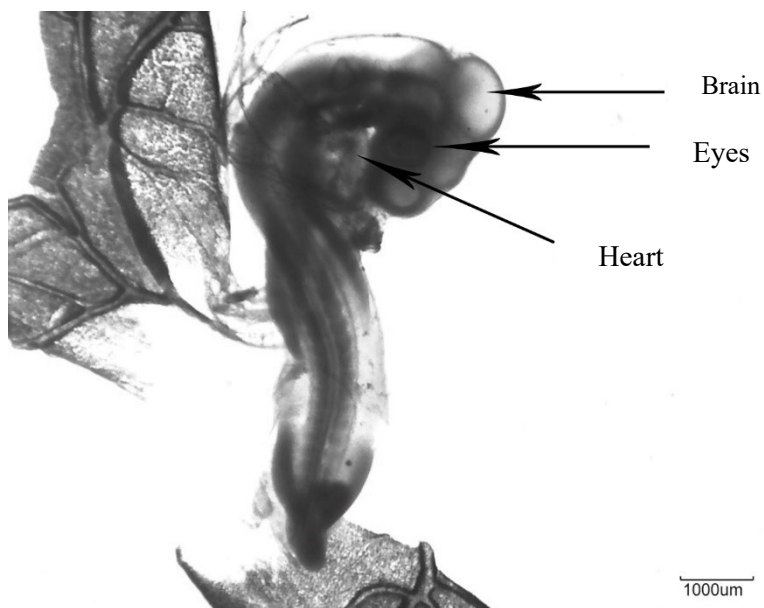


Figure 4 - Japanese quail embryo classified at stage HH 18 of development with 72 hours of artificial incubation at 37.4°C.

## **IV - Effects of short heating periods during fertile egg storage on quail embryonic development, incubation performance, chick quality and chick performance up to 35 days of age**

Artigo redigido conforme as normas da revista *Brazilian Journal of Poultry Science*

### **Abstract**

The effects of preheating fertile Japanese quail eggs during storage were analyzed on embryonic development, incubation performance, hatched chick quality and chick performance up to 35 days of age. The experiment was carried out in a completely randomized design in a  $3 \times 2 + 1$  factorial scheme, totaling seven treatments, with 3 storage periods of 3.5, 6.5 and 9.5 days and two preheating periods of 0 and 4 hours at 37.5°C and 60% RH. Preheating was performed on the third day of egg storage inside the incubator machine. The control treatment is the storage of 12 hours without heating the fertile eggs. Egg storage for a period longer than six days caused an increase in the percentage of yolk and shell, an increase in albumen pH, a reduction in the percentage of albumen, a reduction in the hatchability rate and an increase in the embryonic mortality rate. The heating of the eggs caused a reduction in the weight, length, and amount of residual yolk of the newly hatched chick. There were no effects of preheating fertile eggs of Japanese quails during storage on the variables under study. Therefore, the protocol of preheating for 4 hours at 37.5°C and 60% relative humidity during the storage period does

not produce improvements in incubation rates or chick quality in Japanese quails, and further studies are needed to determine the best protocol for preheating for Japanese quail.

**Key-Words:** embryo, hatch, preheating and progeny.

## **Introduction**

Incubation is an important step in the production chain of quail and its performance depends on a number of environmental factors, with emphasis on the storage period of the fertile eggs. Longer storage periods can reduce chick quality (Tona *et al.*, 2003), decrease hatchability rates (Fasenko *et al.*, 2001) and increase embryonic mortality (Schmidt *et al.*, 2009). Studies in quails have reported that hatchability of fertile eggs can be reduced by 02-03% after 04 days of storage even under ideal conditions (Imai *et al.*, 1986).

There is scientific evidence that prolonged storage periods induce cell death by necrosis and apoptosis, delay the recovery of embryonic growth, even under ideal incubation conditions resulting in a slow embryonic growth rate (Fasenko, 2007), with more than half of the cells that were present during egg laying dying after 10-12 days of storage (Bakst *et al.*, 2012). In addition, in this period some changes occur in egg characteristics such as: elevation of albumen pH (Gharib, 2013), reduction in Haugh Unit and egg weight (Uyanga *et al.*, 2020). These changes are responsible for negatively affecting the viability of the embryo.

Considering this, the egg heat treatment technique was developed, which consists of applying short incubation periods during the storage period in order to minimize the negative effects of prolonged storage on incubation performance. The application of this technique allows the embryo to reach the hypoblast stage, considered a stage of development more resistant to the storage period (Reijrink *et al.*, 2009), thus improving

hatchability rates, quality of incubated birds and causing a reduction in total and early embryonic mortality rates for eggs from chickens, poultry and turkeys (Abdel-Halim *et al.*, 2015; Fanseko *et al.*, 2001; Gucbilmez *et al.*, 2013). However, application of this technique before and during storage of fertile eggs of Japanese quails does not provide such comprehensive results and requires further studies (Damaziak *et al.*, 2021; Petek M. & Dikmen, 2004).

In view of this, we aimed to investigate the influence of the Prewarming technique of fertile eggs during the storage period on egg quality, embryonic development of Japanese quails, incubation performance, quality of hatched chicks and chick performance up to 35 days of age.

## **Materials and Methods**

The research carried out was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Experimentation of the State University of Maringa/Maringa/PR according to license number 4117071220.

## **Animals and management**

The experiment was conducted at the Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) of the Universidade Estadual de Maringa - UEM located in the state of Parana (23°21'S, 52°04'W, altitude of 564 m). The research was developed in the months of February, March and April which comprises the following seasons of the year: summer and fall.

It was used 800 Japanese quails (600 females + 200 males) at 15 weeks of age, selected by weight and laying, housed at the ratio of 6 females to 2 males in metal galvanized iron cages (25 × 39 cm) with nipple drinkers and trough feeders. The lighting management provided was 17 hours of light (natural + artificial) to maintain the birds'

laying stimulus. During this period, feed and water were provided *ad libitum*, and the laying diet was formulated based on corn and soybean meal (Table 1), according to the composition of ingredients and nutritional requirements of these birds in the laying phase in accordance with the Brazilian tables of poultry and swine (Rostagno et al., 2017). The mean temperatures, maximum ( $34.43 \pm 1.82^{\circ}\text{C}$ ) and minimum ( $24.40 \pm 4.11^{\circ}\text{C}$ ) as well as humidity, maximum ( $65.81 \pm 7.44^{\circ}\text{C}$ ) and minimum ( $50.71 \pm 7.70^{\circ}\text{C}$ ), were measured using a digital thermo-hygrometer, daily, inside the laying house.

### **Egg Collection and Storage**

For each storage period (12 hours, 3.5, 6.5, and 9.5 days), 200 eggs were collected from the breeders immediately after laying (between 14 and 16 hours) at intervals of every three days. These eggs were selected by weight, size, and quality (very small eggs, broken or cracked eggs, soft shells were discarded) and stored in an air conditioned refrigerated room. The mean temperatures in the digital thermometer were: maximum ( $20.59 \pm 0.51^{\circ}\text{C}$ ) and minimum ( $19.43 \pm 0.59^{\circ}\text{C}$ ) as well as humidity, maximum ( $69.48 \pm 5.53^{\circ}\text{C}$ ) and minimum ( $53.51 \pm 5.67^{\circ}\text{C}$ ).

### **Experimental design and egg Prewarming**

The experimental design used was entirely randomized in a  $3 \times 2 + 1$  factorial scheme (days of storage  $\times$  hours of Prewarming), totaling seven treatments of 200 eggs/treatment plus a control treatment with 12 hours of storage and no Prewarming. Egg storage days consisted of 3.5, 6.5 and 9.5 days. These eggs were stored in the egg storage room at an mean temperature of  $20^{\circ}\text{C}$ , and on the third day of storage for each period these eggs were pre-warmed for 0 or 04 hours inside automatic incubators that were set at  $37.5^{\circ}\text{C}$  air temperature and 60% relative humidity. Afterwards, the warmed eggs were

cooled until they reached a temperature of  $\pm 24^{\circ}\text{C}$  and then returned to the egg storage room with a temperature of  $20^{\circ}\text{C}$  until the incubation process started.

### **Egg albumen pH analysis and egg quality**

To estimate the changes in egg albumen pH, 20 eggs/treatment were used on the day of incubation. In this measurement process, the pH meter electrode was standardized using pH 7.00 buffer solution and the pH of the egg albumen was measured using the digital pH meter probe (Simpla, model pH140). Between measurements the probe was cleaned with distilled water.

To estimate changes in egg quality, 20 eggs/treatment were randomly weighed on the day of incubation. The following variables were analyzed: av egg weight (g); shell (%), albumen (%) and yolk (%); albumen and yolk height (mm), Haugh Unit (HU), yolk index (GI) and specific gravity (g/ml).

The eggs were identified, weighed on precision electronic scales and then the specific gravity (g/ml) was determined. The height of the albumen (mm) and yolk (mm) were measured using a digital pachymeter (*Digimess*, accurate to 0.02 mm) to calculate the Haugh Unit (HU) and yolk index (GI). The Haugh Unit was determined according to the equation proposed by Haugh (1937):  $\text{HU} = 100 \log (\text{H} + 7.57 - 1.7 \text{W}^{0.37})$ , where: HU = Haugh unit; H is the height of the albumen (mm) and W represents the weight of the egg (g). The yolk index was determined by the relation between yolk height (mm)/yolk diameter (mm).

### **Analysis of embryonic development**

Twenty eggs were collected from each treatment to analyze the stage of embryonic development after the storage periods (12 hours, 3.5, 6.5 and 9.5 days). For this, embryos



were washed in phosphate buffer solution and fixed in 2.5% glutaraldehyde pH 7.4 0.1M PBS solution (Gupta & Bakst, 1993). After washing, fixative was added over the embryo and after a few minutes the embryo was isolated and stored in the same fixative solution.

After collection, the embryos were analyzed under stereomicroscope with digital camera and coupled digital analysis software (MOTIC®) in the laboratory and then the developmental stages were identified from the scale described by Eyal-Giladi and Kochav (EGK) (1975), which classify the embryos in Roman number from I to XIV and the number was converted as a corresponding Arabic number for statistical analysis.

### **Incubation performance analysis, progeny quality and morphological analysis**

After the end of the storage period (12 hours, 3.5, 6.5 and 9.5 days) the eggs were incubated in an automatic incubator (Petersime®, Labo 13 model) adjusted to 60% humidity and 37.4 °C temperature, with automatic turning every 60 minutes (capacity 3.978 eggs). After 348 hours of incubation, the eggs were transferred to the hatcher (Petersime®, Labo 9 model) for another 72 hours adjusted to 37.0°C and 70% humidity. After the end of the incubation process, hatched and unhatched eggs were counted and the incubation variables were calculated as total hatchability rate, early, mid and late mortality rate. Unhatched eggs were opened to determine the mortality rate, classified into total mortality and by period (initial + average: 0-11 d and late: 12 d until hatching + pecked shell eggs not hatched). The following equations were used to obtain these indices:

$$\text{Total Hatchability Rate (\%)} = (\text{hatched chicks (n)} / \text{incubated eggs (n)}) \times 100;$$

$$\text{Total mortality rate (\%)} = (\text{total non-hatched chicks (n)} / \text{fertile eggs (n)}) \times 100;$$

$$\text{Initial mortality rate (\%)} = (\text{total early unhatched chicks (n)} / \text{fertile eggs (n)}) \times 100.$$

$$\text{Late mortality rate (\%)} = (\text{total late unhatched chicks (n)} / \text{fertile eggs (n)}) \times 100.$$

To determine progeny quality, 50 chicks per treatment were collected after hatching and classified according to the Pasgar® score, which gives a score from 1 to 10 for criteria related to reflexes, umbilical scar quality, beak, abdomen, belly button and legs, deducting one point for each irregularity found (Boerjan, 2002). The weight (g) of the newly hatched chick and the length was measured from the middle phalanx to the beak using a metric ruler.

After hatching, 20 chicks of 01 day of each treatment were sedated with isoflurane (3%) inhalation solution and after unconsciousness was verified by loss of reflexes, the birds were sacrificed by cervical dislocation. Then, to determine morphological developmental characteristics, the following data were collected: calf weight (g) and viscera weight (mg) (heart, intestine, liver, proventricle and gizzard).

### **Progeny productive performance**

Eggs were incubated under the same conditions mentioned above and after hatching, the chicks (mixed flock) were selected and distributed according to the treatments in an entirely randomized design, with six treatments and a control treatment (with 12 hours of storage and no heating) with four experimental units (box) of 20 birds to evaluate the productive performance. Daily weight gain (DWG, g), daily feed consumption (DFC, g) and feed conversion rate (FCR) were evaluated from 01 to 35 days of age and also separated into broiler (01-14 d) and rearing (15-35 d) phases.

The selected chicks were housed in a conventional house equipped with boxes (2.5 x 1 m) with rice husk bed. In the first weeks, infant water fountains were used, and in the following weeks, water was supplied through pendular water fountains. The heating in the first 15 days of the birds was done using infrared lamps to maintain the initial temperature of 35°C, and later the temperature was reduced until reaching room temperature. Feed was provided in a tubular feeder *ad libitum* and the birds were kept during this period under natural lighting. The diet provided was the same for all treatments, evaluating in this period only the residual effects of storage and preheating applied to the eggs. The diets provided in the rearing and rearing phases (Table 1) were formulated based on the nutritional requirements for quails in the Brazilian poultry and swine tables (Rostagno et al., 2017).

### **Statistical Analysis**

Egg quality, chick quality and progeny performance data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using PROC GLM of SAS (SAS Inc.) (2011) at 5% level of significance to describe the influence of preheating and days of egg storage. The means of the treatments stored with and without heating were compared with the mean of the control treatment by the Dunnett test at 5% significance also in the SAS program.

The probability of fertility or infertility, hatchability, or total mortality and initial or late mortality were analyzed in GENMOD procedures of SAS, with binomial distribution and LOGIT link function. The averages of total hatchability, fertile eggs and total mortality of the stored treatments with and without heating were compared with the average of the control treatment by contrast analysis at 5% significance in SAS.

## Results

For all parameters of egg quality, embryonic development, incubation performance, organ morphometry, quality and productive performance of the progeny there was no effect of the interaction preheating and days of storage ( $p>0.05$ ).

### Egg Quality

Egg weight decreased as a function of days of storage and Prewarming, Haugh Unit decreased as a function of Prewarming, yolk index decreased as a function of Prewarming, albumen (%) decreased, yolk (%) increased and shell (%) increased due to the effect of days of storage ( $p<0.05$ ). Finally, albumen pH increased as a function of storage days and preheating ( $p<0.05$ ) (Table 2).

When comparing the results obtained through the analysis of internal and external quality of eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days pre-heated or not, with the control group (12 hours storage without preheating) through the Dunnett test, it was observed that for the variable egg weight only the egg storage for 3.5 days did not present inferior and significant results ( $p<0.05$ ). Regarding the gravity and yolk index, eggs submitted to storage for 3.5, 6.5 and 9.5 days pre-heated or not showed inferior results to the control group ( $p<0.05$ ).

For the variable Haugh Unit, only eggs that were subjected to 9.5 and 6.5 days storage and that were subjected to the prewarming process showed lower values than the control group ( $p<0.05$ ). The albumen (%) of the eggs submitted to 9.5 days storage without Prewarming, as well as the eggs that were submitted to Prewarming and stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days showed significant lower results than the control group ( $p<0.05$ ). In relation to the shell (%) and yolk (%) variables, only the eggs submitted to preheating and stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days showed significant higher results than the control

group ( $p < 0.05$ ). pH values of the albumen of eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days, either pre-warmed or not, showed higher and significant results than the control group ( $p < 0.05$ ).

### **Embryonic development**

Regarding embryonic development, there was no effect of the interaction preheating and storage days for the stages of embryonic development, as well as no effect of storage days. However, preheating at 37.5°C for 04 hours accelerated the stage of development ( $p < 0.05$ ) (Table 2). The embryos moved from stage XI to XII on average.

The embryos that were not pre-warmed were twelve in stage X (Figure 1), sixty-two in stage XI (Figure 1) and six in stage XII (Figure 2). The embryos that were pre-warmed for 4 hours at 37.5°C were eleven in stage XI, forty-one in stage XII, and eight in stage XIII (Figure 2). The embryos in stage X present a completed formation of the zone pellucida, with a clearly demarcated region between the zone pellucida and the opaque area. The most posterior region of the zone pellucida remains as a transparent sickle-shaped band.

Embryos found at stages XI and XII, on the other hand, are classified as period C constituents as described by Eyal-Giladi and Kochav (1975). At stage XI, embryos have on their upper surface of the blastoderm a thin and thin layer through which deeper concentrations of cells can be seen. On the ventral side of the blastoderm there is a posterior section of the opaque area resembling a transparent belt, where the anterior border is demarcated by a concentration of several individual and distinctly sized groups of cells. Together they assume the horseshoe shape that is called Koller's sickle, which comprises the beginning of the hypoblast.

When stage XII is reached, the hypoblast is already visualized covering half of the lower superficial layer of the zone pellucida, presenting a discontinuous form with the appearance of formation through the fusion of segmented cell masses. In stage XIII, the

posterior margin of the hypoblast is very pronounced on the ventral side and can also be visualized on the dorsal side through the transparent epiblast, with an aspect of continuous upper surface.

### **Incubation performance, organ morphometry, quality, and production performance of progeny**

For the incubation performance variables, there was no significant difference for the interaction preheating and days of storage (Table 3). However, the days of egg storage caused significant reduction in the probability of total and fertile hatching and increase for total mortality ( $p < 0.05$ ). The variables fertility and infertility rates, early+mid and late+hatch mortality, were not influenced by any of the factors under study.

Contrast analysis showed that fertile eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days submitted or not to the preheating process presented lower results for total and fertile hatching and total mortality rates when compared to the control group (12 hours storage without preheating).

The variables related to progeny quality (chick weight, length and Pasgar® score), residual yolk sac weight and organ morphometry (heart, intestine, liver, proventricular, and gizzard weight) obtained on the first day of chick life were not influenced by the interaction preheating and days of storage (Table 4). However, preheating influenced the reduction in chick weight, length, and residual yolk sac weight ( $p < 0.05$ ).

The progeny from eggs that were not subjected to pre-incubation heating during storage showed higher values of weight (7.09g), length (11.18 mm) and residual yolk sac (0.37 g). On the other hand, when eggs were subjected to preheating, there was a reduction in weight (6.82g), length (10.67 mm) and residual yolk sac (0.28g) values of the progeny.

When compared by Dunnett's test the results of progeny quality, residual yolk sac weight and organ morphometry of newly hatched chicks from eggs stored for 3.5, 6.5 and

9.5 days pre-heated or not with the results of the same variables of chicks from eggs from the control group (stored for 12 hours without preheating), it was possible to verify that chicks from eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days submitted to the preheating process showed lower and significant results for the variables weight and length ( $p < 0.05$ ). Regarding residual yolk sac weight, chicks from eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days pre-heated or not showed lower and significant results than the control group ( $p < 0.05$ ).

The heart weight of newly hatched chicks from eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days showed significantly lower results than the control group when the eggs were pre-warmed ( $p < 0.05$ ). The intestinal weights of chicks from eggs stored for 9.5 days without Prewarming and eggs stored for 3.5, 6.5 and 9.5 days with Prewarming showed significantly lower results than the control group ( $p < 0.05$ ). Finally, the gizzard weight of newly hatched chicks was significantly lower than the control group when eggs were subjected to storage (of 3.5, 6.5 and 9.5 days) and preheating ( $p < 0.05$ ).

The productive performance of the progeny from eggs subjected to the preheating process during the storage period (Table 5) was not affected by the interaction of storage and preheating days in the phases 01 to 14 d, 15 to 35 d and 01 to 35 d. Therefore, there was no significant effect on weight (g), weight gain (g), feed consumption (g) and feed conversion (g/g) of the birds in relation to the days of storage and the preheating process. At 35 days on average, the Japanese quails had weight of 138.50 g/bird, accumulated feed consumption of 454.04 g/bird and FC of 3.61 g/g.

## **Discussion**

In the present study, the eggs that showed higher average weights were those stored for less time and that were not subjected to the preheating process. Similar effect to that found by Ondrušíková *et al.* (2018), who evaluated the average weight of quail

eggs during storage of 08 days found that there was a gradual reduction in weight from 12.27 to 11.67 g. Nowaczewski *et al.* (2010) also found that the weight of quail eggs reduced after storage (03, 05 and 08 days) at 19 °C temperature and 50-55% relative humidity compared to freshly laid eggs. The weight loss of eggs during this period is related to the loss of water in eggs that happens through evaporation and varies depending on factors such as storage period and ambient temperature (Pombo, 2003), so eggs subjected to Prewarming during storage also showed lower weight.

In this study, egg weight suffered significant effect of preheating, resulting similar to that evidenced in the study of Abdel-Halim *et al.* (2015), in which eggs that were heated for 06 hours preheating and stored for 21 days obtained significantly higher percentage of egg weight loss.

In addition to weight loss, there is a reduction in the specific gravity of Japanese quail eggs when they have been stored and subjected to the preheating process. Nowaczewski *et al.* (2010) found lower specific gravity in Japanese quail eggs stored for 05 to 08 days in a refrigerated environment compared to eggs examined on the day of laying, with a reduction in gravity of 1.065 to 1.039 g/cm<sup>3</sup>. This decrease in specific gravity also occurs due to the loss of water from eggs after laying, as a result of the evaporation process, which causes a progressive increase of the air chamber and consequently, the reduction of the egg specific gravity (Santos *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011).

The Haugh Unit was another variable that also suffered a decrease according to the days of egg storage, effect was similar to that found by Marinho (2011), who evaluated the quality of quail eggs subjected to the storage process for 30 days, and inferred that there was a linear decrease in the HU values with the increase of egg storage time right after laying (89.52 to 81.17). HU is generally used to measure the degree of albumen



deterioration during prolonged egg storage periods (Zita *et al.*, 2012). Therefore, the drop in HU values may be related to the decrease in albumen volume due to water and carbon dioxide losses, which also causes the pH to change, leading to gradual liquefaction of the albumen, accentuating the decrease in this structure (Lopes *et al.*, 2012).

Significantly lower yolk index results were also evident in eggs that were subjected to Prewarming. This reduction is due to the preheating temperature to which the eggs were subjected during the storage period. According to Souza and Souza (1995) the temperature elevation during storage causes water transfer from the albumen to the yolk, promoting its enlargement and reduction in height, and with this occurs a reduction in the value of the yolk index. Elmenawey (2019) found that there was a significant reduction in the yolk index of fertile eggs stored for 05 days and subjected to preheating.

Regarding the percentage of albumen of eggs in this study, there was a reduction as a function of storage days. According to Marinho (2011), this modification occurs in Japanese quail eggs when subjected to long periods of storage, even in refrigerated environments, due to the increase in the index and percentage of yolk, due to the denaturation of the ovomucin protein, resulting in the migration of water from the albumen to the yolk, thus raising the percentage of egg yolk. In addition, it was possible to verify in this study an increase in the percentage of eggshells. According to Melo (2015), the reduction in the percentage of shell in eggs occurs due to the decrease in the weight of albumen with the increase of the storage period, making the shell represent a larger proportion of the egg.

In the present study, the pH of albumen became more alkaline with storage and already at 3.5 days of storage it increased from 7.70 to 9.18. At the end of the storage period it reached a value of 9.38. In addition, there was an increase from 9.24 to 9.35 in the pH of the albumen when the eggs were subjected to preheating. The increase in pH

values of the albumen during storage is directly related to the loss of carbon dioxide to the environment outside the egg.  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , one of the components of the buffer system of the albumen, dissociates forming water ( $\text{H}_2\text{O}$ ) and carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) (Santos *et al.*, 2016). The  $\text{CO}_2$  is released to the environment, occurring an increase in the pH of the albumen. Marinho (2011) evidenced in his study that there was an increase from 9.33 to 9.80 in the pH of quail eggs stored even under refrigeration during the 30-day period.

Özlü *et al.* (2018) reported that heating eggs for a short period of time during storage had no influence on egg albumen characteristics. However, eggs stored for 14 days at temperatures of 12, 15, and 18°C presented increases in albumen pH values of 9.35, 9.39, and 9.42, respectively, as a function of storage days.

Regarding the stage of embryonic development, on average, stage XI was found at the time of egg laying, with advancement to stage XII after preheating of fertile eggs. Studies developed by Sellier *et al.* (2006) showed that at the time of laying the most common stage of embryonic development in Japanese quails is stage XI. From this point on, unless adequate incubation temperatures (37.4°C) are provided, the embryo will not continue the embryonic development process.

According to Özlü *et al.* (2018), when eggs are pre-warmed the progress in embryonic development stage depends on the total exposure time of eggs to heating. The authors preheated fertile broiler eggs during storage and during this period maintained the eggshell temperature above 32°C for 3.5 hours and found that eggs subjected to preheating reached more advanced developmental stage (EGK 11.14) than eggs in the control group that were not preheated (EGK 9.51).

Dymond *et al.* (2013) also inferred that there is progression in embryo development after Prewarming fertile eggs during the storage period. According to the authors, embryos at the time of oviposition were at the (EGK 10.5) stage and when

subjected to Prewarming for 06 hours at 37°C, embryos from broiler breeders advanced to stage XIV (EGK 14), in which hypoblast formation is complete. According to Rejrink *et al.* (2010), the beneficial effect of preheating during the storage of fertile eggs consists in the fact that the use of this technique allows the embryo hypoblast formation to be completed, thus making the embryo less sensitive to changes in the pH of the albumen.

The days of egg storage caused a significant reduction in the probability of total and fertile hatching and an increase for total mortality ( $p < 0.05$ ). According to Roriz *et al.* (2016), longer egg storage periods cause a reduction in hatchability rates due to the weight losses that occur in the eggs during this period, and higher loss rates are verified when these are subjected to 10 days of storage, therefore the greater weight loss of the eggs may be related to the worsening in the hatchability rate.

In a study of Japanese quail breeders, Petek and Dikmen, (2004) found lower total hatchability and fertility rates when eggs were stored for longer periods. In addition, the authors found that there is no influence of storage days, nor of the interaction storage days and preheating on initial+mid and late+shell mortality rates. Aygun and Sert (2013), evaluating the hatchability of fertile eggs of Japanese quails, found that eggs stored for 14 days had hatchability rates of 88.27 % significantly lower than eggs stored for 07 days, with this rate represented by 91.54 %. Hamza *et al.* (2020), found that storage of broiler breeder eggs for a longer period of 14 days compared to 04 days storage also resulted in significant linear decrease in hatchability of fertile and total eggs, showing higher percentage of total embryonic mortality.

Differently from the present experiment, to obtain good hatching results for eggs from Japanese quails stored for long periods of storage starting from 12 days, Damaziak *et al.* (2021) adopted the following protocol: Prewarming the eggs (at a temperature of 37.8°C and relative humidity between 50-55%) for a total time of 16 hours over 12 days

of storage (eggs being warmed on the fifth day of storage for two hours, on the seventh day of storage for 03 hours, on the ninth day of storage for 05 hours, and on the eleventh day for 06 hours) with concomitant turning of the eggs applied every 12 hours throughout the entire period. Reijrink *et al.* (2009) state that the application of Prewarming when eggs are stored for short periods does not affect hatchability rates. In addition, the adoption of the protocol of heating quail eggs at 37°C for a short term of 06 hours before storage is also configured as a technique that can increase total hatchability (Lotfi *et al.*, 2011).

The birth weight of Japanese quails is directly related to egg weight (Grzegorzówka & Gruszczyńska 2019; Chimezie *et al.*, 2020). Therefore, the lower weight values of newly hatched chicks obtained in this research are related to egg weight. The eggs that were subjected to the preheating process, showed the highest weight loss. According to Silva *et al.* (2008), the application of preheating increases the rates of water loss in eggs through the evaporation process. Gharib (2013) verified in his study that broiler breeder eggs when heated for 09 hours during pre-storage showed a higher percentage of weight loss compared to those that were not heated.

In the present study, there was a reduction in newly hatched chick length when eggs were pre-warmed. Goliomytis *et al.* (2015) found that newly hatched chick length is directly related to egg weight. Schadeck (2020) identified that chicks from broiler breeder breeds with higher weights have greater lengths. Wolanski *et al.* (2006) also found a correlation between chick birth weight and its respective length. In addition, chicks from pre-warmed eggs had lower residual yolk sac weights indicating that they absorbed more yolk. Lin *et al.* (2017) observed a significant reduction in chick length and residual yolk sac weight when eggs from broiler breeder breeds were subjected to 29.4°C preheating temperature during storage.

During the morphological analysis, the factors under study had no influence on the weight of the following organs: heart, intestines, liver, pro-entricle and gizzard. According to Silvério (2016), the storage periods of 03, 06 and 09 days of eggs have no influence on the relative weight of the variables proventricle, gizzard, liver and intestines. In addition, Reijrink *et al.* (2010) found no interactions for organ weights in the morphometric evaluation of chicks from eggs stored during the period from 04 to 14 days.

The productive performance of the progeny was not influenced by the days of storage and preheating in this study. Lesuisse *et al.* (2017), found that the performance of progeny in the field is influenced by variables related to the age and nutrition of the sows, since the diets provided in the laying phase have a direct effect on the performance of the progeny. Studies developed by Bonagurio (2017) demonstrated that the supplementation of Cantaxanthin (Cx) associated with the metabolite 25-hydroxycholecalciferol (25-(OH)D<sub>3</sub>) in the nutrition of quail breeder with ages between 32 and 38 weeks, induces the production of chicks with longer length, better Pasgar® score and better progeny performance. Furthermore, progeny performance is related to the weight of incubated eggs, however this effect is only observed until 07 days of age. González *et al.* (2011) found that there was a positive correlation between chick weight at 07 days with body length at hatching and egg weight. Yang *et al.* (2021) indicated that egg storage (0 to 14 days) decreases egg weight and offspring body weight.

Several factors that affect the environment to which the embryo is exposed before laying or before hatching are also capable of being able to affect the development of the progeny. According to Santana (2019), birds raised under stress conditions showed lower weight gain than birds raised under comfort conditions. The performance of broiler progeny subjected to 10 days storage and exposed to the preheating treatment of 37.77 °C for 3.5 hours showed significant improvement in live weight and body weight gain

when compared to eggs that were stored but not subjected to preheating (Sowlem *et al.*, 2021).

The results in this study highlight the need for future experiments with Prewarming during storage of fertile Japanese quail eggs to clarify the impacts of the protocol more accurately on egg and chick quality.

## **Conclusions**

It is concluded that the use of preheating at 37.5°C for 04 hours on the third day of storage in the pre-incubation period in eggs stored for up to 9.5 days has no influence on egg quality, incubation performance and progeny performance.

## **References**

- Abdel-Halim AA, Mohamed FR, Desoky AA, Elmenawey MA, Gharib HB. Effect of heating hatching eggs before or during storage on the alleviation of the negative effect of prolonged storage periods on hatchability. *Egypt. Poultry Science* 2015 ; 35(3) : 703-717.
- Aygun A, Sert D. Effects of prestorage application of propolis and storage time on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Poultry Science* 2013 ; 92(12) : 3330-3337.
- Bakst MR, Akuffo V, Nicholson D, French N. Comparison of blastoderm traits from 2 lines of broilers before and after egg storage and incubation. *Poultry Science* 2012 ; 91(10) :2645–2648.
- Boerjan M. Programs for single stage incubation and chick quality. *Avian and Poultry Biology Reviews* 2002 ; 13 (1) : 237–238.

- Bonagurio LP. Efeitos da associação de cantaxantina e 25-hidroxicolecalciferol para reprodutores de codornas europeias. [Dissertation]. Maringá (PR): Universidade Estadual de Maringá; 2017.
- Chimezie VO, Ademola AA, Alli OI, Jubril AE, Josiah BO Relationship between egg weight, hatching weight and subsequent body weight in the Japanese quail. *Nigerian Journal of Animal Production* 2020 ; 47(1) : 19 – 23.
- Damaziak K, Pyzel B, Zdanowska-Sąsiadek Z. Pre-incubation and turning during long storage as a method of improving hatchability and chick quality of Japanese quail eggs. *Annals of Animal Science* 2021 ; 21(1) :311–330.
- Dymond J, Vinyard B, Nicholson AD, French NA, Bakst MR. Short periods of incubation during egg storage increase hatchability and chick quality in long-stored broiler eggs. *Poultry Science* 2013 ; 92(11) :2977–2987.
- Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation : a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* 1976 ; 49 (2):321-37.
- Elmenawey MA. Effect of heat treatments during hatching eggs storage on hatchability traits and chick quality. *Egyptian Poultry Science Journal* 2019 ; 39(4): 791-808.
- Fasenko GM, Robinson FE, Whelan AI, Kremeniuk KM, Walker J A Prestorage incubation of long-term stored broiler breeder eggs: 1. Effects on hatchability. *Poultry Science* 2001 ; 80 (10):1406–1411.
- Fasenko GM. Egg storage and the embryo. *Poultry Science* 2007; 86(5):1020-1024.
- Freitas LW, Paz ICL, Garcia RG, Caldara FR, Seno LO, Félix GA, Lima ND, Ferro VMOS, Cavichiolo F. Aspectos qualitativos de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Revista Agrária* 2011 ; 4(11): 66-72.

- Gharib HB. Effect of pre-storage heating of broiler breeder eggs, stored for long periods, on hatchability and chick quality. *Egyptian Journal Animal Production* 2013; 50(3):174 -184.
- Goliomytis M, Tsipouzian T, Hager-Theodorides AL. Effects of egg storage on hatchability, chick quality, performance and immunocompetence parameters of broiler chickens. *Poultry Science* 2015; 94(9): 2257-2265.
- Gonzales E, Mello HHC, Laboissière M. Comprimento corporal como medida de qualidade do pintinho para predição do desempenho do frango de corte. In: XXII Congresso latino-americano de aves; 2011; Buenos Aires, Argentina.
- Grzegorzółka B, Gruszczyńska J. Correlations between egg weight, early embryonic development, and some hatching characteristics of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2019; 43(2): 253-258.
- Gucbilmez M, Özlü S, Shiranjang R, Elibol O, Brake J. Effects of preincubation heating of broiler hatching eggs during storage, flock age, and length of storage period on hatchability. *Poultry Science* 2013; 92(12): 3310-3313.
- Gupta SK, Bakst MR. Turkey embryo staging from cleavage through hypoblast formation. *Journal Morphology* 1993; 217(3):313-325.
- Hamza A, Yassin OE, Adam EA, Eljack BH, Ali AS, Mutaz SBM. Effect of Pre-Storage Heating of Late Dekalb Breeder's Eggs, Breeder Age and Storage Time on Egg Weight Loss, Hatchability and Chick Quality. *Journal of Agricultural Science and Food Technology* 2020 ; 6(4) : 60-68.
- Haugh RR. The Haugh unit or measuring egg quality. *U.S. Egg and Poultry Magazine* 1937 ; 43(1):552–573.
- Imai C, Mowlah A, Saito J. Storage stability of Japanese of quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs adds room temperature. *Poultry Science* 1986, 65(3): 474-480.



- Lesuisse J, Li C, Schallier S, Leblois J, Everaert N, Buyse J. Feeding broiler breeders a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period impairs reproductive performance but enhances broiler offspring performance. *Poultry Science* 2017 ; 96(11) :3949-3959.
- Lin YM, Druyan S, Yahav S, Brake J. Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affects development of the broiler embryo and yolk sac membranes, and live performance and carcass characteristics. *Poultry Science* 2017; 96(6):1939-1947.
- Lopes LLRA, Silva YL, Nunes RV, Takahashi SE, Mori C. Influência do tempo e das condições de armazenamento na qualidade de ovos comerciais. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* 2012; 18(1): 1679-7353.
- Lotfi A, Hatefinejad K, Abedi AS, Rasoolian H. Impact of egg pre-storage incubation on embryo mortality and hatching efficiencies in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *International Journal of Agricultural Biology* 2011; 13(1): 625-627.
- Marinho AM. Qualidade interna e externa de ovos de codornas japonesas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. [Dissertation]. Rio Largo (AL): Universidade Federal de Alagoas; 2011.
- Melo EF. Armazenamento e viragem dos ovos de matrizes pesadas. [Dissertation]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.
- Nowaczewski S, Kontecka H, Rosiński A, Koberling S, Koronowski P. Egg quality of japanese quail depends on layer age and storage time. *Folia biologica*, Warsaw 2010 ; 58(3-4) : 201-207.
- Ondrušíková S, Nedomová S, Pytel R, Cwíková O, Kumbár V. Effect of different storage times on japanese quail egg quality characteristics. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 2018 ; 12(1) : 560-565.

- Özlü S, Elibol O, Brake J. Effect of storage temperature fluctuation on embryonic development and mortality, and hatchability of broiler hatching eggs Poultry Science 2018 ; 97(11): 3878-3883.
- Petek M, Dikmen S. The effects of prestorage incubation of quail breeder eggs on hatchability and subsequent growth performance of progeny. Animal Research 2004; 53(6):527–534.
- Pombo CR. Efeito do tratamento térmico de ovos inteiros na perda de peso e características de qualidade interna. [Dissertation]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2003.
- Reijrink IA, Meijerhof MR, Kemp B, Graat EAM, Van den Brand H. Influence of prestorage incubation on embryonic development, hatchability, and chick quality. Poultry Science 2009 ; 88(12) : 2649–2660.
- Reijrink IA, Berghmans D, Meijerhof R, Kemp B, Van Den Brand H. Influence of egg storage time and preincubation warming profile on embryonic development, hatchability, and chick quality. Poultry Science 2010 ; 89(6) :1225–1238.
- Roriz BC, Sgavioli S, Garcia RG, Nääs IA, Domingues CHF, Caldara FR, Rombola LG, Ayla CM, Bernnecke K. Storage Period Affects Weight Loss of Japanese Quail Eggs. Brazilian Journal of Poultry Science 2016 ; 18(4) : 589-592.
- Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Teixeira ML, Rodrigues PB, Oliveira RF, Barreto SLT, Brito CO. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ed. Viçosa, MG/ UFV, 2017.
- Santana TP. Memória intergeracional: efeito do ambiente materno sobre o desenvolvimento e metabolismo oxidativo da progênie de codornas de postura

- submetidas ao estresse térmico. [Dissertation]. São Cristóvão (SE): Universidade Federal de Sergipe; 2019.
- Santos JS, Maciel LG, Seixá VNC, Araújo JA. Parâmetros avaliativos da qualidade física de ovos de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) em função das características de armazenamento. *Revista Desafios* 2016; 3(1): 54-67.
- Santos MSV, Espíndola GB, Lôbo RNB, Freitas ER, Guerra JLL, Santos ABE. Efeito da temperatura e estocagem em ovos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2009; 29(3):513-517.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.4: user's Guide. Cary, NC, 2011.
- Schadeck MM. Tipo de incubadora e idade de matrizes sobre o rendimento de incubação e qualidade de pintinhos. [Dissertation]. Dois Vizinhos (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2020.
- Schmidt GS, Figueiredo EAP, Saatkamp MG, Bomm ER Effect of storage period and egg weight on embryo development and incubation results. *Brazilian Journal Poultry Science* 2009; 11(1): 1–5.
- Sellier N, Brillar JP, Dupuy V, Bakst MR. Comparative staging of embryo development in chicken, turkey, duck, goose, guinea fowl, and Japanese quail assessed from five. *Journal Applied Poultry Science Research* 2006 ; 15(1) : 219-228.
- Silva FHA, Faria DE, Torres KAA, Faria Filho DE, Coelho ADD, Savino VJM. Influence of egg pre-storage heating period and storage length on incubation results. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2008; 10(1):17-22.
- Silvério PS. Inclusão do CLA na dieta de matrizes de corte e tempos de armazenamento de ovos incubáveis sobre o rendimento da incubação e qualidade da progênie. [Dissertation]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2016.

- Souza HB, Souza P. Efeito da temperatura de estocagem sobre a qualidade interna de ovos de codorna armazenados durante 21 dias. *Revista Alimento e Nutrição* 1995; 6(1):7-13.
- Sowlem M, Radwan A, El-Gendi G, El-Garhy O. Effect of Short Period of Incubation during Egg Storage (Spides), Storage Period and Flock Age on Productivity of Post-Hatching Broiler Chickens. *Annals of Agriculture Science* 2021; 59(3): 743 – 754.
- Tona K, Bamelis F, De Ketelaere, Bruggeman V, Moreas VMB, Buyse J, Onagbesan O, Decuypere, E. Effects of the egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poultry Science* 2003; 82(5): 736- 74.
- Uyanga VA, Onagbesan OM, Oke OE, Abiona JA, Egbeyale LT. Influence of age of broiler breeders and storage duration on egg quality and blastoderm of Marshall broiler breeders. *Journal of Applied Poultry Research* 2020 ; 29(3) : 535-544.
- Wolanski NJ, Renema RA, Robinson FE, Carney VL, Fancher BI. Relationship between chick conformation and quality measures with early growth traits in males of eight selected pure or commercial broiler breeder strains. *Poultry Science* 2006 ; 85(8) :1490-1497.
- Yang J, Zhang KY, Bai SP, Wang JP, Zeng QF, Peng HW, Xuan Y, Su ZW, Ding XM. The impacts of egg storage time and maternal dietary vitamin E on the growth performance and antioxidant capacity of progeny chicks. *Poultry Science* 2021 ; 100 (6) :101142.
- Zita L, Ledvinka Z, Tumova E, Klesalova L. Technological quality of eggs in relation to the age of laying hens and Japanese quails. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2012; 41(9): 2079-2084.

Table 1- Composition of experimental diets for quails in the initial phase, in growth and laying.

Ingredients (%)	Growth		Laying
	Initial (1-14 d)	Growth (15-28 d)	
Corn	54.03	58.55	61.30
Soybean Meal (45% PB)	38.90	35.94	28.88
Soy Oil	2.23	1.28	0.21
Dicalcium Phosphate	2.20	1.75	1.11
Limestone	1.05	0.89	6.78
Salt	0.43	0.46	0.27
DL-Methionine (99%)	0.15	0.12	0.25
L-Lysine HCl (78%)	0.01	0.01	0.38
Vitamin–mineral (Premix) <sup>1,2</sup>	1.0	1.0	0.40
Inert (Kaolin)	-	-	0.40
<b>Calculated Composition</b>			
Crude Protein	22.00	21.00	18.92
Metabolizable Energy (Kcal/Kg)	2.900	2.900	2.800
Met (dig.)	0.447	0.41	0.517
Met+Cys (dig.)	0.744	0.69	0.942
Lys (dig.)	1.095	1.03	1.149
Sodium	0.205	0.21	0.147
Calcium	1.092	0.91	2.99
Phosphorus (disp.)	0.513	0.43	0.309

<sup>1</sup> Provided per kg of product in the diet of chicks in the starter and growth stages – Vitamin A 931.000 IU; Vitamin D3: 189.000 IU; Vitamin E: 1500 mg; Vitamin K3: 156 mg; Vitamin B1: 150 mg; Vitamin B2: 500 mg; Vitamin B6: 310 mg; Vitamin B12: 1200 mg; Calcium Pantothenate: 1250 mg; Niacin: 3000 mg; Folic Acid: 75 mg; Biotin: 4 mg; Choline: 45 g; Zinc: 5 g; Iron: 5 g; Manganese: 6.05 g; Copper: 600 mg; Iodine: 77.5 mg; Se: 25.7 mg; Zinc Bacitracin: 2200 mg; Butyl Hydroxy Toluene (BHT): 1500 mg; Q.S.P Vehicle (Kaolin) 1.000 g/Kg.

<sup>2</sup> Supplied per kg of product in the diet of breeders in the laying phase – Vitamin A 2.500.000 IU; Vitamin D3: 500.000 IU; Vitamin E: 6.250 mg (equivalent to 25 mg/kg of feed); Vitamin K3: 750 mg; Vitamin B1: 625 mg; Vitamin B2: 1500 mg; Vitamin B6: 1250 mg; Vitamin B12: 5000 mg; Calcium pantothenate: 3.000mg; Niacin: 6000mg; Folic acid: 250 mg; Biotin: 50 mg; Choline: 75 g; Zn: 13 g; Fe: 13 g; Mn: 15 g; Cu: 3000 mg; I: 250 mg; Co: 50 mg; Se: 63 mg. Butyl Hydroxy Toluene (BHT): 1.000 mg.

Table 2- Quality and embryonic development in eggs submitted to preheating before incubation and different storage periods in Japanese quails (n=20).

Preheating (h)	Storage (days)	Egg weight (g)	Specific Gravity (g/ml)	Haugh Unit (%)	Yolk Index (%)	Albumen (%)	Egg Yolk (%)	Shell (%)	pH albumen	EGK Stage
Control (12h)		10.78	1074.25	89.25	0.50	62.27	30.01	7.75	7.70	11.00
0	3.5	10.34	1061.50*	88.07	0.45*	60.11	31.88	8.02	9.18*	11.00
	6.5	10.29*	1061.50*	87.48	0.43*	59.81	31.97	8.12	9.20*	11.12
	9.5	9.65*	1061.50*	86.92	0.42*	57.82*	33.28	8.18	9.28*	11.07
4	3.5	10.15*	1061.25*	86.74	0.42*	57.00*	34.13*	8.35*	9.35*	12.00
	6.5	10.00*	1061.00*	85.22*	0.41*	58.43*	34.32*	8.63*	9.38*	12.05
	9.5	9.41*	1060.50*	85.26*	0.41*	56.60*	34.49*	8.80*	9.41*	12.00
Mean		10.09	1063.04	87.00	0.44	58.91	32.83	8.27	9.07	11.46
SEM		0.059	0.452	0.365	0.005	0.405	0.377	0.062	0.050	0.060
Preheating (h)										
0		10.09 a	1061.41	87.52 a	0.44 a	58.38	33.38	8.26	9.24 b	11.06 a
4		9.85 b	1060.91	85.74 b	0.41 b	58.28	33.25	8.47	9.35 a	12.00 b
Storage (days)										
3.5		10.24 a	1061.37	86.65	0.43	59.97 a	31.92 b	8.10 b	9.23 b	11.50
6.5		10.15 a	1061.12	87.10	0.42	58.14 ab	33.69 ab	8.24 b	9.29 ab	11.57
9.5		9.53 b	1061.00	86.07	0.42	56.80 b	34.40 a	8.75 a	9.38 a	11.53
<i>P</i> -value										
Preheating		0.020	0.243	0.026	0.037	0.973	0.809	0.082	0.001	<0.0001
Storage		<0.0001	0.766	0.833	0.325	0.012	0.041	<0.0001	0.001	0.815
Interaction		0.923	0.710	0.567	0.526	0.869	0.851	0.953	0.310	0.906

Description: Storage: storage; EGK: stage of embryo development according to Eyal Giladi and Kochav (1976); SEM: standard error of mean; Preheating: preheating. a-b Equal letters show no difference in the same column, different letters differ from each other, by Tukey's Test.

\* Mean of treatments stored with and without heating were compared with mean of the control treatment by Dunnett's test.

Table 3 – Incubation performance of eggs submitted to preheating before incubation and different storage periods in Japanese quails.

	Number of Eggs	Fertility	Infertility	Total hatchability	Fertile hatchability	Mortality		
						Total (%)	M1	M2
Control (12h)	200	97.50	2.50	90.00	92.30	7.70	46.68	53.32
<i>Preheating (h)</i>								
0	525	96.58	3.42	79.85	82.69	17.31	48.50	51.50
4	505	96.83	3.47	80.35	82.99	16.40	54.74	49.18
<i>Storage (days)</i>								
3.5	375	97.33	2.67	83.48 a	85.78 a	14.22 a	40.69	59.31
6.5	355	96.62	3.38	80.85 ab	83.67 ab	15.46 a	62.25	43.41
9.5	300	96.05	3.95	75.34 b	78.47 b	21.53 b	51.77	48.23
<i>P-value</i>								
Preheating		0.820	0.820	0.840	0.900	0.704	0.428	0.764
Storage		0.647	0.647	0.031	0.047	0.037	0.086	0.249
Interaction		0.858	0.858	0.789	0.838	0.974	0.791	0.380
<i>Contrast analysis</i>								
control vs. 3.5d		-	-	0.02	0.01	0.01	-	-
control vs. 6.5d		-	-	0.003	0.003	0.007	-	-
control vs. 9.5d		-	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-	-
control vs. 0 hs		-	-	0.0008	0.0007	0.0007	-	-
control vs. 4 hs		-	-	0.001	0.001	0.001	-	-
<i>Estimated <math>\beta</math><sup>1</sup></i>								
Control	(12 h)	3.663	-3.663	2.197	2.484	-2.484	-0.133	0.133
<i>Preheating (h)</i>								
	0	3.340	-3.340	1.377	1.564	-1.564	-0.060	0.060
	4	3.420	-3.420	1.408	1.585	-1.629	0.190	-0.033
<i>Storage(days)</i>								
	3.5	3.596	-3.596	1.620	1.797	-1.797	-0.377	0.377
	6.5	3.352	-3.352	1.440	1.634	-1.699	0.500	-0.265
	9.5	3.192	-3.192	1.117	1.293	-1.293	0.071	-0.071

Description: Warehouse: storage; M1: mortality initial + mean; M2: Late death + shell death; Preheat: preheat.

<sup>1</sup> Estimated  $\beta$  = were used to estimate the probabilities by the following formula:  $y = e^{\beta}/(1+e^{\beta})$ .

a-b Equal letters show no difference in the same column, different letters differ from each other, by Tukey's Test.

Table 4- Progeny quality (n=50) and organ morphometry (n=20) of Japanese quails from eggs submitted to preheating before incubation and different storage periods.

		Weight (g)	Length (mm)	Pasgar® Score	Calf (g)	Heart (mg)	Intestine (mg)	Liver (mg)	Proventricle (mg)	Gizzard (mg)
Control (12h)		7.33	11.39	9.68	0.46	99.50	389.85	195.05	119.60	431.50
<i>Preheating (h)</i>	<i>Storage (days)</i>									
0	3.5	7.15	11.22	9.62	0.38*	82.20	346.40	176.70	97.15	373.30*
	6.5	7.05	11.18	9.60	0.38*	79.55	342.60	172.10	95.30	347.65*
	9.5	7.05	11.15	9.62	0.34*	71.50	324.95*	177.95	89.35	336.30*
4	3.5	6.84*	10.71*	9.52	0.29*	68.50*	316.35*	172.25	84.85	334.15*
	6.5	6.85*	10.66*	9.46	0.28*	68.10*	314.50*	178.25	78.15	333.30*
	9.5	6.78*	10.66*	9.44	0.27*	67.25*	313.30*	175.30	61.55	332.05*
Mean		7.01	10.99	9.56	0.34	76.65	335.42	178.22	89.42	355.46
SEM		0.035	0.024	0.033	0.011	0.002	0.005	0.002	0.006	0.006
<i>Preheating (h)</i>										
0		7.09 a	11.18 a	9.56	0.37 a	73.93	335.12	175.58	86.72	352.42
4		6.82 b	10.67 b	9.52	0.28 b	71.76	317.58	175.26	82.07	333.17
<i>Storage (days)</i>										
3.5		7.00	10.97	9.62	0.34	69.94	338.59	173.97	80.21	356.51
6.5		6.95	10.92	9.56	0.33	67.57	324.73	176.17	88.90	338.68
9.5		6.91	10.91	9.45	0.31	80.75	316.29	176.07	83.98	333.76
<i>P-value</i>										
Preheating		0.0003	<0.0001	0.650	0.0001	0.724	0.267	0.936	0.693	0.134
Storage		0.644	0.460	0.160	0.476	0.222	0.122	0.901	0.847	0.329
Interaction		0.802	0.975	0.898	0.892	0.990	0.422	0.422	0.274	0.638

Description: Storage: storage; SEM: standard error of mean; Preheating: pre-heating ;

\* Means of the stored treatments with and without heating were compared with the mean of the control treatment by the Dunnett test;

a-b Equal letters have no difference in the same column, different letters differ, by Tukey's test.



Table 5- Productive performance of Japanese quail progeny (n=20) from eggs submitted to pre-heating before incubation and different storage periods.

Variables	Control (12 h)	Preheating (h)		Storage (days)			Mean	SEM	P-value		
		0	4	3.5	6.5	9.5			Preheating	Storage	Interaction
<i>Initial, 1 a 14 d</i>											
Live weight 14 d, g	41.72	41.60	41.78	41.77	41.92	41.38	41.69	0.21	0.755	0.715	0.990
Feed consumption, g	114.45	113.75	114.42	113.15	115.48	113.63	114.14	0.52	0.565	0.236	0.623
Weight gain, g	34.72	34.61	34.80	34.74	34.94	34.43	34.71	0.21	0.732	0.745	0.988
CA, g/g	3.29	3.28	3.29	3.25	3.30	3.30	3.29	0.02	0.953	0.738	0.858
<i>Growth, 15 a 35 d</i>											
Live weight 35 d, g	140.53	138.65	140.41	139.91	139.37	139.31	138.50	0.54	0.242	0.933	0.853
Feed Consumption, g	342.73	337.54	341.30	339.87	337.00	341.40	339.89	2.14	0.432	0.742	0.475
Weight gain, g	91.80	90.05	91.65	91.11	90.48	90.97	90.99	0.55	0.232	0.915	0.825
CA, g/g	3.73	3.75	3.72	3.73	3.72	3.75	3.73	0.02	0.634	0.887	0.202
<i>Total, 1 a 35 d</i>											
Feed Consumption, g	457.19	451.30	455.73	453.02	452.48	455.04	454.04	2.34	0.412	0.917	0.636
Weight gain, g	126.53	124.67	126.46	125.86	125.42	125.41	125.70	0.62	0.232	0.958	0.867
CA, g/g	3.61	3.62	3.60	3.60	3.60	3.62	3.61	0.02	0.684	0.851	0.312
Viability, %	91.25	91.25	87.50	87.50	89.37	91.25	89.64	1.33	0.199	0.564	0.085

Description: Storage; FC: Feed conversion; SEM: Standard error of mean; Preheat: Preheating.

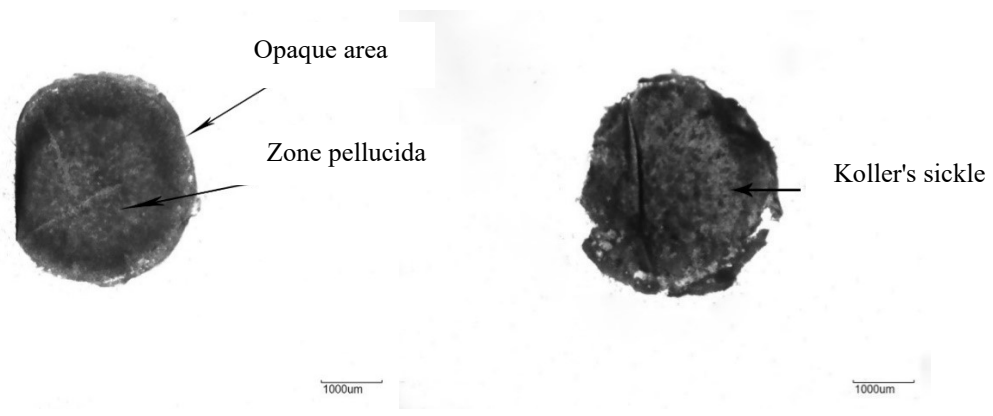


Figura 1- Japanese quail embryos classified in stages X and XI.

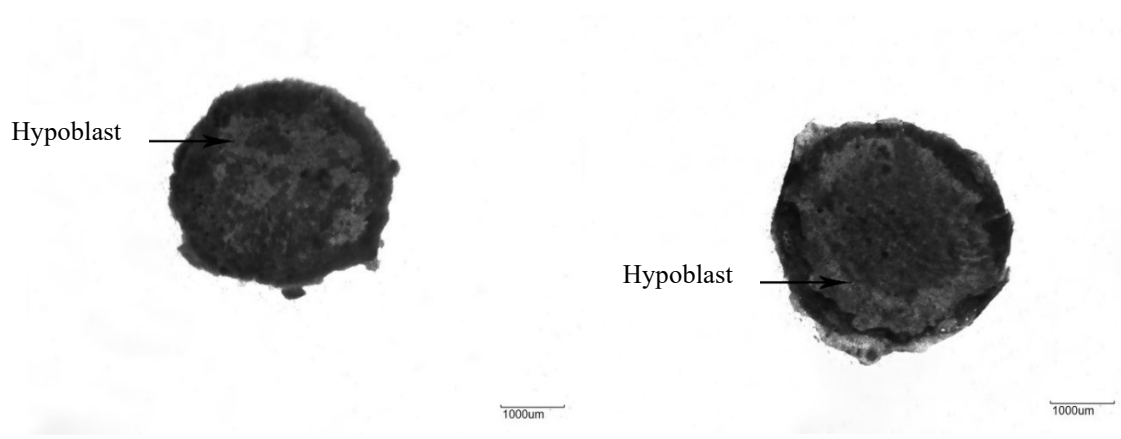


Figura 2- Embryos of Japanese quails classified in stages XII and XIII.

## V- Considerações Finais

Este trabalho demonstrou os efeitos de diferentes idades (31, 39, 48 e 59 semanas) de matrizes sobre os ovos e o desenvolvimento embrionário de codornas japonesas. Com o aumento da idade da matriz ocorre o aumento do peso, comprimento, largura, volume e área dos ovos. No entanto, não há efeito da idade da matriz sobre o desenvolvimento embrionário entre 0 e 72 horas de incubação.

Além disso, a aplicação do pré-aquecimento de 37,5°C e 60 % umidade relativa no interior de máquinas incubadoras por 04 horas em ovos férteis de codornas japonesas armazenados nos períodos de 3,5; 6,5 e 9,5 dias não produz melhorias na qualidade dos ovos, nos índices de incubação ou na qualidade e desempenho de progênie em codornas japonesas, sendo necessária a realização de mais estudos para determinar o melhor protocolo de pré-aquecimento para codornas japonesas.