



**NELSON FIJAMO MESQUITA**

**NUTRIÇÃO “*IN OVO*”: INJEÇÃO DE VITAMINA C EM OVOS  
EMBRIONADOS DE FRANGOS DE CORTE – REVISÃO  
SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

**LAVRAS - MG**

**2023**

**NELSON FIJAMO MESQUITA**

**NUTRIÇÃO “*IN OVO*”: INJEÇÃO DE VITAMINA C EM OVOS EMBRIONADOS  
DE FRANGOS DE CORTE – REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, área de concentração em  
Aspectos Nutritivos, Fisiológicos e Metabólicos na  
Produção e Reprodução de Não-Ruminantes, para a  
obtenção do título de Doutor.

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Orientador

Dra. Renata Ribeiro Alvarenga

Dr. Edison José Fassani

Co-orientadores

**LAVRAS-MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mesquita, Nelson Fijamo.

Nutrição *in ovo*: injeção de vitamina c em ovos embrionados de frangos de corte –revisão sistemática e metanálise / Nelson Fijamo Mesquita. - 2023.

64 p. : il.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): Renata Ribeiro Alvarenga, Edison José Fassani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Ácido Ascórbico. 2. Administração *in ovo*. 3. Embrião de frango. I. Zangeronimo, Márcio Gilberto. II. Alvarenga, Renata Ribeiro. III. Fassani, Edison José. IV. Título.

**NELSON FIJAMO MESQUITA**

**NUTRIÇÃO “*IN OVO*”: INJEÇÃO DE VITAMINA C EM OVOS EMBRYONADOS  
DE FRANGOS DE CORTE – REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

**“IN OVO” NUTRITION: INJECTION OF VITAMIN C IN EMBRYONATED  
BROILER EGGS – SYSTEMATIC REVIEWS AND META-ANALYSIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Aspectos Nutritivos, Fisiológicos e Metabólicos na Produção e Reprodução de Não-Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de março de 2023

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dra. Bárbara Azevedo Pereira Torres	UFLA
Dra. Renata Ribeiro Alvarenga	UFLA
Dra. Danusa Gebin das Neves	Empresa Grupo Saporiti
Dra. Bruna Resende Chaves	UNILAVRAS

Documento assinado digitalmente  
 **MARCIO GILBERTO ZANGERONIMO**  
Data: 19/09/2023 21:49:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

Dra. Renata Ribeiro Alvarenga  
Dr. Edison José Fassani  
Co-orientadores

**LAVRAS-MG**

**2023**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela bênção de cada dia, pelo amparo em todos os momentos, por me guiar, por fortalecer e por ter me ofertado tanto.

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-PPGZ/UFLA pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante o curso de doutorado.

Ao professor Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo pela orientação, confiança e paciência ao longo do doutorado sempre contribuindo com meu crescimento pessoal e profissional.

Aos doutores componentes da banca: Dra. Bárbara Azevedo Pereira Torres, Dra. Renata Ribeiro Alvarenga, Dra. Danusa Gebin das Neves e Dra. Bruna Resende Chaves pela disponibilidade e contribuição para melhoria do trabalho e para o meu aprendizado.

Ao NEPAVI, em especial, à Ana Patricia, ao Alexandre, Carla Resende, Mariana, Marcelo, Vinicius, sem vocês seria impossível realizar esse trabalho.

À minha esposa Vilma Mesquita pelo amor, paciência, conforto e apoio. Aos meus filhos Yemi Wesley e Otieno Lael, ao meu sobrinho Rogério e a minha sogra Justa de Sousa pelo amor e companheirismo.

À todos que torceram, acompanharam e de alguma forma contribuíram para a realização dessa etapa.

*Muito Obrigado!*

## RESUMO

Objetivou-se com esta metanálise avaliar o efeito da administração *in ovo* de vitamina C em ovos fertilizados sobre as características de eclosão e pós-eclosão de frangos de corte. A busca atualizada de artigos científicos foi realizada em Janeiro de 2023 em diferentes bases de dados utilizando as palavras-chave (“*vitamin C*” OR “*ascorbic acid*” OR *ascorbate*) AND “*in ovo*” AND *broiler*. Apenas artigos que avaliaram o efeito da administração *in ovo* de vitamina C sobre os parâmetros de eclosão e desempenho em frangos de corte foram utilizados. A metanálise foi realizada utilizando o modelo de efeitos aleatórios, considerando as diferenças entre os grupos inoculados com vitamina C e o grupo controle (inoculação apenas do veículo), em um intervalo de confiança de 95%. O viés de publicação foi avaliado pelo gráfico de funnel plot e pelo teste de Egger. A análise geral mostrou que a inoculação de vitamina C influenciou a eclodibilidade ( $P < 0,05$ ) e não influenciou o peso à eclosão ( $P > 0,05$ ). Aumento de eclodibilidade foi observado ( $P < 0,05$ ) apenas com 6 e 3000  $\mu\text{g/ovo}$  de vitamina C e maior peso à eclosão foi somente observado ( $P < 0,05$ ) quando 1000  $\mu\text{g/ovo}$  de vitamina C foram utilizados. A injeção *in ovo* de vitamina C aumentou ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso e reduziu ( $P < 0,05$ ) a conversão alimentar. Conclui-se que a administração *in ovo* com vitamina C na dose de 3000  $\mu\text{g/ovo}$  melhora os índices produtivos de frangos de corte independentemente da linhagem. A solução salina pode ser utilizada como diluente e a vitamina C pode ser utilizada no âmnio ou saco vitelino para o procedimento e ser administrada na idade embrionária entre 6 e 18 dias.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico. Embrião de frango. Desempenho. Eclodibilidade. Administração *in ovo*.

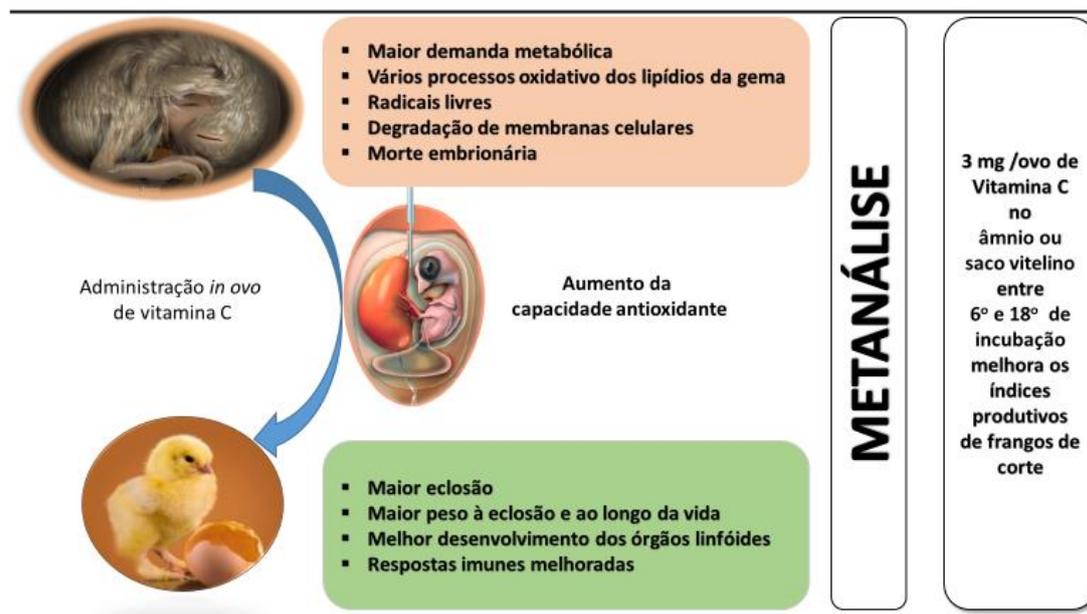
## ABSTRACT

The objective of this meta-analysis was to evaluate the effect of in ovo administration of vitamin C in fertilized eggs on the hatching and post-hatching characteristics of broiler chickens. The updated search for scientific articles was carried out in January 2023 in different databases using the keywords (“vitamin C” OR “ascorbic acid” OR ascorbate) AND “in ovo” AND broiler. Only articles that evaluated the effect of in ovo administration of vitamin C on hatching parameters and performance parameters in broiler chickens were used. The meta-analysis was carried out using the random effects model, considering the differences between the groups inoculated with vitamin C and the control group (only vehicle inoculation), at a 95% confidence interval. Publication bias was assessed using the funnel plot and Egger's test. The general analysis showed that the inoculation of vitamin C influenced ( $P < 0.05$ ) the hatchability of the eggs but did not influenced hatching weight. Increased hatchability was observed ( $P < 0.05$ ) only with 6 and 3000  $\mu\text{g}/\text{egg}$  of vitamin C and higher hatching weights was only observed ( $P < 0.05$ ) when 1000  $\mu\text{g}/\text{egg}$  of vitamin C were used. The in ovo injection of vitamin C increased ( $P < 0.05$ ) weight gain and reduced ( $P < 0.05$ ) feed conversion. It is concluded that in ovo administration with vitamin C at a dose of 3000  $\mu\text{g}/\text{egg}$  improves the productive indices of broiler chickens regardless of strain. Saline solution should be used as a diluent, with the amnion or yolk sac being the recommended sites for the procedure. Vitamin c should be administered at the embryonic age between 6 and 18 days.

Keywords: Ascorbic acid. chicken embryo. performance. hatchability. in ovo administration.

## Resumo Interpretativo e Resumo Gráfico

Nutrição *in ovo* é uma técnica de alimentação precoce de embriões e tem sido indicada para melhorar a eficiência produtiva de frangos de corte. A eclodibilidade em um incubatório é um parâmetro indicativo de sucesso de produção. O estresse oxidativo observado em embriões de frangos de rápido crescimento está associado aos metabólitos reativos de oxigênio e radicais livres e podem ser minimizados com a utilização de antioxidantes exógenos e reduzir a mortalidade embrionária. A injeção *in ovo* de vitamina C é uma das melhores estratégias que podem aumentar a capacidade antioxidante durante o período pré e pós-eclosão e aumentar a produtividade de frangos de corte. Assim, objetivou-se fazer uma metanálise de estudos para comparar os efeitos da inoculação *in ovo* de vitamina C em ovos embrionados sobre os parâmetros de eclosão e pós-eclosão em frangos de corte. No entanto, a indicação da metodologia que mais se adequa no uso desta vitamina em frangos de corte se torna importante para consolidar a técnica de nutrição *in ovo* capaz de melhorar a produtividade.



**Metanálise:** Administração *in ovo* de Vitamina C em ovos embrionados, com o objetivo de avaliar os resultados de desempenho na eclosão e pós-eclosão de frangos de corte.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma do processo de busca e seleção de artigos com base na seguinte combinação de palavras-chave: (“vitamin C” OR “ascorbic acid” OR ascorbate) AND “in ovo” AND broiler.....56
- Figura 2.** Resumo da variação na eclodibilidade (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando os seguintes subgrupos: idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação e idade do embrião na inoculação.....57
- Figura 3.** Resumo da variação ( $\Delta$ ) da eclodibilidade (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.....58
- Figura 4.** Resumo da variação do peso à eclosão (%) de frangos de corte de ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.....59
- Figura 5.** Resumo da variação do ganho de peso (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando os seguintes subgrupos: idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação, idade do embrião na inoculação e gênero das aves.....60
- Figura 6.** Resumo da variação do ganho de peso (%) de frangos de corte de ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.....61
- Figura 7.** Resumo da variação da conversão alimentar (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando os seguintes subgrupos: idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação, idade do embrião na inoculação e gênero das aves.....62
- Figura 8.** Resumo da variação da conversão alimentar (%) de frangos de corte de ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.....63

**Figura 9.** Gráfico de funil da metanálise de estudos de inoculação de Vitamina C vs. Controle com intervalo de confiança de 95% obtido com o modelo de efeito aleatório para eclodibilidade, peso a eclosão, ganho de peso e conversão alimentar. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Egger.....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Características dos estudos selecionados.....	49
<b>Tabela 2</b> Pontuação dos artigos com base nos critérios de avaliação da qualidade da evidência.....	51
<b>Tabela 3</b> Principais resultados dos estudos avaliados.....	53
<b>Tabela 4</b> Resultados da metanálise.....	55

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1 Importância da nutrição <i>in ovo</i> para a produção de frangos de corte.....	14
2.2 Influência de Vitamina C no desenvolvimento embrionário e pós-eclosão das aves	15
2.3 Injeção <i>in ovo</i> de Vitamina C .....	16
2.3.1 Eclodibilidade.....	17
2.3.2 Peso a eclosão.....	17
2.3.3 Ganho de peso.....	18
2.3.4 Conversão alimentar.....	18
2.4. Fatores que influenciam o sucesso da injeção <i>in ovo</i> de Vitamina C em frangos de corte.....	18
2.5. Considerações finais .....	19
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>
<b>SEGUNDA PARTE .....</b>	<b>28</b>
<b>De acordo com as normas da <i>Animal Feed Science and Technology</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>ARTIGO: INJEÇÃO <i>IN OVO</i> DE VITAMINA C PARA FRANGOS DE CORTE: UMA METANÁLISE .....</b>	<b>28</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Com o progresso no melhoramento genético em frangos de corte e a tendência de seleção genética para produção de carne, fez com que o desenvolvimento do sistema cardiovascular, respiratório e do sistema imunológico ficasse retardado em relação à taxa de crescimento, o que causa baixa imunidade e baixa capacidade antiestresse em frangos de corte. Adicionalmente à tecnologia nutricional na avicultura, a idade ao abate está consideravelmente menor quando comparada à décadas anteriores com a fase de crescimento, ficando esta proporcionalmente mais curta que a fase de incubação e tornando-a de maior importância.

Assim, se torna essencial e de grande interesse tomar medidas para modular o desenvolvimento do embrião de frangos de corte, a fim de que este expresse seu pleno potencial genético e subsequente crescimento.

O rápido crescimento de embriões de aves está associado a alta demanda metabólica durante o desenvolvimento embrionário, e conseqüente formação de espécies reativas de oxigênio, as quais são responsáveis pela peroxidação lipídica das membranas celulares e degeneração celular. A geração de calor metabólico excessivo dos embriões em desenvolvimento na última fase de incubação é a principal causa de morte embrionária e/ou descarte de pintinhos o que de certo modo reduz a eclodibilidade.

Sabendo-se da função antiestresse, antioxidante e imunomoduladora da vitamina C, esta pode ser utilizada para aumentar a capacidade antioxidante e imunológica de frangos de corte no processo produtivo, além dos efeitos positivos da sua administração *in ovo* sobre a eclodibilidade e o desempenho de frango de cortes.

Em contrapartida, ovos recém postos não contêm quantidades detectáveis de vitamina C, podendo esta ser biossintetizada pelo embrião no 3º ou 4º dia de incubação. Embora a vitamina C possa ser sintetizada com o desenvolvimento embrionário, as quantidades sintetizadas podem não ser suficientes durante a incubação artificial. No entanto, a injeção *in ovo* de vitamina C em ovos fertilizados desempenha um papel importante na substituição da sua deficiência e a técnica é uma das melhores estratégias para aumentar as defesas antioxidantes dos embriões. No entanto, conclusões contraditórias foram resumidas por diferentes centros de pesquisa. Porém, até o momento não há estudos suficientes que comprovem qual a melhor metodologia na técnica de administração *in ovo* com vitamina C é capaz de melhorar os índices produtivos na avicultura. Assim, objetivou-se com o presente estudo verificar por meio de metanálise, se a inoculação *in ovo* de vitamina C é capaz de

melhorar as características de eclosão e pós-eclosão de frangos de corte e também indicar a metodologia que mais se adequa para o uso desta vitamina *in ovo* em frangos de corte.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da nutrição *in ovo* para a produção de frangos de corte

A tecnologia de nutrição *in ovo* foi originalmente projetada para induzir resposta imune pela administração de vacina em incubatórios de frangos de corte. Nesse cenário, a vacinação *in ovo* abriu novas oportunidades também para a nutrição *in ovo*. O uso dessa tecnologia para avaliação da eficácia dos diversos compostos bioativos na melhoria do desenvolvimento embrionário, eclodibilidade de ovos, peso corporal à eclosão, desempenho pós-eclosão, características da carcaça e qualidade da carne, atividade antioxidante e função imunológica no plasma, morfologia intestinal, microbioma intestinal e saúde geral das aves. Além disso, gradualmente, essa tecnologia tem sido ampliada para incluir aminoácidos, carboidratos, vitaminas, probióticos, prebióticos, simbióticos, vacinas e extratos vegetais (Foye, 2005; Uni et al., 2005; Schijns et al., 2014; Young, 2015; Slawinska et al., 2019; Zhu et al., 2019; Tavaniello et al., 2020; Zhu et al., 2021). Consequentemente, a indústria avícola tem se beneficiado continuamente das vantagens oferecidas por essa tecnologia em desenvolvimento.

O trato gastrointestinal do pintinho de corte sofre alterações morfológicas e fisiológicas significativas durante os primeiros dias após eclosão. Essas mudanças ocorrem principalmente porque as aves mudam de uma dieta baseada em ácidos graxos do saco vitelino para uma dieta fornecidos por rações comerciais. O crescimento inicial e o desenvolvimento do trato gastrointestinal dos pintinhos são de importância crucial para melhorar a utilização dos nutrientes e otimizar o crescimento das aves. No sistema de produção atual, os pintinhos não têm acesso à ração por cerca de 48 a 72 horas durante o manejo pós-eclosão e transporte entre os incubatórios e as granjas de produção. Esse intervalo de tempo afeta a ingestão precoce de nutrientes, a exposição natural ao microbioma e o início da estimulação benéfica do sistema imunológico dos pintinhos. A nutrição *in ovo* pode fornecer nutrientes precoce e aditivos aos embriões, estimular a microflora intestinal e mitigar os efeitos adversos da privação de alimento durante os períodos pré e pós-eclosão (Uni and Ferket, 2004; Lilburn and Loeffler, 2015; Jha et al., 2019).

A nutrição *in ovo* é uma estratégia utilizada durante o desenvolvimento embrionário para antecipar as necessidades do pintinho, beneficiar importantes equilíbrios fisiológicos e bioquímicos, adaptar precocemente o trato gastrointestinal das aves para sua nova dieta após a eclosão e fornecer energia extra para evitar a redução dos estoques de glicogênio necessários nos primeiros dias após a eclosão (Uni et al., 2005; Cardeal et al., 2015) incluindo uma melhor

proteção oxidativa (Hajati et al., 2014; Yigit et al., 2014; Khaligh et al., 2018; Zhang et al., 2019) e resposta imunitária precoce (Zhu et al., 2019; Zhu et al., 2020 ).

Os termos nutrição *in ovo*, alimentação *in ovo*, estimulação *in ovo*, inoculação *in ovo*, injeção *in ovo*, administração *in ovo* e suplementação *in ovo* são frequentemente usados alternadamente, pois não são bem diferenciados. Assim, neste trabalho também são usados para o mesmo propósito.

Na alimentação *in ovo* diferentes nutrientes são administrados na idade embrionária para fornecer suporte nutricional para a fase pré e pós-eclosão do pintinho. Inicialmente a alimentação *in ovo* foi destinada a fornecer os nutrientes requeridos pelos embriões e apoiar os pintinhos na pós-eclosão durante a janela de nascimento e transporte para a granja. (Uni et al., 2005; Jha et al., 2019).

A injeção *in ovo* precoce (até aos 12 dias de incubação) de prebióticos e simbióticos na câmara de ar destinam-se a modular a microflora intestinal e são chamados de estimulação *in ovo*. Estes compostos bioativos são administrados para estimular o crescimento de bactérias e podem positivamente afetar o desenvolvimento intestinal e a saúde da ave. A estimulação *in ovo* com prebióticos potencializa o crescimento da microflora intestinal no ovo, levando ao crescimento do microbioma com o desenvolvimento do embrião (Slawinska et al., 2019).

## **2.2 Influência de Vitamina C no desenvolvimento embrionário e pós-eclosão das aves**

A vitamina C é um composto necessário para uma variedade de processos no corpo animal, incluindo síntese de colágeno, metabolismo de lipídios, absorção de ferro inorgânico, função antiestresse e imunomoduladora, proteção contra danos de radicais livres e redução de vitamina E oxidada à sua forma ativa. Para além disso, está envolvida na desmetilação ativa do DNA, desmetilação de histonas e outras regulações do epigenoma como cofatores de enzimas relacionadas (Bender, 2003; Khan et al., 2012; Young, 2015; Zhu et al., 2020 ; Bednarczyk et al., 2021).

A vitamina C é escassa em ovos recém-postos e pode ser biossintetizada pelo embrião em desenvolvimento no 3º ou 4º dia de incubação. No entanto, as quantidades sintetizadas podem não ser suficientes durante a incubação artificial (Nowaczewski et al., 2012). (Whitehead and Keller, 2003) afirmaram que frangos de corte só conseguem sintetizar vitamina C que atende às necessidades metabólicas após duas semanas pós-eclosão.

O rápido crescimento de embriões de aves está associado a metabólitos reativos de oxigênio e radicais livres que são produzidos a partir do metabolismo normal e podem causar

estresse oxidativo (Deeming and Pike, 2013; El-Senousey et al., 2018). A função antiestresse e imunomoduladora da vitamina C são fundamentais na saúde embrionária, especialmente no último estágio do desenvolvimento do pintinho (Goel et al., 2016). Durante o último terço de incubação, a geração de calor metabólico excessivo dos embriões em desenvolvimento é a principal causa de morte embrionária e/ou descarte de pintinhos o que afeta a eclodibilidade (Tullett, 1990). Neste contexto a vitamina C foi relatada para combater o estresse térmico nas fases finais de incubação, para diminuir a mortalidade e melhorar a eclodibilidade (Zakaria and Al-Anezi, 1996).

Atualmente a administração *in ovo* como vitamina C, tem sido indicado e com resultados promissores na modulação do sistema de defesa antioxidante e na expressão de genes imunológicos (Surai et al., 2016; Zhu et al., 2019), na reprogramação do epigenoma e regulação do desenvolvimento de embriões das aves, bem como no desempenho das aves (Nowaczewski et al., 2012; Al-Hassani and Alkafaje, 2015; Zhu et al., 2019; Zhu et al., 2020 ; Ghane et al., 2021).

No embrião em desenvolvimento e no pintinho recém-nascido, a vitamina C demonstrou modular as atividades de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (Zhang et al., 2019). Isso se torna particularmente importante devido ao fato de que os tecidos dos embriões de frango contêm uma alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados na fração lipídica e, portanto, precisam de defesa antioxidante (Surai et al., 2016). Portanto, um aumento nas concentrações séricas ou teciduais de vitamina C pode melhorar a eclodibilidade, bem como o desempenho pós-eclosão dos frangos. A vitamina C melhora as respostas relacionadas ao estresse devido à exposição ao superaquecimento durante o final da incubação (Nowaczewski et al., 2012). A injeção *in ovo* de vitamina C pode potencialmente melhorar a qualidade do embrião na incubação, melhorar o desempenho de eclosão (eclodibilidade e peso à eclosão), o subsequente desempenho pós-eclosão (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar) (Tullett, 1990; Nowaczewski et al., 2012; Zhang et al., 2018; Zhu et al., 2019).

### **2.3 Injeção *in ovo* de Vitamina C**

A seguir estão apresentados os principais resultados dos estudos incluídos na metanálise com injeção *in ovo* de vitamina C sobre os parâmetros avaliados.

### 2.3.1 Eclodibilidade

A vitamina C foi relatada para combater o estresse térmico nas fases finais de incubação, para diminuir a mortalidade e melhorar a eclodibilidade (Zakaria and Al-Anezi, 1996). Durante o último terço de incubação, a geração de calor metabólico excessivo dos embriões em desenvolvimento é a principal causa de morte embrionária e/ou descarte de pintinhos o que afeta a eclodibilidade (Tullett, 1990).

Nos estudos foram observados efeitos positivos da injeção *in ovo* de vitamina C sobre a mortalidade embrionária e eclodibilidade dos ovos com injeção de 3000µg/ovo (Zakaria and Al-Anezi, 1996; Elibol et al., 2001; Ipek et al., 2004; Nowaczewski et al., 2012; Hajati et al., 2014; Al-Hassani and Alkafaje, 2015; Zhu et al., 2019; Mohammed and Al-Hassani, 2020; Zhu et al., 2020 ; Ghane et al., 2021), com 6000 µg/ovo (Nowaczewski et al., 2012; Soltani et al., 2019), com 6µg/ovo (Ismail et al., 2019) e com 4500µg/ovo (Zhang et al., 2018) entre os dias 11 e 18 de incubação. Foram também observados similaridade na eclodibilidade de ovos com a injeção de 6000µg/ovo entre controle e tratamento (Khaligh et al., 2018) e 12000µg/ovo (Mousstaid et al., 2022 a). Por outro lado também foi relatado baixa eclodibilidade com injeção de vitamina C na dose de 50000µg/ovo (Bhanja et al., 2007), 400µg/ovo no primeiro dia de incubação (Sgavioli et al., 2015), 12000 µg/ovo (Zakaria and Al-Anezi, 1996) e durante o armazenamento dos ovos (Ebrahimi et al., 2012).

### 2.3.2 Peso a eclosão

Na avaliação do peso à eclosão foi relatado baixo peso com a injeção *in ovo* de vitamina C na dose 3000µg/ovo (Zakaria and Al-Anezi, 1996; İpek et al., 2004; Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2019; Zhu et al., 2020 ), na dose acima de 3000µg/ovo com (Zakaria and Al-Anezi, 1996; İpek et al., 2004; Bhanja et al., 2007; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019; Ghane et al., 2021; Mousstaid et al., 2022 a; Mousstaid et al., 2022 b) e nas doses abaixo de 3000µg/ovo (Zakaria and Al-Anezi, 1996; Yenilmez, 2022). Aumento de peso à eclosão foi relatado com dose de 3000µg/ovo nos estudos de Hajati et al. (2014), Soltani et al. (2019) e de Mohammed and Al-Hassani (2020). Com dose de 6000µg/ovo (Khaligh et al., 2018; Soltani et al., 2019; Zhang et al., 2019), com dose de 1000 µg/ovo (Zakaria and Al-Anezi, 1996; İpek et al., 2004). Não foram observadas diferenças no peso à eclosão em três estudos com 3000 µg/ovo, 25000 µg/ovo e 1500 µg/ovo para Ghane et al. (2021), Mousstaid et al. (2022 b) e Zhang et al. (2018) respectivamente.

### 2.3.3 Ganho de peso

No geral nos estudos foi observado ganho de peso com a injeção *in ovo* de vitamina C com exceção com as doses de 3000 µg/ovo para Soltani et al. (2019) e (Zhu et al., 2019) e 12000 µg/ovo para Mousstaid et al. (2022 b).

### 2.3.4 Conversão alimentar

A injeção *in ovo* de vitamina C melhorou a conversão alimentar de uma forma geral para diferentes doses, no entanto foi observada redução com 1000 µg/ovo para Ghane et al. (2021), com 3000 µg/ovo para Soltani et al. (2019) e Zhu et al. (2019) e com 12000 µg/ovo para Mousstaid et al. (2022 b).

## 2.4. Fatores que influenciam o sucesso da injeção *in ovo* de Vitamina C em frangos de corte

É de crucial importância considerar a via e o tempo de injeção *in ovo* da vitamina, pois podem afetar o resultado da intervenção. Normalmente, a câmara de ar e o albúmen são os locais de injeção *in ovo* quando esta se procede na fase inicial da incubação (Noy and Sklan, 1999; Bednarczyk et al., 2016; Berrocoso et al., 2017). O âmnio é direcionado para administração de soluções durante fase final da incubação, quando o pintinho dentro do ovo consome o líquido amniótico (Uni and Ferket, 2004). A seleção do local de administração depende do tipo de composto biológico que se pretende utilizar. Os nutrientes são absorvidos através de diferentes transportadores. A abundância dos transportadores e o padrão de expressão de mRNA dos transportadores podem ditar a escolha do local de administração. O saco vitelino traduz uma quantidade maior de transportador de vitamina C dependente de sódio 1 (SVCT1) do que o âmnio e é considerado a via ideal para a inoculação de vitamina C (Zhu et al., 2021). O tempo de injeção, ou seja, a idade embrionária na inoculação, é determinada pelo tipo de compostos e o resultado que se pretende trazer para os embriões.

A falta de protocolos padronizados para administração *in ovo* da vitamina, afeta a à adoção da tecnologia do programa de nutrição *in ovo*. Tomando como exemplo o veículo de administração ou diluente pode reduzir a eclodibilidade em até 10% em comparação com o controle não injetado (de Oliveira et al., 2014). A nutrição *in ovo* pode oferecer benefícios significativos para o desempenho inicial e final dos frangos de corte. No entanto, o grau de resposta dos animais à solução nutritiva inoculada pode variar de acordo com a linhagem genética, idade reprodutiva das matrizes, tamanho do ovo, local de inoculação do ovo, veículo

de inoculação, idade do embrião na inoculação, condições de incubação, manejo e processos de inoculação (Uni and Ferket, 2004). Assim, a necessidade de se estabelecer protocolos apropriados para administração da vitamina.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O melhoramento genético do frango e o rápido crescimento de embriões de frango de corte está associado a alta demanda metabólica durante o desenvolvimento embrionário, e consequente formação de espécies reativas de oxigênio, as quais são responsáveis pela peroxidação lipídica das membranas celulares e degeneração celular podendo afetar a eclodibilidade e o crescimento dos frangos. Vários pesquisadores avaliaram a administração *in ovo* de antioxidantes como a vitamina C com resultados promissores na modulação do sistema de defesa antioxidante e na expressão de genes imunológicos além dos efeitos positivos na eclodibilidade e desempenho pós-eclosão. Portanto, a injeção *in ovo* de vitamina C pode ser utilizada para aumentar a capacidade antioxidante e imunológica de frangos de corte no processo produtivo e melhorar assim a eclodibilidade

Para adaptação comercial da tecnologia torna-se necessário esclarecer questões da eficiência da técnica, resultados da sua aplicação e os benefícios nos índices de produção e os procedimentos de injeção ideais devem ser estabelecidos para obter resultados reprodutíveis e aplicação mais ampla. Apesar dos desafios ainda a serem superados, a técnica *in ovo* tem grande potencial de adaptação e aplicação comercial na avicultura.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AL-HASSANI, D.; ALKAFAJE, F. J. P. S. Effect of early feeding by *in ovo* injection with ascorbic acid at 17.5 days of incubation and feed applying inside hatching machine on final performance and some hematological traits of cobb-500 broiler chicken. **Iraqi Journal of Poultry Science**, 9, n. 1, p. 122-133, 2015.
- AL-MURRANI, W. K. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, 23, n. 2, p. 171-174, 1982.
- ARCHER, G. S.; MENCH, J. A. The effects of light stimulation during incubation on indicators of stress susceptibility in broilers. **Poultry Science**, 92, n. 12, p. 3103-3108, 2013.
- ARCHER, G. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MENCH, J. A. Effect of providing light during incubation on the health, productivity, and behavior of broiler chickens. **Poultry Science**, 88, n. 1, p. 29-37, 2009.
- ARCHER, S. G. Spectrum of White Light During Incubation: Warm vs Cool White LED Lighting. **International Journal of Poultry Science**, 15, n. 9, p. 343-348, 2016.
- BARBOSA, V.; CANCELADO, S.; BAIAO, N.; LANA, A.; LARA, L.; SOUZA, M. J. A. B. d. M. V. e. Z. Effects of relative air humidity in the hatchery and breeder hen age on the incubation yield. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.60, n. 3, p. 741-748, 2008.
- BECKER, W. A.; SPENCER, J. V.; SWARTWOOD, J. L. J. P. S. Carbon dioxide during storage of chicken and turkey hatching eggs. **Poultry Science**, 47, n. 1, p. 251-258, 1968.
- BEN SASSI, N.; AVEROS, X.; ESTEVEZ, I. Technology and Poultry Welfare. **Animals (Basel)**, 6, n. 10, Oct 11 2016.
- BENDER, D. A. **Nutritional biochemistry of the vitamins**. Cambridge university press, 2003. 1139437739.
- BHANJA, S.; MANDAL, A.; MAJUMDAR, S.; MEHRA, M. Effect of *in ovo* injection of vitamins on the chick weight and post-hatch growth performance in broiler chickens. **Indian Journal of Poultry Science**, 47, n. 3, p. 306-310, 2007.
- BOERJAN, M., 2006, **Incubação em estágio único para melhorar a uniformidade**. 325-333.
- BRUZUAL, J. J.; PEAK, S. D.; BRAKE, J.; PEEBLES, E. D. Effects of Relative Humidity During Incubation on Hatchability and Body Weight of Broiler Chicks from Young Breeder Flocks1. **Poultry Science**, 79, n. 6, p. 827-830, 2000/06/01/ 2000.
- CARINCI, P.; MANZOLI-GUIDOTTI, L. Albumen absorption during chick embryogenesis. **Journal of Embryology Experimental Morphology**. 1968.
- CARVALHO, A. V.; HENNEQUET-ANTIER, C.; CROCHET, S.; BORDEAU, T.; COUROUSSÉ, N.; CAILLEAU-AUDOUIN, E.; CHARTRIN, P.; DARRAS, V. M.; ZERJAL, T.; COLLIN, A.; COUSTHAM, V. Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. **PLoS ONE**, 15, n. 1, 2020. Article.
- CARVALHO, C. C. S.; SOUZA, C. d. F.; TINÔCO, I. d. F. F.; SANTOS, L. V.; MINETTE, L. J.; SILVA, E. P. d. Activities and Ergonomics of Workers in Broiler Hatcheries. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 17, n. 2, p. 123-136, 2015.

- CARVALHO, V.; HENNEQUET-ANTIER, A.; CROCHET, C.; BORDEAU, S.; COUROUSSÉ, T.; CAILLEAU-AUDOUIN, N.; CHARTRIN, E.; DARRAS, P.; ZERJAL, V. M.; COLLIN, T. Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. **PLOS ONE**, 15, n. 1, p. e0227700, 2020.
- CHRISTENSEN, V. L. J. W. s. P. S. J. Factors associated with early embryonic mortality. **World's Poultry Science Journal**. 57, n. 4, p. 359-372, 2001.
- CHUNG, T.-L.; BRENA, R. M.; KOLLE, G.; GRIMMOND, S. M.; BERMAN, B. P.; LAIRD, P. W.; PERA, M. F.; WOLVETANG, E. J. J. S. c. Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. **Journal of Stem Cells**. 28, n. 10, p. 1848-1855, 2010.
- COBB-VANTRESS. Cobb Sasso150: Broiler Performance & Nutrition. Supplement: **AR Performance targets and recommendations on nutritional specifications ...** 2008.
- CSERNUS, V. J.; NAGY, A. D.; FALUHELYI, N. Development of the rhythmic melatonin secretion in the embryonic chicken pineal gland. **General and Comparative Endocrinology**, 152, n. 2, p. 148-153, 2007/06/01/ 2007.
- DEEMING, C. **Avian incubation: behaviour, environment and evolution**. Oxford University Press, 2002. 0198508107.
- DEEMING, D. C.; PIKE, T. W. J. B. I. Embryonic growth and antioxidant provision in avian eggs. **Biology Letters**. 9, n. 6, p. 20130757, 2013.
- DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. J. B. e. B. A.-R. o. C. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Journal of Biochimica et Biophysica Acta -Reviews on Cancer** 1826, n. 2, p. 443-457, 2012.
- EBRAHIMI, M. R.; JAFARI AHANGARI, Y.; ZAMIRI, M. J.; AKHLAGHI, A.; ATASHI, H. Does preincubational *in ovo* injection of buffers or antioxidants improve the quality and hatchability in long-term stored eggs? **Poultry Science**, 91, n. 11, p. 2970-2976, 2012/11/01/ 2012.
- EL-SENOUSEY, H.; CHEN, B.; WANG, J.; ATTA, A.; MOHAMED, F.; NIE, Q. J. P. s. *In ovo* injection of ascorbic acid modulates antioxidant defense system and immune gene expression in newly hatched local Chinese yellow broiler chicks. **Poultry Science**. 97, n. 2, p. 425-429, 2018.
- ELIBOL, O.; TURKOGLU, M.; AKAN, M.; EROL, H. Effects of ascorbic acid injection during incubation on the hatchability of large broiler eggs. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, 25, n. 3, p. 245-248, 2001.
- FIUZA, M. A.; LARA, L. J. C.; AGUILAR, C. A. L.; RIBEIRO, B. R. C.; BAIÃO, N. C. Efeitos das condições ambientais no período entre a postura e o armazenamento de ovos de matrizes pesadas sobre o rendimento de incubação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, n. 3, p. 408-413, 2006-06 2006.
- FOYE, O.; UNI, Z.; FERKET, P. J. P. S. Effect of *in ovo* feeding egg white protein,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science** 85, n. 7, p. 1185-1192, 2006.

- FOYE, O. T. The biochemical and molecular effects of amnionic nutrient administration, “*in ovo* feeding” on intestinal development, function and carbohydrate metabolism in the liver and muscle of turkey embryos and poults. **North Carolina State University**, 2005. 0496982567.
- GEFEN, E.; AR, A. J. C. B.; MOLECULAR, P. P. A.; PHYSIOLOGY, I. Gas exchange and energy metabolism of the ostrich (*Struthio camelus*) embryo. **Journal of Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology**. 130, n. 4, p. 689-699, 2001.
- GHANE, F.; QOTBI, A.-A.-A.; SLOZHENKINA, M.; MOSOLOV, A. A.; GORLOV, I.; SEIDAVI, A.; COLONNA, M. A.; LAUDADIO, V.; TUFARELLI, V. Effects of *in ovo* feeding of vitamin E or vitamin C on egg hatchability, performance, carcass traits and immunity in broiler chickens. **Animal Biotechnology**, p. 1-6, 2021.
- GOEL, A.; BHANJA, S. K.; MEHRA, M.; MANDAL, A.; PANDE, V. J. J. o. t. S. o. F.; AGRICULTURE. *In ovo* trace element supplementation enhances expression of growth genes in embryo and immune genes in post-hatch broiler chickens. **Journal of Science Food Agriculture**. 96, n. 8, p. 2737-2745, 2016.
- HAJATI, H.; HASSANABADI, A.; GOLIAN, A.; NASSIRI-MOGHADDAM, H.; NASSIRI, M. The effect of *In ovo* injection of grape seed extract and vitamin C on hatchability, antioxidant activity, yolk sac absorption, performance and ileal micro flora of broiler chickens. **Research of Opinion in Animal Veterinary Science**, 4, n. 12, 2014.
- HALEVY, O.; PIESTUN, Y.; ROZENBOIM, I.; YABLONKA-REUVENI, Z. *In ovo* exposure to monochromatic green light promotes skeletal muscle cell proliferation and affects myofiber growth in posthatch chicks. **American Journal of Physiology – Regulate, Integrative and Comparative Physiology**, 290, p. 1062–1070., 2006.
- HIGGINS, J. P. J. h. w. C.-h. o. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.0. 2 (updated September 2009). The Cochrane Collaboration. 2009.
- HUTH, J. C.; ARCHER, G. S. Effects of LED lighting during incubation on layer and broiler hatchability, chick quality, stress susceptibility and post-hatch growth. **Poultry Science**, 94, p. 3052–3058., 2015.
- IDRIS, N. R. N.; ROBERTSON, C. The effects of imputing the missing standard deviations on the standard error of meta analysis estimates. **Communications in Statistics—Simulation and Computation**®, 38, n. 3, p. 513-526, 2009.
- İPEK, A.; ŞAHAN, Ü.; YILMAZ, B. The effect of *in ovo* ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. **Journal o Archiv Fur Geflugelkunde**. 2004.
- KADAM, M. M.; BAREKATAIN, M. R.; BHANJA, S. K.; IJI, P. A. Prospects of *in ovo* feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications--a review. **Journal of Science Food Agriculture**, 93, n. 15, p. 3654-3661, Dec 2013.

KHALIGH, F.; HASSANABADI, A.; NASSIRI-MOGHADDAM, H.; GOLIAN, A.; KALIDARI, G. A. Effects of *in ovo* injection of chrysin, quercetin and ascorbic acid on hatchability, somatic attributes, hepatic oxidative status and early post-hatch performance of broiler chicks. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 102, n. 1, p. e413-e420, 2018. Article.

KHAN, R.; NAZ, S.; NIKOUSEFAT, Z.; SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; TUFARELLI, V. J. W. s. P. S. J. Effect of ascorbic acid in heat-stressed poultry. **Journal of World's Poultry Science Journal** 68, n. 3, p. 477-490, 2012.

KORNASIO, R.; HALEVY, O.; KEDAR, O.; UNI, Z. J. P. S. Effect of *in ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**. 90, n. 7, p. 1467-1477, 2011.

LAU, J.; IOANNIDIS, J. P.; TERRIN, N.; SCHMID, C. H.; OLKIN, I. J. B. The case of the misleading funnel plot. **BMJ** 333, n. 7568, p. 597-600, 2006.

LEE, S.; LILLEHOJ, H.; JANG, S.; JEONG, M.; XU, S.; KIM, J.; PARK, H.; KIM, H.; LILLEHOJ, E.; BRAVO, D. J. P. s. Effects of *in ovo* injection with selenium on immune and antioxidant responses during experimental necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry science** 93, n. 5, p. 1113-1121, 2014.

LI, S.; ZHU, Y.; ZHI, L.; HAN, X.; SHEN, J.; LIU, Y.; YAO, J.; YANG, X. J. P. O. DNA methylation variation trends during the embryonic development of chicken. **PLoS One**. 11, n. 7, p. e0159230, 2016.

LOYAU, T.; BEDRANI, L.; BERRI, C.; METAYER-COUSTARD, S.; PRAUD, C.; COUSTHAM, V.; MIGNON-GRASTEAU, S.; DUCLOS, M. J.; TESSERAUD, S.; RIDEAU, N.; HENNEQUET-ANTIER, C.; EVERAERT, N.; YAHAV, S.; COLLIN, A. Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: a review. **Animal**, 9, n. 1, p. 76-85, Jan 2014.

LOYAU, T.; BEDRANI, L.; BERRI, C.; METAYER-COUSTARD, S.; PRAUD, C.; COUSTHAM, V.; MIGNON-GRASTEAU, S.; DUCLOS, M. J.; TESSERAUD, S.; RIDEAU, N.; HENNEQUET-ANTIER, C.; EVERAERT, N.; YAHAV, S.; COLLIN, A. Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: a review. **Animal**, 9, n. 1, p. 76-85, Jan 2015.

LU, J.; MCMURTRY, J.; COON, C. J. P. s. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry Science**. 86, n. 4, p. 673-683, 2007.

MACALINTAL, L. M. *In ovo* selenium (SE) injection of incubating chicken eggs: effects on embryo viability, tissue SE concentration, lipid peroxidation, immune response and post hatch development. **Theses and Dissertations--Animal and Food Sciences**. 4.2012.

MOHAMMED, R. J.; AL-HASSANI, D. H. The effect of early feeding by *in ovo* injection and post hatch in hatchery on some hatching traits, liver glycogen and duodenal villi of broiler chickens. **Biochemistry Cell Archieve** , 2, 20, p. 4003-4007, 2020.

- MORAN JR, E. T. J. P. s. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry science**. 86, n. 5, p. 1043-1049, 2007.
- MOUSSTAAID, A.; FATEMI, S. A.; ELLIOTT, K. E. C.; ALQHTANI, A. H.; PEEBLES, E. D. Effects of the *In ovo* Injection of L-Ascorbic Acid on Broiler Hatching Performance. **Animals**, 12, n. 8, p. 1020, 2022.
- NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSZTIANIAK, S. Effect of *in ovo* injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. **Folia Biologica (Kraków)**, 60, n. 1-2, p. 93-97, 2012.
- NOY, Y.; SKLAN, D. Different Types of Early Feeding and Performance In Chicks and Poult. **Journal of Applied Poultry Research**, 8, n. 1, p. 16-24, 1999/03/01/ 1999.
- OMEDE, A.; BHUIYAN, M.; IJI, P. J. A.-A. J. o. A. S. Physico-chemical properties of late-incubation egg amniotic fluid and a potential *in ovo* feed supplement. **J Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 30, n. 8, p. 1124-1134, 2017.
- ÖZKAN, Y.; YILMAZ, Ö.; ÖZTÜRK, A. İ.; ERŞAN, Y. J. C. B. I. Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and  $\alpha$ -lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. **Cell Biology International**. 29, n. 9, p. 754-760, 2005.
- PEEBLES, E.; BRAKE, J.; GILDERSLEEVE, R. J. P. S. Effects of eggshell cuticle removal and incubation humidity on embryonic development and hatchability of broilers. **Poultry Science**. 66, n. 5, p. 834-840, 1987.
- PEEBLES, E. D.; BURNHAM, M. R.; GARDNER, C. W.; BRAKE, J.; BRUZUAL, J. J.; GERARD, P. D. Effects of Incubational Humidity and Hen Age on Embryo Composition in Broiler Hatching Eggs from Young Breeders. **Poultry Science**, 80, n. 9, p. 1299-1304, 2001/09/01/ 2001.
- PIESTUN, Y.; HALEVY, O.; YAHAV, S. Thermal manipulations of broiler embryos--the effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Science**, 88, n. 12, p. 2677-2688, Dec 2009.
- PROUDFOOT, F. J. P. S. The effect of film permeability and concentration of nitrogen, oxygen and helium gases on hatching eggs stored in polyethylene and Cryovac bags. **Poultry Science** 44, n. 3, p. 636-644, 1965.
- RETES, P. L.; CLEMENTE, A. H. S.; NEVES, D. G.; ESPÓSITO, M.; MAKIYAMA, L.; ALVARENGA, R. R.; PEREIRA, L. J.; ZANGERONIMO, M. G. *In ovo* feeding of carbohydrates for broilers - a systematic review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 102, n. 2, p. 361-369, 2018. Review.
- ROGERS, L. J.; ANDREW, R. J.; JOHNSTON, A. N. B. Light experience and the development of behavioural lateralization in chicks: III. Learning to distinguish pebbles from grains. **Behavioural Brain Research**, 177, n. 1, p. 61-69, 2007/02/12/ 2007.

SANTOS, C. M. d. C.; PIMENTA, C. A. d. M.; NOBRE, M. R. C. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, 15, p. 508-511, 2007.

SAUVANT, D.; SCHMIDELY, P.; DAUDIN, J.-J.; ST-PIERRE, N. R. J. A. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition\*. **Animal**, 2, n. 8, p. 1203-1214, 2008.

SCHIAFFINO, S.; DYAR, K. A.; CICILIOT, S.; B. B.; SANDRI, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS Journal**, 280, n. 17, p. 4294-4314, 2013.

SGAVIOLI, S.; MATOS, J. B.; BORGES, L. L.; PRAES, M.; MORITA, V. S.; ZANIRATO, G. L.; GARCIA, R. G.; BOLELI, I. C. Effects of Ascorbic Acid Injection in Incubated Eggs Submitted to Heat Stress on Incubation Parameters and Chick Quality. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 17, n. 2, p. 181-189, Apr-Jun 2015.

SHAFEY, T.; AL-MOHSEN, T. Embryonic Growth, Hatching Time and Hatchability Performance of Meat Breeder Eggs Incubated under Continuous Green Light. **Australian Journal of Animal Science**, 15, p. 1702–1707., 2002.

SLAWINSKA, A.; DUNISLAWSKA, A.; PLOWIEC, A.; RADOMSKA, M.; LACHMANSKA, J.; SIWEK, M.; TAVANIELLO, S.; MAIORANO, G. J. P. O. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery *In ovo*. **PLoS One**, 14, n. 2, p. e0212318, 2019.

SOLTANI, T.; SALARMOINI, M.; AFSHARMANESH, M.; TASHARROFI, S. The Effects of *In ovo* Injection of Ascorbic Acid on Hatchability, Growth Performance, Intestinal Morphology, and Tibia Breaking Strength in 36h Post Hatch Fasted Broiler Chickens. **Poultry Science Journal**, 7, n. 1, p. 43-49, Win-Spr 2019.

STATA CORP. **STATA. Statistics/Data Analysis**. Versão 16.0. Texas: StataCorp, 2019.

STEFANIAK, T.; MADEJ, J. P.; GRACZYK, S.; SIWEK, M.; ŁUKASZEWICZ, E.; KOWALCZYK, A.; SIENŃCZYK, M.; MAIORANO, G.; BEDNARCZYK, M. J. A. Impact of prebiotics and synbiotics administered *in ovo* on the immune response against experimental antigens in chicken broilers. **Animals**, 10, n. 4, p. 643, 2020.

SUAREZ, M.; WILSON, H.; MATHER, F.; WILCOX, C.; MCPHERSON, B. J. P. S. Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. **Poultry Science**, 76, n. 7, p. 1029-1036, 1997.

SURAI, P. F.; FISININ, V. I.; KARADAS, F. J. A. N. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. **Animal Nutrition**, 2, n. 1, p. 1-11, 2016.

TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. J. T. J. o. n. b. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 16, n. 6, p. 339-346, 2005.

- TAVANIELLO, S.; SLAWINSKA, A.; PRIORIELLO, D.; PETRECCA, V.; BERTOCCHI, M.; ZAMPIGA, M.; SALVATORI, G.; MAIORANO, G. J. P. s. Effect of galactooligosaccharides delivered *in ovo* on meat quality traits of broiler chickens exposed to heat stress. **Poultry Science**, 99, n. 1, p. 612-619, 2020.
- TULLETT, S. J. P. S. Science and the art of incubation. **Poultry Science**, 69, n. 1, p. 1-15, 1990.
- UNI, Z.; FERKET, R. J. W. s. P. S. J. Methods for early nutrition and their potential. 60, n. 1, p. 101-111, 2004.
- UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, 60, n. 1, p. 101-111, 2003.
- UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, 82, n. 2, p. 320-327, Feb 2003.
- VAN DE VEN, L. J.; VAN WAGENBERG, A. V.; DEBONNE, M.; DECUYPERE, E.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Hatching system and time effects on broiler physiology and posthatch growth. **Poultry Science**, 90, n. 6, p. 1267-1275, Jun 2011.
- WASHBURN, K. W. Genetic Variation in the Chemical Composition of the Egg1. **Poultry Science**, 58, n. 3, p. 529-535, 1979/05/01/ 1979.
- WHITEHEAD, C. C.; KELLER, T. An update on ascorbic acid in poultry. **World's Poultry Science Journal**, 59, n. 2, p. 161-184, 2003/06/01 2003.
- WILSON, H. Interrelationships of egg size, chick size, posthatching growth and hatchability. **World's Poultry Science Journal**, 47, n. 1, p. 5-20, 1991.
- YADGARY, L.; YAIR, R.; UNI, Z. J. P. S. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. **Poultry Science**. 90, n. 2, p. 410-416, 2011.
- YOUNG, J. I.; ZÜCHNER, S.; WANG, G. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. **Annual Review of Nutrition**. 35, n. 1, p. 545-564, 2015.
- ZAKARIA, A.; AL-ANEZI, M. J. P. S. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality, and the body weights of broiler chickens. **Poultry Science**. 75, n. 10, p. 1204-1209, 1996.
- ZHANG, H.; ELLIOTT, K. E. C.; DUROJAYE, O. A.; FATEMI, S. A.; PEEBLES, E. D. Effects of *in ovo* administration of L-ascorbic acid on broiler hatchability and its influence on the effects of pre-placement holding time on broiler quality characteristics. **Poultry Science**, 97, n. 6, p. 1941-1947, 2018/06/01/ 2018.
- ZHANG, H.; ELLIOTT, K. E. C.; DUROJAYE, O. A.; FATEMI, S. A.; SCHILLING, M. W.; PEEBLES, E. D. Effects of *in ovo* injection of L-ascorbic acid on growth performance, carcass composition, plasma antioxidant capacity, and meat quality in broiler chickens<sup>1,2,3</sup>. **Poultry Science**, 98, n. 9, p. 3617-3625, 2019/09/01/ 2019.

ZHANG, L.; ZHANG, H. J.; QIAO, X.; YUE, H. Y.; WU, S. G.; YAO, J. H.; QI, G. H. Effect of monochromatic light stimuli during embryogenesis on muscular growth, chemical composition, and meat quality of breast muscle in male broilers. **Poultry Science**, 91, p. Poult. Sci.1026–1031., 2011.

ZHANG, L.; ZHU, X. D.; WANG, X. F.; LI, J. L.; GAO, F.; ZHOU, G. H. Green light-emitting diodes light stimuli during incubation enhances posthatch growth without disrupting normal eye development of broiler embryos and hatchlings. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 29, p. 1562-1568, 2016.

ZHU, L. Q.; WANG, J.; LI, Z. P.; MA, H. Y.; ZHU, Y. F.; YANG, X. J.; YANG, X. *In ovo* feeding of vitamin C regulates splenic development through purine nucleotide metabolism and induction of apoptosis in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, 126, n. 5, p. 652-662, Sep 2020 a.

ZHU, Y.; LI, S.; DUAN, Y.; REN, Z.; YANG, X.; YANG, X. Effects of *in ovo* feeding of vitamin C on post-hatch performance, immune status and DNA methylation-related genes expression in broiler chickens. **The British journal of nutrition**, p. 1-27, 2020 b. Article in Press.

ZHU, Y. F.; LI, S. Z.; SUN, Q. Z.; YANG, X. J. Effect of *in ovo* feeding of vitamin C on antioxidation and immune function of broiler chickens. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, 13, n. 9, p. 1927-1933, 2019. Article.

ZHU, Y. F.; ZHAO, J. F.; WANG, C. X.; ZHANG, F.; HUANG, X. H.; REN, Z. Z.; YANG, X.; LIU, Y. L.; YANG, X. J. Exploring the effectiveness of *in ovo* feeding of vitamin C based on the embryonic vitamin C synthesis and absorption in broiler chickens. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 12, n. 1, Aug 2021.

## SEGUNDA PARTE

De acordo com as normas da *Animal Feed Science and Technology*

### ARTIGO: INJEÇÃO *IN OVO* DE VITAMINA C PARA FRANGOS DE CORTE: UMA METANÁLISE

#### RESUMO

Objetivou-se com esta metanálise avaliar o efeito da administração *in ovo* de vitamina C em ovos fertilizados sobre as características de eclosão e pós-eclosão de frangos de corte. A busca atualizada de artigos científicos foi realizada em Janeiro de 2023 em diferentes bases de dados utilizando as palavras-chave (“*vitamin C*” OR “*ascorbic acid*” OR *ascorbate*) AND “*in ovo*” AND *broiler*. Apenas artigos que avaliaram o efeito da administração *in ovo* de vitamina C sobre os parâmetros de eclosão e desempenho em frangos de corte foram utilizados. A metanálise foi realizada utilizando o modelo de efeitos aleatórios, considerando as diferenças entre os grupos inoculados com vitamina C e o grupo controle (inoculação apenas do veículo), em um intervalo de confiança de 95%. O viés de publicação foi avaliado pelo gráfico de funnel plot e pelo teste de Egger. A análise geral mostrou que a inoculação de vitamina C influenciou ( $P < 0,05$ ) a eclodibilidade dos ovos e não influenciou o peso à eclosão ( $P > 0,05$ ). Aumento de eclodibilidade foi observado ( $P < 0,05$ ) apenas com 6 e 3000  $\mu\text{g/ovo}$  de vitamina C e maiores pesos à eclosão foram observados ( $P < 0,05$ ) quando 1000 e 6000  $\mu\text{g/ovo}$  de vitamina C foram utilizados. A injeção *in ovo* de vitamina C aumentou ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso e reduziu ( $P < 0,05$ ) a conversão alimentar. Conclui-se que a administração *in ovo* com vitamina C na dose de 3000  $\mu\text{g/ovo}$  melhora os índices produtivos de frangos de corte independentemente da linhagem. A solução salina deve ser utilizada como diluente sendo o âmnio ou saco vitelino os locais recomendados para o procedimento. A vitamina C deve ser administrada na idade embrionária entre 6 e 18 dias.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico, embrião de frango, desempenho, eclodibilidade, administração *in ovo*

## Introdução

O rápido crescimento de embriões de aves está associado a alta demanda metabólica durante o desenvolvimento embrionário, e consequente formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são responsáveis pela peroxidação lipídica das membranas celulares e degeneração celular (Deeming and Pike, 2013; El-Senousey et al., 2018). Durante o período de eclosão, os embriões de frangos de corte apresentam maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, provavelmente devido ao aumento da taxa metabólica e consumo de oxigênio, bem como altos níveis de ácidos graxos polinsaturados teciduais e reservas naturais insuficientes de antioxidantes (Malheiros et al., 2012). Nesse contexto, o desenvolvimento e a sobrevivência das aves nos primeiros dias após a eclosão podem ser influenciados pelos efeitos negativos das ROS.

O sistema de defesa antioxidante e a imunidade desempenham papéis fundamentais na saúde embrionária, especialmente no último estágio do desenvolvimento embrionário (Malheiros et al., 2012; Goel et al., 2016). De maneira geral, o sistema de defesa antioxidante inclui enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, além das vitaminas C e E e ácido  $\alpha$ -lipóico (Özkan et al., 2005; Surai et al., 2016; El-Senousey et al., 2018).

Nowaczewski et al. (2012) relataram que ovos férteis recém postos não contêm níveis detectáveis de vitamina C, apesar desta vitamina pode ser biossintetizada pelo embrião em desenvolvimento no 3º ou 4º dia de incubação. Embora a vitamina C possa ser sintetizada com o desenvolvimento embrionário, as quantidades sintetizadas podem não ser suficientes durante a incubação. Sabe-se que a concentração plasmática de vitamina C atinge o pico no dia 12 do desenvolvimento embrionário e depois cai antes de aumentar novamente no dia 20, quando a respiração pulmonar começa. As mudanças dinâmicas nos níveis de vitamina C nos embriões sugerem a importância desta vitamina para o desenvolvimento embrionário ideal na fase final

de incubação. Foi relatado que a vitamina C combate ao estresse térmico na fase final da incubação e diminui a mortalidade e melhora a eclodibilidade dos ovos (Zakaria and Al-Anezi, 1996) . A vitamina C é amplamente conhecida pela melhora da capacidade antioxidante (İpek et al., 2004), além de potencializadora da função imunológica (Zakaria and Al-Anezi, 1996) e aumento da resistência a reações inflamatórias (Zhu et al., 2021).

Para prevenir a peroxidação lipídica das membranas celulares, vários pesquisadores avaliaram a injeção *in ovo* de vitamina C, com resultados promissores na modulação do sistema de defesa antioxidante e na expressão de genes imunológicos (Surai et al., 2016; Zhu et al., 2019). Além disso, efeitos positivos também têm sido observados sobre a eclosão e o desempenho das aves (Hajati et al., 2014; Zhang et al., 2018; Soltani et al., 2019; Mohammed and Al-Hassani, 2020; Ghane et al., 2021). Por outro lado, foram também relatados baixa eclodibilidade (Bhanja et al., 2007; Ebrahimi et al., 2012; Sgavioli et al., 2015; Khaligh et al., 2018), baixo peso à eclosão (Zakaria and Al-Anezi, 1996; Bhanja et al., 2007; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2020 ; Mousstaaid et al., 2022 a), baixo ganho de peso (Soltani et al., 2019; Zhu et al., 2019) e baixa conversão alimentar (Bhanja et al., 2007; Al-Hassani and Alkafaje, 2015; Soltani et al., 2019; Zhu et al., 2020 ).

Apesar de resultados promissores na injeção *in ovo* da vitamina C, os níveis ótimos desta vitamina ainda não estão totalmente estabelecidos, principalmente devido à ampla variação na forma como essa vitamina é utilizada. Além da dose, existe variação no local de inoculação no ovo, na idade embrionária e linhagem das matrizes, dentre outros. Assim, objetivou-se com o presente estudo verificar por meio de metanálise, se a inoculação *in ovo* de vitamina C é capaz de melhorar as características de eclosão e pós-eclosão de frangos de corte e também indicar a metodologia que mais se adequa no uso desta vitamina *in ovo* em frangos de corte.

## Material e métodos

### *Estratégias de pesquisa*

Em Janeiro de 2023, uma busca eletrônica atualizada foi realizada nas seguintes bases de dados: Embase (<https://embase.com>), Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>), Periódicos Capes (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), SciELO (<http://scielo.org/>), Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>), Scopus (<https://www.scopus.com/>) e Web of Science (<http://isiknowledge.com/>). A seguinte combinação de palavras-chave foi utilizada: ("vitamin C" OR "ascorbic acid" OR ascorbate) AND "in ovo " AND broiler. No início, nenhum filtro foi aplicado. No entanto, devido ao grande número de estudos encontrados, uma busca pelos termos restrita apenas no título dos artigos foi realizada apenas no Google Acadêmico. Um total de 784 artigos foram encontrados (Figura 1).

### *Seleção de artigos*

Todos os estudos foram importados para o EndNote<sup>®</sup>-X9 (Clarivate Analytics - Filadélfia, EUA, 2018). Então, duplicatas e estudos não experimentais foram excluídos. Foi definida a questão PICO para comparar ovos de frango fertilizados (População) que foram inoculados com vitamina C (Intervenção) em comparação com uma solução placebo (Controle), sendo o resultado a eclodibilidade, peso à eclosão, ganho de peso e conversão alimentar (Resultado). Assim, com base nas informações contidas no título e no resumo, somente estudos que avaliaram os efeitos da inoculação de vitamina C (somente na forma isolada) em ovos embrionados de frango de corte sobre a eclodibilidade, peso à eclosão, ganho de peso e conversão alimentar foram selecionados. Não houve restrições quanto à data ou idioma de publicação durante a busca. Dessa forma, 24 estudos foram selecionados. As principais características dos artigos selecionados são apresentadas na tabela 1.

### *Cr terios de qualidade*

A qualidade metodol gica dos estudos foi determinada com base em cr terios adaptados de uma revis o sistem tica realizada por Retes et al. (2018), conforme sugerido pelo sistema GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluations*). Foram considerados cr terios para a caracteriza o dos estudos e a qualidade das evid ncias os seguintes:

- 1) Tamanho da amostra: Estudos que utilizaram mais de 100 ovos por tratamento receberam 2 pontos e aqueles que utilizaram menos de 100 ovos ou n o relataram esse n mero receberam 1 ponto;
- 2) Randomiza o: Estudos que demonstraram randomiza o receberam 2 pontos e aqueles que n o demonstraram ou a randomiza o n o estava clara receberam 1 ponto;
- 3) Volume inoculado: Estudos que relataram o volume inoculado receberam 2 pontos, e os que n o relataram receberam 1 ponto;
- 4) Ve culo de dilui o: Estudos que mencionaram o diluente utilizado receberam 2 pontos e os que n o fizeram men o receberam 1 ponto;
- 5) Local de inocula o: Estudos que mencionaram local de inocula o receberam 2 pontos e aqueles que n o fizeram receberam 1 ponto;
- 6) Idade do embri o: Estudos que mencionaram idade do embri o no momento da inocula o receberam 2 pontos e os que n o mencionaram receberam 1 ponto;
- 7) Idade das matrizes: Estudos que relataram a idade das matrizes receberam 2 pontos e quando n o relatada receberam 1 ponto;
- 8) Peso do ovo: Estudos que relataram peso do ovo no in cio da incuba o receberam 2 pontos e os que n o relataram receberam 1 ponto;
- 9) Linhagem das aves: Estudos que descreveram a linhagem receberam 2 pontos e os que n o relataram receberam 1 ponto;

10) Condições de incubação: Estudos que relataram a temperatura e/ou umidade durante a incubação receberam 2 pontos e os que não relataram receberam 1 ponto.

A pontuação máxima foi de 20 pontos e a mínima de 10 pontos (Tabela 2). Estudos com pontuação  $\geq 17$  pontos foram considerados de alta qualidade metodológica, os com pontuação entre 13 e 16, de qualidade metodológica intermediária e os estudos com pontos  $\leq 13$  de baixa qualidade metodológica.

### ***Metanálise***

As informações necessárias para o banco de dados foram obtidas nas seções material e métodos e resultados dos estudos selecionados. As variáveis eclodibilidade, peso à eclosão, ganho de peso e conversão alimentar foram analisadas. A metodologia utilizada para a construção do banco de dados, seguiu o modelo descrito na literatura (Sauvant et al., 2008).

Os grupos comparados foram o grupo controle (ovos inoculados apenas com o veículo) com o grupo inoculado com vitamina C. Para estudos com dois ou mais grupos de tratamentos (por exemplo, diferentes doses de vitamina C), mais de uma comparação foi registrada. Em cada comparação, o tamanho da amostra (n), a média e o desvio padrão (DP) foram utilizados. Nos casos em que os valores de DP não estavam disponíveis, o erro padrão (EP) usando a equação  $DP = EP \times \sqrt{n}$ , onde n = número de repetições, foi usado para a estimativa (Idris et al., 2009).

As informações extraídas dos estudos foram registradas como dados brutos (conforme apresentado nos artigos originais), com exceção para ganho de peso, cujos valores foram padronizados em g/dia. Os dados foram particionados em subgrupos e em subanálises de acordo com as variáveis explicativas a seguir: Idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação, idade do embrião na inoculação, e gênero das aves avaliadas. Duas categorias foram consideradas na avaliação da idade de inoculação (1.

inoculação entre o 6º e o 14º dia de incubação e; 2. inoculação entre o 15º e 18º dia), quatro categorias para avaliar a idade das matrizes (1. ovos de matrizes com idade entre 27 e 40 semanas; 2. entre 41 e 55 semanas; 3. acima de 55 semanas e; 4. idade das matrizes não informada no estudo).

Duas metanálises foram conduzidas, uma para avaliar os diferentes níveis de vitamina C e outra para determinar a melhor metodologia de uso dessa vitamina. Na primeira metanálise, todas as comparações possíveis encontradas nos estudos foram analisadas. Na segunda metanálise, apenas uma comparação de cada estudo foi considerada, sendo selecionada aquela que proporcionou melhor resultado em relação às demais.

Os dados foram analisados no software STATA 17 (STATACORP, 2021). A diferença média padrão (DMP) entre o grupo inoculado com vitamina C e o grupo controle (placebo) foi considerada na análise. O teste Q e a medida de inconsistência ( $I^2$ ) foram utilizados para avaliar a presença e o grau de heterogeneidade, respectivamente. Na existência de heterogeneidade ( $P < 0,05$ ), o modelo de efeito aleatório para o cálculo do DMP foi utilizado, sendo 95% do intervalo de confiança ( $IC_{95\%}$ ) apresentado nos gráficos de Forest Plots. O viés de publicação foi avaliado usando o gráfico de Funnel Plot e o teste de Egger.

## **Resultados**

### *Características dos estudos selecionados*

De maneira geral, a maioria (70,8%) dos estudos (24) incluídos nesta metanálise apresentou alta qualidade metodológica ( $\geq 17$  pontos). Os estudos de Zhang et al. (2018) e Zhang et al. (2019) obtiveram a pontuação máxima (20 pontos) (Tabela 2).

A eclodibilidade foi relatada em 91,7% de estudos (22), o peso à eclosão em 70,8% de estudos (17) e o desempenho pós-eclosão em 50% de estudos (12). O número de ovos foi apresentado em todos os estudos. Em 66,7% (16) o número de ovos por tratamento foi igual ou

superior a 100. Foi relatado o número de ovos por tratamento e o volume inoculado em todos os artigos. O número mínimo de ovos avaliado foi de 10 (Ebrahimi et al., 2012), experimento 2 e o máximo de 400 (Elibol et al., 2001), e o menor volume inoculado foi de 0,05 mL/ovo (Khaligh et al., 2018) e o maior foi de 0,75 mL/ovo (Ebrahimi et al., 2012). Também foram relatados em todos os estudos o veículo de diluição, o local e a idade do embrião na inoculação. Em 45,8% de estudos (11) os ovos foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos e em 54,2% estudos (13) a distribuição não ficou clara. As doses inoculadas de vitamina C variaram entre 6,0 e 75000 $\mu$ g. A dose de 3000 $\mu$ g foi usada em 41,7% de estudos (10), tabela 3. A solução salina foi o principal veículo de inoculação em 62,5% de estudos (15), seguido de água destilada em 20,8% de estudos (5), água deionizada em 8,3% de estudos (2) e água esterilizada e ultra purificada em 4,2% de estudos cada (1). A câmara de ar foi o local de inoculação de 45,8% de estudos (11), seguido de âmnio em 29,2 % de estudos (7), albúmen em 12,5% de estudos (3), saco vitelino em 8,3% de estudos (2) e saco alantóico em 4,2% de estudos (1). A inoculação das soluções ocorreu principalmente no terço final do período de incubação, entre os dias 15 e 18 de incubação contemplando 66,7% de estudos (16). 25% de estudos (6) realizou a inoculação entre os dias 6 e 14 e 8,3% de estudos (2) no primeiro dia de incubação.

A idade das matrizes foi relatada em 54,2% de estudos (13), tendo em sete estudos variado entre 27 e 40 semanas, em quatro estudos a idade variou entre 41 e 55 semanas e nos restantes dois estudos, acima de 55 semanas. Esta informação não foi relatada em 45,8% de estudos (11). O peso do ovo foi relatado em 45,8% dos estudos (11), tendo variado entre 56,9 e 70,0 g, tabela 1. A descrição de linhagem foi feita em 66,7% de estudos (16). A linhagem Ross foi usada em 37,5% de estudos (9), a Cobb em 12,5% de estudos (3) e Arbor Acres em 8,3% de estudos (2) e as linhagens Hubbard e Hybro em 4,2% de estudo (1). Não foi descrita a linhagem em 33,3% de estudos realizados (8). A temperatura de incubação e a umidade relativa durante a incubação foram relatadas em 19 e 15 estudos, respectivamente, e em 5 estudos não

foram relatados. A variação de temperatura e da umidade relativa foi de 37,7 a 37,8 °C e 55% a 88 % respectivamente.

#### *Principais resultados dos ensaios avaliados*

Dos 91,7% de estudos (22) que avaliaram a eclodibilidade, foram realizados 36 comparações entre diferentes doses de vitamina C, das quais em 22 houve melhora, em 8 houve piora e em 6 não houve diferença significativa. Nos 70,8% de estudos (17) que avaliaram o peso à eclosão, foram feitas 33 comparações em 13 houve aumento, em 17 houve redução e em 3 não houve diferença estatística. Quanto ao ganho de peso pós eclosão, de 21 comparações, houve aumento em 17 e redução em 3 e em 1 o resultado foi similar. Das 21 comparações de inoculação de diferentes doses de vitamina C sobre a conversão alimentar, houve melhora nesta variável em 10, em 4 houve piora e em 7 comparações a conversão alimentar foi similar (Tabela 3).

### **Metanálise**

#### *Eclodibilidade*

Dos 24 artigos selecionados, 36 comparações entre a inoculação de vitamina C e o controle foram analisadas. A análise geral indicou significativa heterogeneidade ( $P < 0,05$ ) e que a inoculação de vitamina C aumentou a ( $P < 0,05$ ) a eclodibilidade dos ovos (DMP = 0,44, IC 95% = 0,03 a 0,86) (figura 2).

A análise de subgrupo (metodologia) mostrou (13 comparações) que melhor resposta da vitamina C pode ser observada ( $P < 0,05$ ) quando ovos de matrizes com idade superior a 41 semanas de idade foram utilizadas. As linhagens Arbor Acres (1 comparação), Hubbard (1 comparação) e Ross (9 comparações) apresentaram ( $P < 0,05$ ) melhores resultados. A inoculação *in ovo* de vitamina C na câmara de ar (4 comparações), no saco alantóico (1 comparação), no âmnio (6 comparações) e no saco vitelínico (1 comparação) aumentou ( $P <$

0,05) a eclodibilidade dos ovos. A solução salina (9 comparações) influenciou positivamente ( $P < 0,05$ ) a eclodibilidade dos ovos. A inoculação entre os dias 6 e 18 de incubação melhorou ( $P < 0,05$ ) a eclodibilidade dos ovos (figura 2).

Resultados positivos foram observados ( $P < 0,05$ ) quando 6 e 3000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  de vitamina C foram utilizadas (DMP = 0,64, IC 95% = 0,12 a 1,16; DMP = 0,73, IC 95% = 0,36 a 1,10). Menor eclodibilidade foi observada ( $P < 0,05$ ) quando 75000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  de vitamina C foi utilizada (DMP = -4,19, IC 95% = -5,45 -2,93) (Figura 3).

Não houve evidência de viés de publicação ( $P > 0,05$ ) na eclodibilidade (Figura 9).

#### *Peso na eclosão*

Um total de 33 comparações entre a inoculação de vitamina C e o controle foram analisadas. A análise geral indicou significativa heterogeneidade ( $P < 0,05$ ) e que a inoculação de vitamina C não influenciou ( $P > 0,05$ ) o peso à eclosão (DMP = -0,03, IC 95% = -0,26 a 0,21). A inoculação de 10000, 12000 e 36000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  piorou o peso à eclosão (figura 4).

Foi observada distribuição assimétrica no gráfico de funil e significativa evidência de viés de publicação ( $P < 0,01$ ) no peso à eclosão (Figura 9).

#### *Ganho de peso*

Foram analisadas 21 comparações entre a inoculação com vitamina C e o controle. A análise geral indicou significativa heterogeneidade ( $P < 0,05$ ) e que a inoculação de vitamina C influenciou positivamente ( $P < 0,05$ ) no ganho de peso (DMP = 1,86, IC 95% = 1,00 a 2,71) (figura 5).

A análise da metodologia mostrou (5 comparações) que melhores ganhos de peso podem ser observados ( $P < 0,05$ ) quando ovos de matrizes com idade entre 27 a 40 semanas de idade são utilizadas. As linhagens Arbor Acres (1 comparação), Cobb (2 comparações) e Ross (6

comparações) também apresentaram ( $P < 0,05$ ) melhores resultados. A inoculação de vitamina C na câmara de ar (4 comparações), no âmnio (5 comparações) e no saco vitelínico (1 comparação) apresentaram melhores ganhos de pesos. A solução salina (4 comparações), a água destilada (4 comparações) e a água deionizada apresentaram melhores ( $P < 0,05$ ) resultados. A idade do embrião na inoculação entre os dias 15 e 18 melhorou ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso. O gênero das aves influenciou ( $P < 0,05$ ) no ganho de peso (figura 5).

Maiores ganho de peso foram observados quando 1000, 3000, 10000 e 36000  $\mu\text{g/ovo}$  de vitamina C foram utilizados (Figura 6).

Não houve evidência de viés de publicação ( $P > 0,05$ ) no ganho de peso (Figura 9).

#### *Conversão Alimentar*

Foram analisadas 21 comparações entre a inoculação de vitamina C e o controle. A análise geral indicou significativa heterogeneidade ( $P < 0,05$ ) e que a inoculação de vitamina C melhorou ( $P < 0,05$ ) a conversão alimentar (DMP = -0,07, IC 95% = -0,10 a -0,03) (figura 7).

A análise da metodologia mostrou (5 comparações) que a melhor resposta à vitamina C pode ser observada ( $P < 0,05$ ) quando ovos de matrizes com idade entre 27 a 40 semanas de idade são utilizadas. A linhagem Ross (6 comparações) apresentou melhor resultado. A inoculação *in ovo* de vitamina C na câmara de ar (4 comparações), no âmnio (5 comparações) e no saco vitelínico (1 comparação) melhorou a conversão alimentar. A água destilada (4 comparações) e a água deionizada (2 comparações) apresentaram melhores resultados de conversão de conversão alimentar. A inoculação entre os dias 6 e 18 de incubação (11 comparações) apresentou melhores resultados. O gênero das aves influenciou ( $P < 0,05$ ) a conversão alimentar tendo melhorado a conversão alimentar (figura 7).

Melhores conversões alimentares foram observadas quando 5000 e 10000  $\mu\text{g/ovo}$  de vitamina C foram utilizados (Figura 8).

Não houve evidência de viés de publicação ( $P>0,05$ ) na conversão alimentar (Figura 9).

## **Discussão**

A inoculação *in ovo* de vitamina C mostrou resultados promissores para a eclodibilidade de ovos de frangos de corte (Zakaria and Al-Anezi, 1996; Ghane et al., 2021; Mousstaid et al., 2022 b), peso à eclosão (Hajati et al., 2014; Al-Hassani and Alkafaje, 2015; Ghane et al., 2021), ganho de peso (Khaligh et al., 2018; Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2020 ) e conversão alimentar (Bhanja et al., 2007; Soltani et al., 2019; Zhu et al., 2020 ).

Achados da metanálise mostram que os melhores resultados de eclodibilidade foram obtidos quando 6 e 3000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  de vitamina C diluída em solução salina são inoculados em ovos de matrizes com idade superior a 41 semanas, das linhagens Arbor Acres, Hubbard e Ross, na câmara de ar, no saco alantóico, no âmnio ou no saco vitelino entre os dias 6 e 18 de incubação. Du et al. (2012) afirmam que a vitamina C, como cofator da hidroxilase, pode regular a produção de glicocorticóides pela enzima 21-hidroxilase e  $\beta$ -hidroxilase, promovendo a gliconeogênese e permitindo que o pintinho, devido ao maior teor de glicose, bique a casca do ovo aumentando a eclodibilidade. Nowaczewski et al. (2012) relataram que a administração *in ovo* de vitamina C levou a um aumento na eclodibilidade com 7,5% a mais do que o grupo controle. Além disso, a morte embrionária devido ao acentuado calor metabólico observado no último terço do período de incubação (Tullett, 1990) pode ser reduzida pela ação antioxidante da vitamina C que combate o estresse térmico melhorando assim a eclodibilidade (Zakaria and Al-Anezi, 1996; Elibol et al., 2001; İpek et al., 2004; Ghane et al., 2021).

Portanto, A idade embrionária à inoculação que é benéfica para maximizar o efeito da injeção *in ovo* de vitamina C na eclodibilidade pode ocorrer nas fases intermediária ou final da incubação. O aumento da corticosterona no sangue por efeito do estresse, coincide com a diminuição da síntese de vitamina C, a injeção *in ovo* de vitamina C leva à diminuição da

corticosterona, segundo Zakaria and Al-Anezi (1996) conforme explicado por Satterlee et al. (1994), contribuindo com a redução de mortalidade.

Menor eclodibilidade foi observada com administração de 75000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  de vitamina C. Zakaria and Al-Anezi (1996) observaram dramática redução da eclodibilidade com administração *in ovo* de 12000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  de vitamina C, associada a hemorragias corporais graves nos embriões. A diminuição da eclodibilidade relatada por Zakaria and Al-Anezi (1996), pode estar relacionada ao aumento da concentração de vitamina C que ocasiona uma ação tóxica seletiva nas células  $\beta$  pancreáticas, reduzida viabilidade de fibroblastos (Murakami et al., 1992), morte de células mesenquimais e, portanto, uma diminuição na mineralização (Boskey et al., 1991). Por outro lado Zhang et al., 2018; Mousstaaid et al., 2022 relataram que a administração *in ovo* de vitamina C em doses até 25000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi segura e não resultou em efeitos negativos na eclosão e na qualidade da eclosão. Afirma Zhang et al. (2018) que a razão pela qual os embriões podem tolerar mais de 12000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$  de vitamina C, pode estar associada ao estágio de desenvolvimento avançado do embrião uma vez a administração da vitamina ter sido feita no dia 17 de incubação. Ebrahimi et al. (2012) tiveram eclodibilidade profundamente diminuída quando administraram *in ovo* foi realizada no dia 7 incubação. Segundo os mesmos autores, isso pode ser atribuído ao efeito pró-oxidante em vez de antioxidante, da vitamina C no blastoderme.

A administração de vitamina C não influenciou o peso à eclosão. Piores resultados foram observados com a inoculação de inoculação de 10000, 12000 e 36000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$ . Zakaria and Al-Anezi (1996) observaram um aumento no peso corporal na eclosão e uma diminuição na porcentagem de pintinhos descartados com administração de 3000  $\mu\text{g}/\text{ovo}$ . Bhanja et al. (2007) afirmam que embora não ter achado diferenças estatísticas na proporção do peso do pintinho e no peso do ovo, a proporção foi maior nos pintinhos inoculados com vitamina C em 1,32% do que no controle. Isso pode ser devido ao efeito da vitamina C que é escassa no ovo e

que a sua administração teria auxiliado na síntese de mais colágeno no embrião em desenvolvimento, além de a vitamina C atuar como cofator da hidroxilase regulando a produção de glicocorticoides, promovendo a gliconeogênese e permitindo que o pintinho, devido ao maior teor de glicose, aumente de peso.

A administração de vitamina C influenciou positivamente ganho de peso. Bhanja et al. (2007) relataram que embora não ter observado diferença significativa no peso corporal entre os grupos injetados com o controle aos 14 dias de idade, aparentemente todos os grupos injetados com vitamina C tiveram maior peso corporal. No entanto, aos 28 dias de idade tais diferenças atingiram nível de significância. Resultados similares foram observados por Zhang et al. (2019), segundo os autores a administração *in ovo* de vitamina C teve efeitos positivos duradouros no crescimento das aves. Por outro lado Zhu et al. (2020 ) observaram efeito positivo de administração de vitamina C em todo o período de crescimento até aos 42 dias de idade. Resultados similares foram relatados por Mousstaaid et al. (2022 b) e Zhang et al. (2019) que afirmam ter observado maior ganho de peso em ovos inoculados com vitamina C. Este ganho de peso ocorreu devido a ação da vitamina sobre a síntese dos hormônios tireoidianos, uma vez que aumenta o metabolismo da fenilalanina e da tirosina, que são precursores da biossíntese dos hormônios tireoidianos (THRONTON, 1960 apud AL-HASSANI e ALKAFAJE 2015) os quais são necessário para o crescimento, desenvolvimento e maturação do esqueleto. Além disso, os hormônios tireoidianos apresentam efeitos diretos no crescimento dos tecidos através da liberação de hormônios pela hipófise, do aumento do nível metabólico nos tecidos e órgãos e estimulando a absorção de glicose no interior do trato digestivo (ALHASSANI, 2000 apud AL-HASSANI e ALKAFAJE, 2015). Portanto, a vitamina C tem papel no metabolismo de minerais (ROBERSON E EDWARD, 1994 apud AL-HASSANI e ALKAFAJE, 2015) e afeta positivamente o crescimento e o desenvolvimento, levando a um aumento no peso corporal.

Associa-se ainda ao ganho de peso corporal da ave o efeito da vitamina C como cofatores de enzimas relacionadas a regulação do epigenoma que regula a expressão gênica (Chung et al., 2010; Young, 2015) e participa na expressão muscular e hepática de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-2) (Li et al., 2016). O IGF-2 pode ser um contribuinte para o crescimento do pintinho (deposição de massa corporal) (Lu et al., 2007), e também desempenha papel fundamental no estímulo da proliferação e da diferenciação de células musculares durante a embriogênese. Adicionalmente a vitamina C, como cofator da hidroxilase, pode regular a produção de glicocorticóides promovendo a gliconeogênese favorece o embrião antes da eclosão, promove melhorias no epitélio intestinal e aumenta o número de fibras musculares (Schiaffino et al., 2013).

A administração de vitamina C melhorou a conversão alimentar. Zhang et al. (2019) afirmam que aumento nos níveis de vitamina C injetadas no ovo reduz significativamente a conversão alimentar.

A idade no embrião na inoculação pode influenciar o efeito de administração *in ovo* de vitamina C na conversão alimentar. As mudanças nos níveis plasmáticos de vitamina C nos embriões, com o pico se alcançando aos 12 dias e queda aos 15 dias de incubação, sugerem a importância desta vitamina e o uso da técnica de administração *in ovo* para um desenvolvimento embrionário ótimo na fase final de incubação em frangos de corte.

## **Conclusão**

A administração *in ovo* com vitamina C na dose de 3000 µg/ovo melhora os índices produtivos de frangos de corte independentemente da linhagem. A solução salina deve ser utilizada como diluente sendo o âmnio ou saco vitelino os locais recomendados para o procedimento. A vitamina C deve ser administrada na idade embrionária entre 6 e 18 dias.

## Referências

- Al-Hassani, D., Alkafaje, F., 2015. Effect of early feeding by in ovo injection with ascorbic acid at 17.5 days of incubation and feed applying inside hatching machine on final performance and some hematological traits of Cobb-500 broiler chicken. *J Poultry Sci* 9, 122-133.
- Araujo, I.C.S., Cafe, M.B., Noleto, R.A., Martins, J.M.S., Ulhoa, C.J., Guareshi, G.C., Reis, M.M., Leandro, N.S.M., 2019. Effect of vitamin E in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. *Poultry Science* 98, 3652-3661.
- Bednarczyk, M., Dunislawska, A., Stadnicka, K., Grochowska, E., 2021. Chicken embryo as a model in epigenetic research. *J Poultry Science* 100, 101164.
- Bednarczyk, M., Stadnicka, K., Kozłowska, I., Abiuso, C., Tavaniello, S., Dankowiakowska, A., Sławińska, A., Maiorano, G., 2016. Influence of different prebiotics and mode of their administration on broiler chicken performance. *J Animal* 10, 1271-1279.
- Bender, D.A., 2003. *Nutritional biochemistry of the vitamins*. Cambridge university press.
- Berrocoso, J., Kida, R., Singh, A., Kim, Y., Jha, R., 2017. Effect of in ovo injection of raffinose on growth performance and gut health parameters of broiler chicken. *J Poultry science* 96, 1573-1580.
- Bhanja, S., Mandal, A., Majumdar, S., Mehra, M., 2007. Effect of in ovo injection of vitamins on the chick weight and post-hatch growth performance in broiler chickens. *Indian Journal of Poultry Science* 47, 306-310.
- Boskey, A., Stiner, D., Doty, S., Binderman, I., 1991. Requirement of vitamin C for cartilage calcification in a differentiating chick limb-bud mesenchymal cell culture. *J Bone* 12, 277-282.
- Cardeal, P., Caldas, E., Lara, L., Rocha, J., Baiao, N., Vaz, D., Da Silva Martins, N.J.W.s.P.S.J., 2015. In ovo feeding and its effects on performance of newly-hatched chicks. *71*, 655-662.
- Cheema, M.A., Qureshi, M.A., Havenstein, G.B., 2003. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci* 82, 1519-1529.
- Chung, T.-L., Brena, R.M., Kollé, G., Grimmond, S.M., Berman, B.P., Laird, P.W., Pera, M.F., Wolvetang, E.J., 2010. Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. ***J Stem cells*** 28, 1848-1855.
- de Oliveira, J.E., van der Hoeven-Hangoor, E., van de Linde, I.B., Montijn, R.C., van der Vossen, J.M., 2014. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. *Poult Sci* 93, 818-829.

- Deeming, D.C., Pike, T.W., 2013. Embryonic growth and antioxidant provision in avian eggs. *Biology Letters* 9, 20130757.
- Du, J., Cullen, J.J., Buettner, G.R., 2012. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *J Biochimica et Biophysica Acta -Reviews on Cancer* 1826, 443-457.
- Ebrahimi, M.R., Jafari Ahangari, Y., Zamiri, M.J., Akhlaghi, A., Atashi, H., 2012. Does preincubational in ovo injection of buffers or antioxidants improve the quality and hatchability in long-term stored eggs? *Poultry Science* 91, 2970-2976.
- El-Senousey, H., Chen, B., Wang, J., Atta, A., Mohamed, F., Nie, Q., 2018. In ovo injection of ascorbic acid modulates antioxidant defense system and immune gene expression in newly hatched local Chinese yellow broiler chicks. *J Poultry science* 97, 425-429.
- Elibol, O., Turkoglu, M., Akan, M., Erol, H., 2001. Effects of ascorbic acid injection during incubation on the hatchability of large broiler eggs. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 25, 245-248.
- Foye, O.T., 2005. The biochemical and molecular effects of amniotic nutrient administration, "in ovo feeding" on intestinal development, function and carbohydrate metabolism in the liver and muscle of turkey embryos and poults. North Carolina State University.
- Foye, O.T., Uni, Z., Ferket, P.R., 2006. Effect of in ovo feeding egg white protein, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poult Sci* 85, 1185-1192.
- Ghane, F., Qotbi, A.-A.-A., Slozhenkina, M., Mosolov, A.A., Gorlov, I., Seidavi, A., Colonna, M.A., Laudadio, V., Tufarelli, V., 2021. Effects of in ovo feeding of vitamin E or vitamin C on egg hatchability, performance, carcass traits and immunity in broiler chickens. *Animal biotechnology*, 1-6.
- Goel, A., Bhanja, S.K., Mehra, M., Mandal, A., Pande, V., 2016. In ovo trace element supplementation enhances expression of growth genes in embryo and immune genes in post-hatch broiler chickens. *Journal of the Science of Food Agriculture (Basel)* 96, 2737-2745.
- Hajati, H., Hassanabadi, A., Golian, A., Nassiri-Moghaddam, H., Nassiri, M., 2014. The effect of In Ovo injection of grape seed extract and vitamin C on hatchability, antioxidant activity, yolk sac absorption, performance and ileal micro flora of broiler chickens. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 4.
- Idris, N.R.N., Robertson, C.J.C.i.S.S., Computation®, 2009. The effects of imputing the missing standard deviations on the standard error of meta analysis estimates. 38, 513-526.

- Ipek, A., Sahan, Ü., Yilmaz, B., 2004. The effect of in ovo ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. 68.
- İpek, A., Şahan, Ü., Yılmaz, B., 2004. The effect of in ovo ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. *J Archiv Fur Geflugelkunde*.
- Ismail, F.S.H., Beshara, M.M., El –Gayar, M., 2019. Effect of In-Ovo Injection of Ascorbic, Folic Acids and their Combination on Hatchability and Subsequent Growth Performance of Broiler Chicks %*J Journal of Animal and Poultry Production*. 10, 289-295.
- Jha, R., Fouhse, J.M., Tiwari, U.P., Li, L., Willing, B.P., 2019. Dietary fiber and intestinal health of monogastric animals. *J Frontiers in veterinary science* 6, 48.
- Khaligh, F., Hassanabadi, A., Nassiri-Moghaddam, H., Golian, A., Kalidari, G.A., 2018. Effects of in ovo injection of chrysin, quercetin and ascorbic acid on hatchability, somatic attributes, hepatic oxidative status and early post-hatch performance of broiler chicks. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 102, e413-e420.
- Khan, R., Naz, S., Nikousefat, Z., Selvaggi, M., Laudadio, V., Tufarelli, V., 2012. Effect of ascorbic acid in heat-stressed poultry. *J World's Poultry Science Journal* 68, 477-490.
- Lara, L.J., Rostagno, M.H., 2013. Impact of Heat Stress on Poultry Production. *Animals (Basel)* 3, 356-369.
- Li, S., Zhu, Y., Zhi, L., Han, X., Shen, J., Liu, Y., Yao, J., Yang, X., 2016. DNA methylation variation trends during the embryonic development of chicken. *J PLoS One* 11, e0159230.
- Lilburn, M.S., Loeffler, S., 2015. Early intestinal growth and development in poultry. *J Poultry Science* 94, 1569-1576.
- Lu, J., McMurtry, J., Coon, C., 2007. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. *J Poultry science* 86, 673-683.
- Malheiros, R., Ferket, P., Goncalves, F., 2012. Oxidative stress protection of embryos by “In ovo” supplementation, XXIV World’s Poultry Congress Salvador, Bahia, Brazil, pp. 5-9.
- Mohammed, R.J., Al-Hassani, D.H., 2020. The effect of early feeding by in ovo injection and post hatch in hatchery on some hatching traits, liver glycogen and duodenal villi of broiler chickens. *Biochem. Cell. Arch.* 20, 4003-4007.
- Mousstaaid, A., Fatemi, S.A., Elliott, K.E.C., Alqhtani, A.H., Peebles, E.D., 2022 a. Effects of the In Ovo Injection of L-Ascorbic Acid on Broiler Hatching Performance. *Animals* 12, 1020.
- Mousstaaid, A., Fatemi, S.A., Elliott, K.E.C., Levy, A.W., Miller, W.W., Gerard, P.D., Alqhtani, A.H., Peebles, E.D., 2022 b. Effects of the In Ovo and Dietary Supplementation of L-Ascorbic

- Acid on the Growth Performance, Inflammatory Response, and Eye L-Ascorbic Acid Concentrations in Ross 708 Broiler Chickens †. *Animals* 12.
- Murakami, K., Muto, N., Fukazawa, K., Yamamoto, I., 1992. Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 44, 2191-2197.
- Nowaczewski, S., Kontecka, H., Krystianiak, S., 2012. Effect of in ovo injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia biologica (Kraków)* 60, 93-97.
- Noy, Y., Sklan, D., 1999. Different Types of Early Feeding and Performance In Chicks and Poult. *Journal of Applied Poultry Research* 8, 16-24.
- Özkan, Y., Yilmaz, Ö., Öztürk, A.İ., Erşan, Y., 2005. Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and  $\alpha$ -lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. *J Cell Biology International* 29, 754-760.
- Peebles, E.D., 2018. In ovo applications in poultry: A review. *J Poult Sci* 97, 2322-2338.
- Retes, P.L., Clemente, A.H.S., Neves, D.G., Espósito, M., Makiyama, L., Alvarenga, R.R., Pereira, L.J., Zangeronimo, M.G., 2018. In ovo feeding of carbohydrates for broilers - a systematic review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, 361-369.
- Satterlee, D.G., Jones, R.B., Ryder, F.H., 1994. Effects of ascorbyl-2-polyphosphate on adrenocortical activation and fear-related behavior in broiler chickens. *Poult Sci* 73, 194-201.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.-J., St-Pierre, N., 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition\*. *Animal* 2, 1203-1214.
- Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., B.B., Sandri, M., 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal* 280, 4294-4314.
- Schijns, V.E., van de Zande, S., Lupiani, B., Reddy, S.M., 2014. Practical aspects of poultry vaccination, *Avian immunology*, Elsevier, pp. 345-362.
- Sgavioli, S., Matos, J.B., Borges, L.L., Praes, M., Morita, V.S., Zanirato, G.L., Garcia, R.G., Boleli, I.C., 2015. Effects of Ascorbic Acid Injection in Incubated Eggs Submitted to Heat Stress on Incubation Parameters and Chick Quality. *Brazilian Journal of Poultry Science* 17, 181-189.
- Slawinska, A., Dunislawska, A., Plowiec, A., Radomska, M., Lachmanska, J., Siwek, M., Tavaniello, S., Maiorano, G., 2019. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *J PLoS One* 14, e0212318.

- Soltani, T., Salarmoni, M., Afsharmanesh, M., Tasharrofi, S., 2019. The Effects of In ovo Injection of Ascorbic Acid on Hatchability, Growth Performance, Intestinal Morphology, and Tibia Breaking Strength in 36h Post Hatch Fasted Broiler Chickens. *Poultry Science Journal* 7, 43-49.
- Surai, P.F., Fisinin, V.I., Karadas, F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *J Animal Nutrition* 2, 1-11.
- Tavaniello, S., Slawinska, A., Prioriello, D., Petrecca, V., Bertocchi, M., Zampiga, M., Salvatori, G., Maiorano, G., 2020. Effect of galactooligosaccharides delivered in ovo on meat quality traits of broiler chickens exposed to heat stress. *J Poultry science* 99, 612-619.
- Tullett, S.G., 1990. Science and the art of incubation. *J Poultry Science* 69, 1-15.
- Uni, Z., Ferket, P., Tako, E., Kedar, O.J.P.S., 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. 84, 764-770.
- Uni, Z., Ferket, R.P., 2004. Methods for early nutrition and their potential. *World's Poultry Science Journal* 60, 101-111.
- Whitehead, C.C., Keller, T., 2003. An update on ascorbic acid in poultry. *World's Poultry Science Journal* 59, 161-184.
- Yenilmez, F., 2022. Effect of In Ovo Vitamin C Injection against Mobile Phone Radiation on Post-Hatch Performance of Broiler Chicks. *Veterinary Sciences* 9.
- Yigit, A., Panda, A., Cherian, G., 2014. The avian embryo and its antioxidant defence system. *World's poultry science journal* 70, 563-574.
- Young, J.I.Z., S.; Wang, G, 2015. Regulation of the Epigenome by Vitamin C, *Annual Review of Nutrition*, pp. 545-564.
- Zakaria, A., Al-Anezi, M., 1996. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality, and the body weights of broiler chickens. *J Poultry Science* 75, 1204-1209.
- Zhang, H., Elliott, K.E.C., Durojaye, O.A., Fatemi, S.A., Peebles, E.D., 2018. Effects of in ovo administration of L-ascorbic acid on broiler hatchability and its influence on the effects of pre-placement holding time on broiler quality characteristics. *Poultry Science* 97, 1941-1947.
- Zhang, H., Elliott, K.E.C., Durojaye, O.A., Fatemi, S.A., Schilling, M.W., Peebles, E.D., 2019. Effects of in ovo injection of L-ascorbic acid on growth performance, carcass composition, plasma antioxidant capacity, and meat quality in broiler chickens<sup>1,2,3</sup>. *Poultry Science* 98, 3617-3625.

- Zhu, Y., Li, S., Duan, Y., Ren, Z., Yang, X., Yang, X., 2020 Effects of in ovo feeding of vitamin C on post-hatch performance, immune status and DNA methylation-related genes expression in broiler chickens. *The British journal of nutrition*, 1-27.
- Zhu, Y.F., Li, S.Z., Sun, Q.Z., Yang, X.J., 2019. Effect of in ovo feeding of vitamin C on antioxidation and immune function of broiler chickens. *Animal : an international journal of animal bioscience* 13, 1927-1933.
- Zhu, Y.F., Zhao, J.F., Wang, C.X., Zhang, F., Huang, X.H., Ren, Z.Z., Yang, X., Liu, Y.L., Yang, X.J., 2021. Exploring the effectiveness of in ovo feeding of vitamin C based on the embryonic vitamin C synthesis and absorption in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12.

**Tabela 1** Características dos estudos selecionados

Reference	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Al-Hassani and Alkafaje (2015)	Pe-35 days	50	0.5	D	AC	17,5	29	NR	C	37,8	85-88
Bhanja et al. (2007)	Pe-28 days, H and HW	50	0.5	SW	AC	14	NR	NR	NR	NR	NR
Ebrahimi et al. (2012) Exp. 2	H	10	0.75	D	A	1	35	65.0 ±2.0	C	37,8	60
Elibol et al.(2001)	H	400	0.1	SS	A	13	64	≥70.0	Hybro	NR	NR
Ghane et al. (2021)	Pe-42 days, H and HW	84	0.2	DW	AC	15	27	NR	R	37	70-75
Hajati et al. (2014)	Pe-10 days and H	70	0.5	SS	AC	18	NR	NR	NR	NR	NR
İpek et al. (2004) Exp.1	H and HW	324	0.5	SS	AC	13	70	68.0-78.0	R	37,8	60
Ismail et al. (2019)	Pe-28 days, H and HW	180	0.1	SS	AC	14	53	68.98	H	37,5	65
Khaligh et al. (2018)	Pe-11 days, Hand HW	80	0.05	D	AF	18	27	56.90 ± 1.68	NR	37,6	65
Mohammed and Al-Hassani (2020)	H and HW	150	0.5	D	AS	18	NR	NR	R	NR	NR
Mousstaaid et al. a (2022)	H and HW	240	0.1	SS	AF	18	41	NR	R	37,5	NR
Mousstaaid et al. b (2022)	Pe-14days; H and HW	360	0.1	SS	AF	17	NR	NR	R	37,5	NR
Sgavioli et al. (2015)	H and HW	50	0.1	M-Q W	A	1	47	67.0 ± 2.0	C	37,5	60
Soltani et al. (2019)	Pe-10days; H and HW	72	0.7	D	AF	15	49	57.0±2.0	R	37,5	60
Yenilmez (2022)	Pe-35days; H and HW	250	0.6	DW	AF	17	40	NR	R	37,5	55-60
Zakaria and Al-Anezi (1996) <b>Exp. 1.</b>	H and HW	385	0.1	SS	AC	15	NR	NR	NR	37,6	55
Zakaria and Al-Anezi (1996) <b>Exp. 2.</b>	H and HW	165	0.1	SS	AC	15	NR	NR	NR	37,6	55
Zakaria and Al-Anezi (1996) <b>Exp. 3.</b>	H and HW	165	0.1	SS	AC	17	NR	NR	NR	37,6	55
Zakaria and Al-Anezi (1996) <b>Exp. 4.</b>	H and HW	110	0.1	SS	AC	11	NR	NR	NR	37,6	55
Zakaria and Al-Anezi (1996) <b>Exp. 5.</b>	H and HW	110	0.1	SS	AC	19	NR	NR	NR	37,6	55
Zhang et al. (2018)	H and HW	117	0.1	SS	AF	17	35	60.08	R	37,5	NR
Zhang et al. (2019)	Pe-45days	370	0.1	SS	AF	17	40	63.10	R	37,5	NR
Zhu et al. (2019)	Pe-42 days and H	120	0.1	SS	YS	15	NR	63.0± 2,5	AA	37,6	61,25
Zhu et al. b(2020)	Pe- 42 days and H	120	0.1	SS	YS	11	NR	63.0	AA	NR	NR

**1)** Variáveis (Pe –desempenho,H- eclodibilidade; HW- peso à eclosão; **2)** Total de ovos por tratamento; **3)** Volume inoculado por ovo (mL); **4)** Veículo (SS-solução salina; SW-água estéril; D-água destilada; DW-água desionizada; MQ W- água Milli -Q), ); **5)** Local de inoculação (A, albúmen; AC, câmara de ar; AF, líquido amniótico; AS, saco alantóide

; YS, saco vitelino; ); **6**) Idade de inoculação (dias); **7**) Idade da matriz (semanas); **8**) Peso do ovo (grama); **9**) Linhagem (AA, Arbor Acres; C, Cobb; H, Hubbard; R, Ross; Hybro); **10**) Temperatura de incubação ( ° C ); **11**) Umidade durante a incubação (%).NR, Não Reportado.

**Tabela 2.** Pontuação dos artigos com base nos critérios de avaliação da qualidade da evidência

<b>Referências</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Total</b>
Al- Hassani e Alkafaje (2015)	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	18
Bhanja et ai. (2007)	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	15
Ebrahimi et ai. (2012) Exp. 2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Elibol et al. (2001)	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	18
Gane et ai. (2021)	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	17
Hajati H et ai. (2014)	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	16
İpek et al. (2004) Exp.1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	19
Ismail et ai. (2019)	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	19
Khalig et ai. (2018)	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	18
Mohammed e Al- Hassani (2020)	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	17
Mousstaaid et ai. a (2022)	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	19
Mousstaaid et ai. a (2022)	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	19
Sgavioli et ai. (2015)	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Soltani et ai. (2019)	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	19
Yenilmez (2022)	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	19
Zakaria e Al- Anezi (1996) <b>Exp. 1</b>	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	16
Zakaria e Al- Anezi (1996) <b>Exp. 2.</b>	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	16
Zakaria e Al- Anezi (1996) <b>Exp. 3</b>	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	16
Zakaria e Al- Anezi (1996) <b>Exp. 4.</b>	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	16
Zakaria e Al- Anezi (1996) <b>Exp. 5.</b>	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	16
Zhang et ai. (2018)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
Zhang et ai. (2019)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
Zhu et ai. (2019)	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	18
Zhu et ai. (2020)	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	17

1. Tamanho da amostra: mais de 100 ovos por tratamento (2) e menos de 100 ovos (1)

2. Randomização: estudos que demonstraram randomização (2) ou não (1)

3. Volume inoculado: volume relatado (2) ou não relatado (1)

4. Veículo de diluição: veículo de diluição informado (2) ou não informado (1)

5. Local de inoculação: local de inoculação relatado (2) ou não relatado (1)

6. Idade do embrião: idade do embrião no momento da alimentação informada (2) ou não informada (1)

7. Idade da galinha: idade da galinha informada (2) ou não informada (1)

8. Peso do ovo: peso do ovo no início da incubação informado (2) ou não informado (1)
9. Linhagem: linhagem descrita (2) ou não descrita (1)
10. Condições de incubação: temperatura e/ou umidade durante a incubação relatada (2) ou não relatada (1)

**Tabela 3.** Principais resultados dos estudos avaliados.

Referência	Doses de Vitamina C (µg/ovo)	Eclodibilidade	Peso à eclosão	Ganho de peso	Conversão Alimentar
Al-Hassani and Alkafaje (2015)	1,000	NE	NE	+	-
Al-Hassani and Alkafaje (2015)	3,000	NE	NE	+	-
Al-Hassani and Alkafaje (2015)	5,000	NE	NE	+	-
Bhanja et al. (2007)	50,000	-	-	+	-
Ebrahimi et al. (2012) Exp. 2	25,000	-	NE	NE	NE
Ebrahimi et al. (2012) Exp. 2	50,000	-	NE	NE	NE
Ebrahimi et al. (2012) Exp. 2	75,000	-	NE	NE	NE
Elibol et al. (2001 )	3,000	+	NE	NE	NE
Ghane et al. (2021)	1,000	+	+	+	+
Ghane et al. (2021)	3,000	+	NS	+	-
Ghane et al. (2021)	6,000	+	-	+	-
Hajati et al. (2014)	3,000	+	+	+	NS
Ipek et al. (2004) Exp. 1	1,000	NS	+	NE	NE
Ipek et al. (2004) Exp. 1	3,000	+	-	NE	NE
Ipek et al. (2004) Exp. 1	5,000	+	-	NE	NE
Ipek et al. (2004) Exp. 1	7,000	NS	+	NE	NE
Ismail et al. (2019)	6	+	+	+	-
Khaligh et al. (2018)	6,000	-	+	+	-
Mohammed and Al-Hassani. (2020)	3,000	+	+	NE	NE
Mousstaid et al. (a)(2022)	12,000	+	-	NE	NE
Mousstaid et al. (a) (2022)	25,000	NS	+	NE	NE
Mousstaid et al. (b) (2022)	12,000	+	-	-	+
Mousstaid et al. (b) (2022)	25,000	+	NS	NS	NS
Sgavioli et al. (2015)	200	-	NE	NE	NE
Sgavioli et al. (2015)	400	-	NE	NE	NE
Sgavioli et al. (2015)	600	NS	NE	NE	NE
Soltani et al. (2019)	3,000	NS	+	-	+
Soltani et al. (2019)	6,000	+	+	+	NS
Yenilmez (2022)	99,90	NE	-	+	-
Zakaria and Al-Anezi (1996)	500	NS	-	NE	NE
Zakaria and Al-Anezi (1996)	1,000	+	+	NE	NE
Zakaria and Al-Anezi (1996)	3,000	+	-	NE	NE
Zakaria and Al-Anezi (1996)	12,000	-	-	NE	NE
Zhang et al. (2018)	500	+	+	NE	NE
Zhan get al. (2018)	1,500	+	NS	NE	NE
Zhang et al. (2018)	4,500	+	-	NE	NE
Zhang et al. (2018)	13,500	+	-	NE	NE
Zhang et al. (2019)	3,000	NE	-	+	NS
Zhang et al. (2019)	6,000	NE	+	+	NS

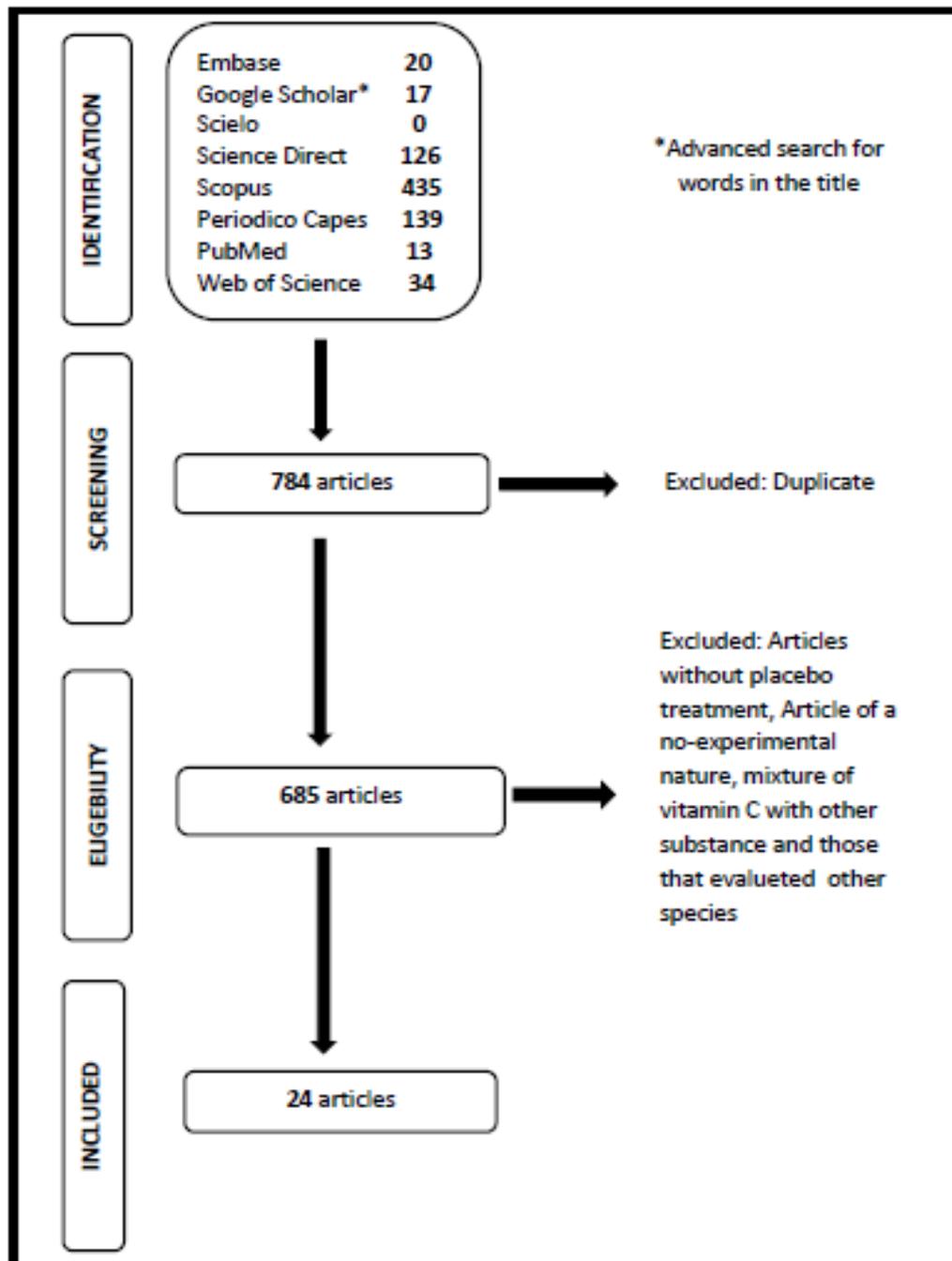
Zhang et al. (2019)	12,000	NE	-	+	NS
Zhang et al. (2019)	36,000	NE	-	+	NS
Zhu et al. (2019)	3,000	+	-	-	+
Zhu et al. (a) (2020)	30,000	+	NE	NE	NE
Zhu et al. (b) (2020)	3,000	+	-	+	-

NS: não significativo; NE: não avaliado; (-): reduzido; (+): aumentado.

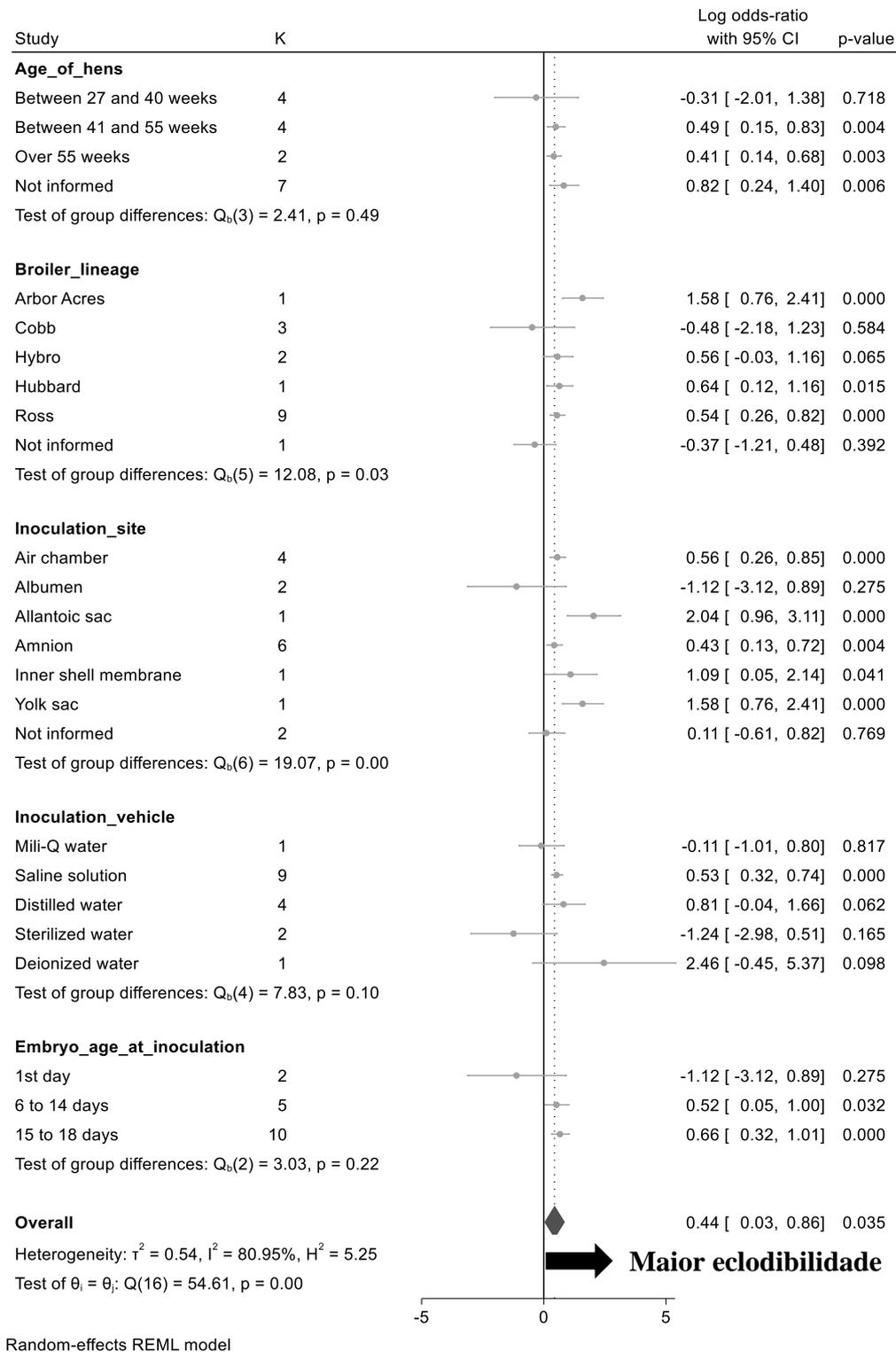
**Tabela 4.** Resultados da metanálise

Vitamina C - Doses ( $\mu\text{g}$ )	Eclodibilidade	Peso à eclosão	Ganho de Peso	Conversão alimentar
6	+	NS	NS	NS
1000	NS	+	+	NS
3000	+	NS	+	NS
5000	NS		+	+
6000	NS	+	+	NS
10000	NE	-	+	+
<b>Idades das martizes (Semana)</b>				
27 a 40	NS	NA	+	+
41 a 55	+	NA	NS	NS
Acima de 55	+	NA	NS	NE
Idade não informada	+	NA	NS	NS
<b>Linhagem das Matrizes</b>				
Arbor Acres	+	NA	+	NS
Cobb	NS	NA	+	NS
Hybro	NS	NA	NS	NE
Hubbard	+	NA	NS	NS
Ross	+	NA	+	+
Linhagem não informada	NS	NA	NS	NS
<b>Local de inoculação</b>				
Câmara de ar	+	NA	+	+
Albumen	NS	NA	NE	NE
Saco alantóico	+	NA	NE	NE
âmnio	+	NA	+	+
Saco vitelínico	+	NA	+	+
<b>Veículo de inoculação</b>				
Mili-Q-water	NS	NA	NE	NE
Solução salina	+	NA	+	NS
Água destilada	NS	NA	+	+
Água esterilizada	NS	NA	NS	NS
Água deionizada	NS	NA	+	+
<b>Idade do embrião na inoculação (Dias)</b>				
1	NS	NA	NE	NE
6 a 14	+	NA	NS	+
15 a 18	+	NA	+	+
<b>Gênero das aves</b>				
Macho	NA	NA	NS	+
Macho/Fêmea	NA	NA	+	+

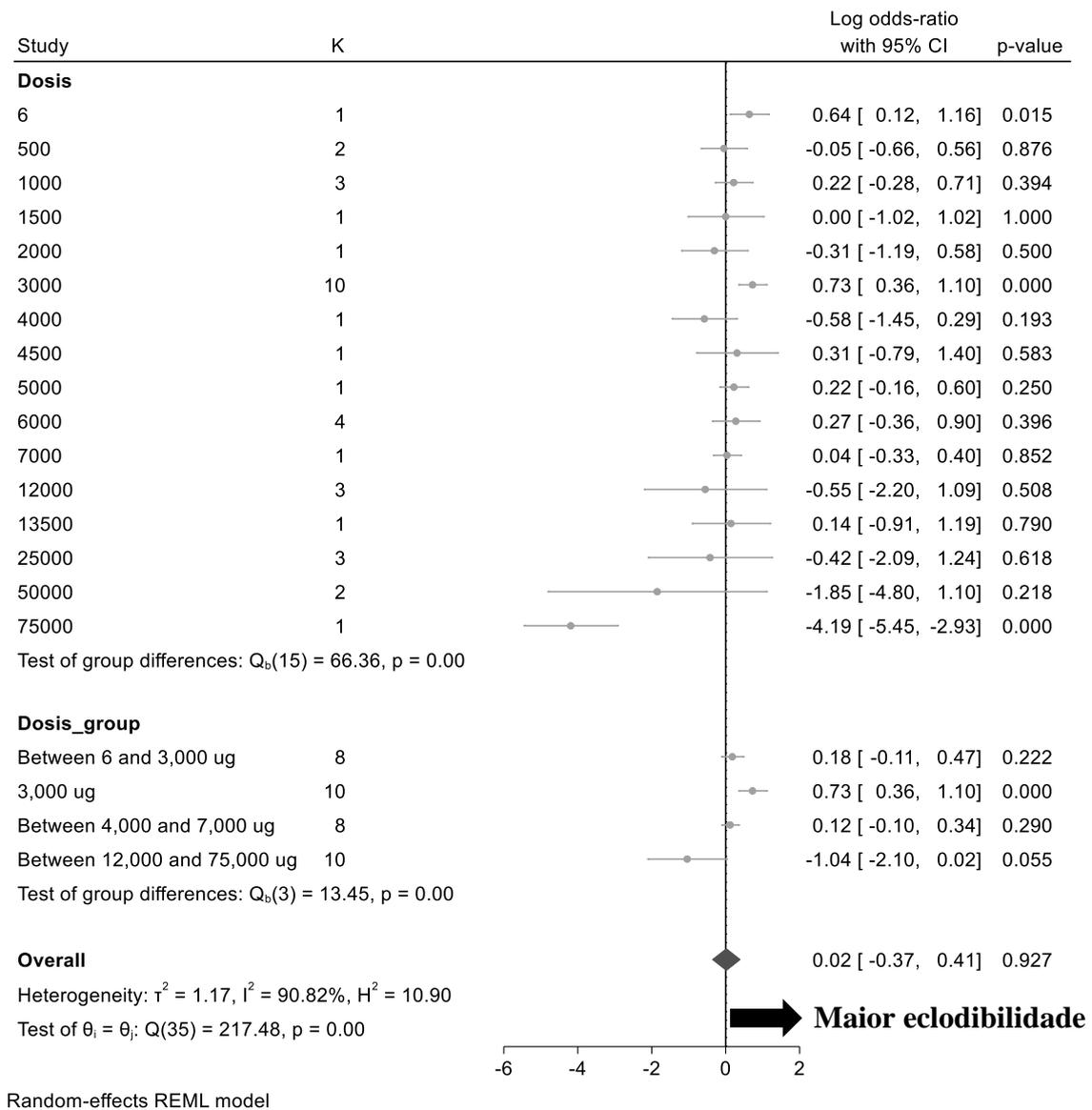
NS: não significativo; NE: não avaliado; NA: não aplicável; (-): reduzido; (+): aumentado



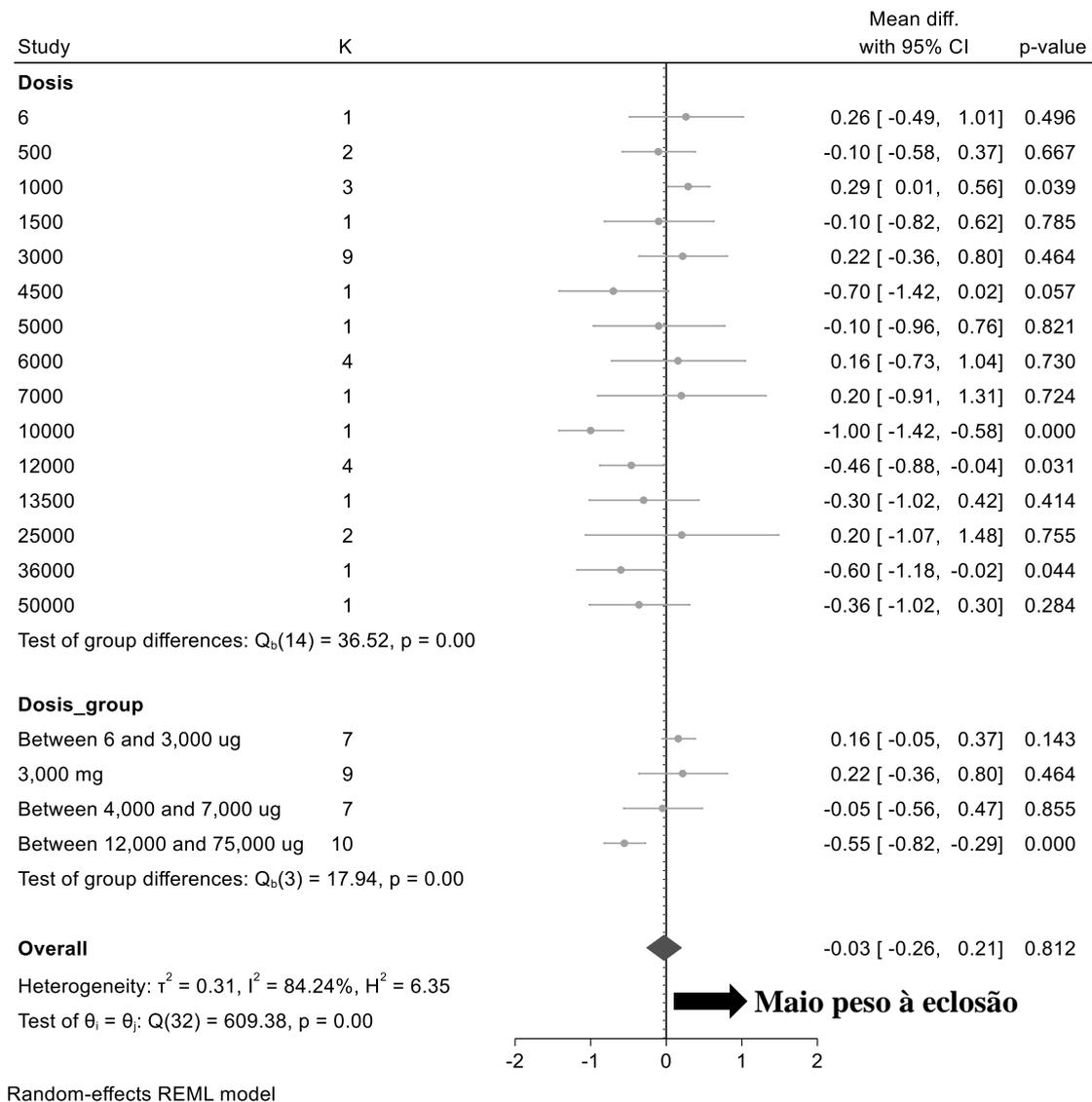
**Figura 1.** Fluxograma do processo de busca e seleção de artigos com base na seguinte combinação de palavras-chave: (“vitamin C” OR “ascorbic acid” OR ascorbate) AND “in ovo” AND broiler.



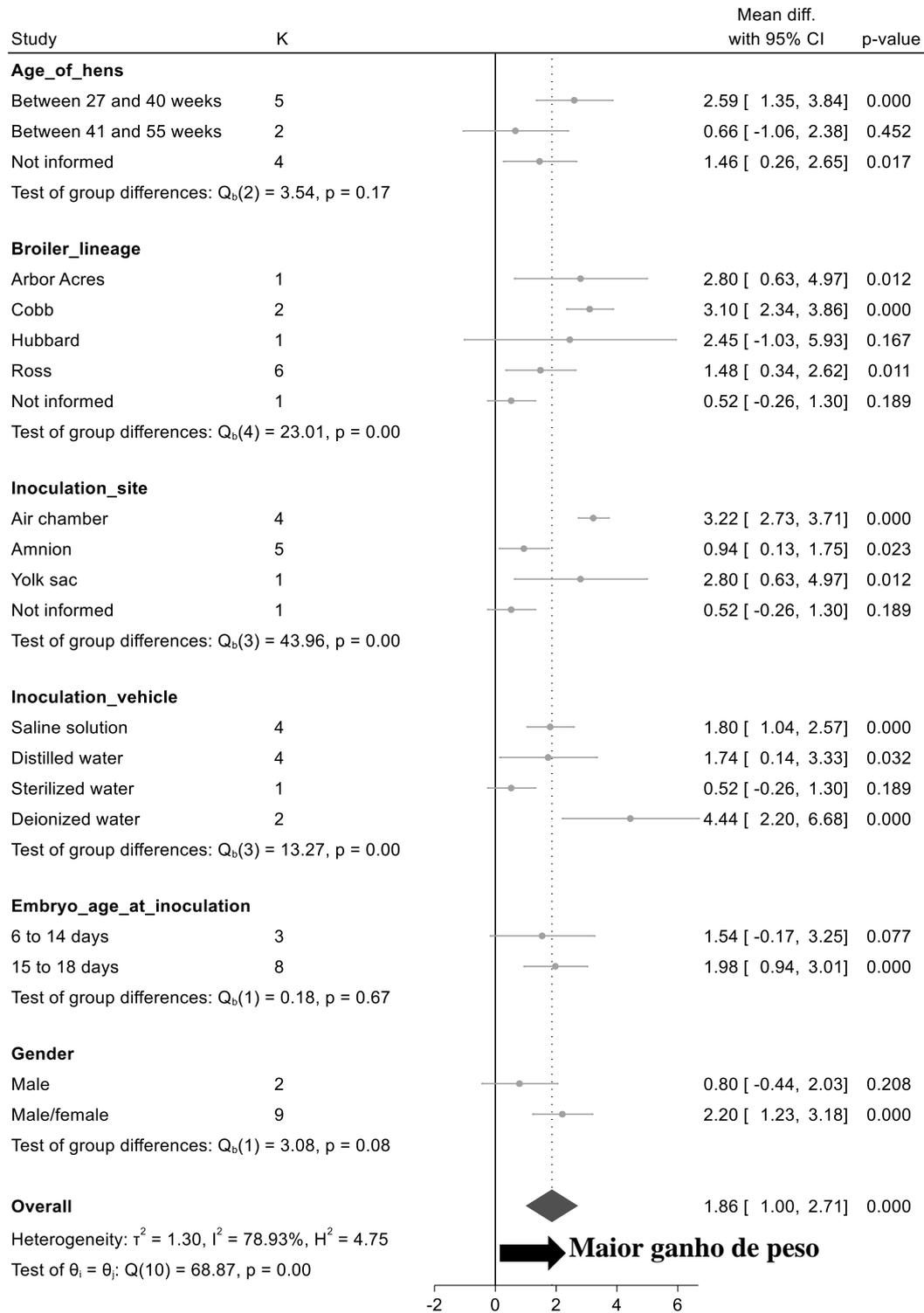
**Figura 2.** Resumo da variação na eclodibilidade (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando os seguintes subgrupos: idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação e idade do embrião na inoculação.



**Figura 3.** Resumo da variação ( $\Delta$ ) da eclodibilidade (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.

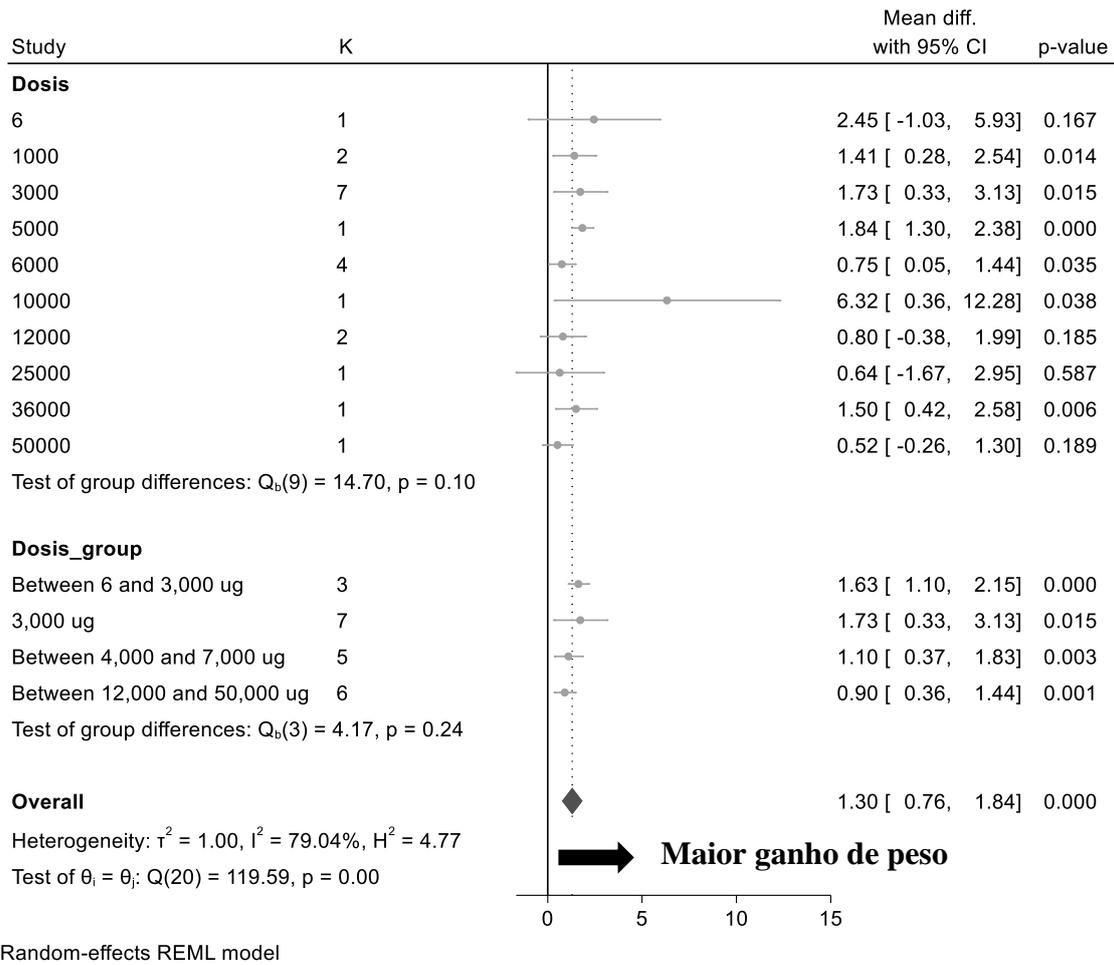


**Figura 4.** Resumo da variação do peso à eclosão (%) de frangos de corte de ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.

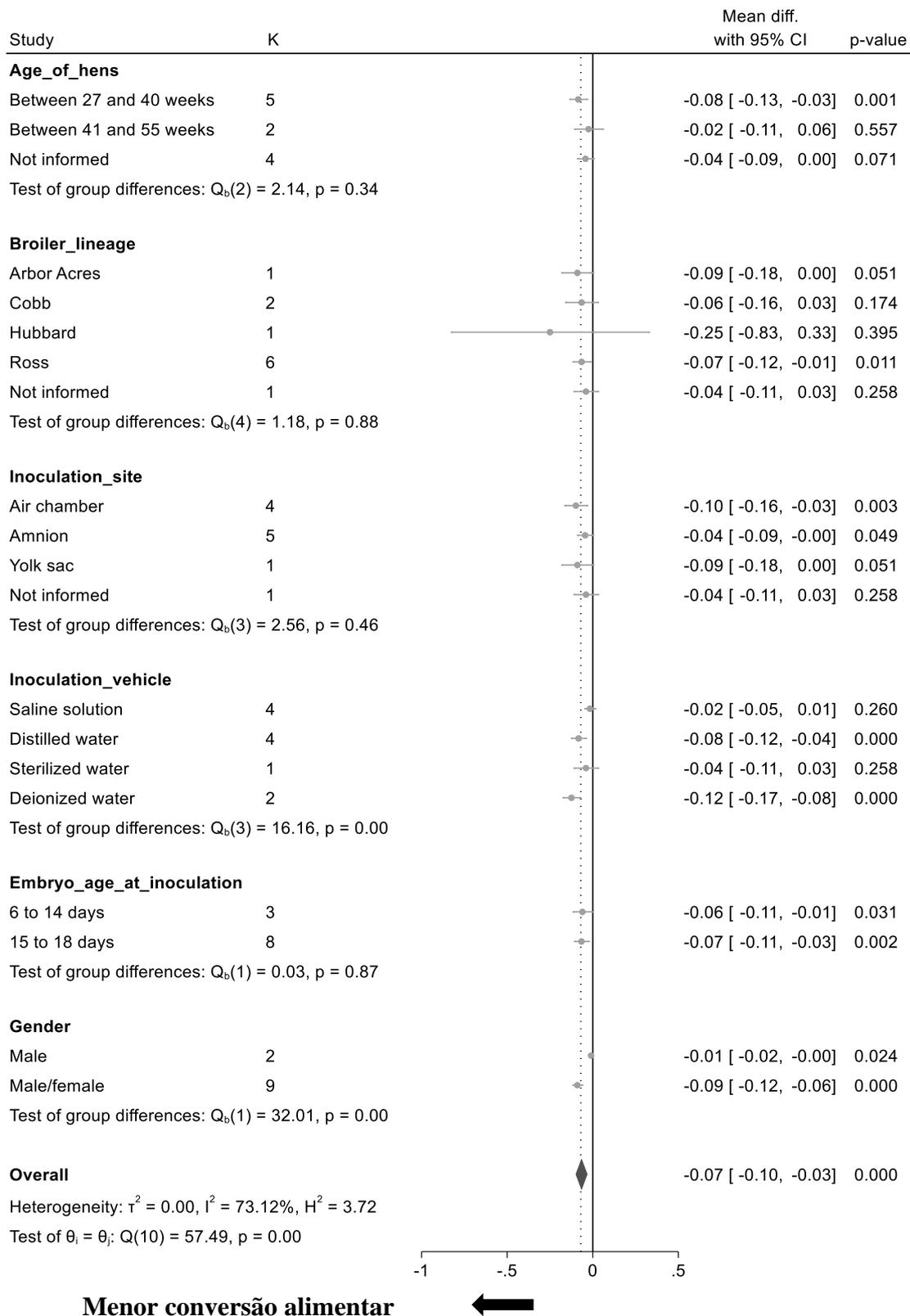


Random-effects REML model

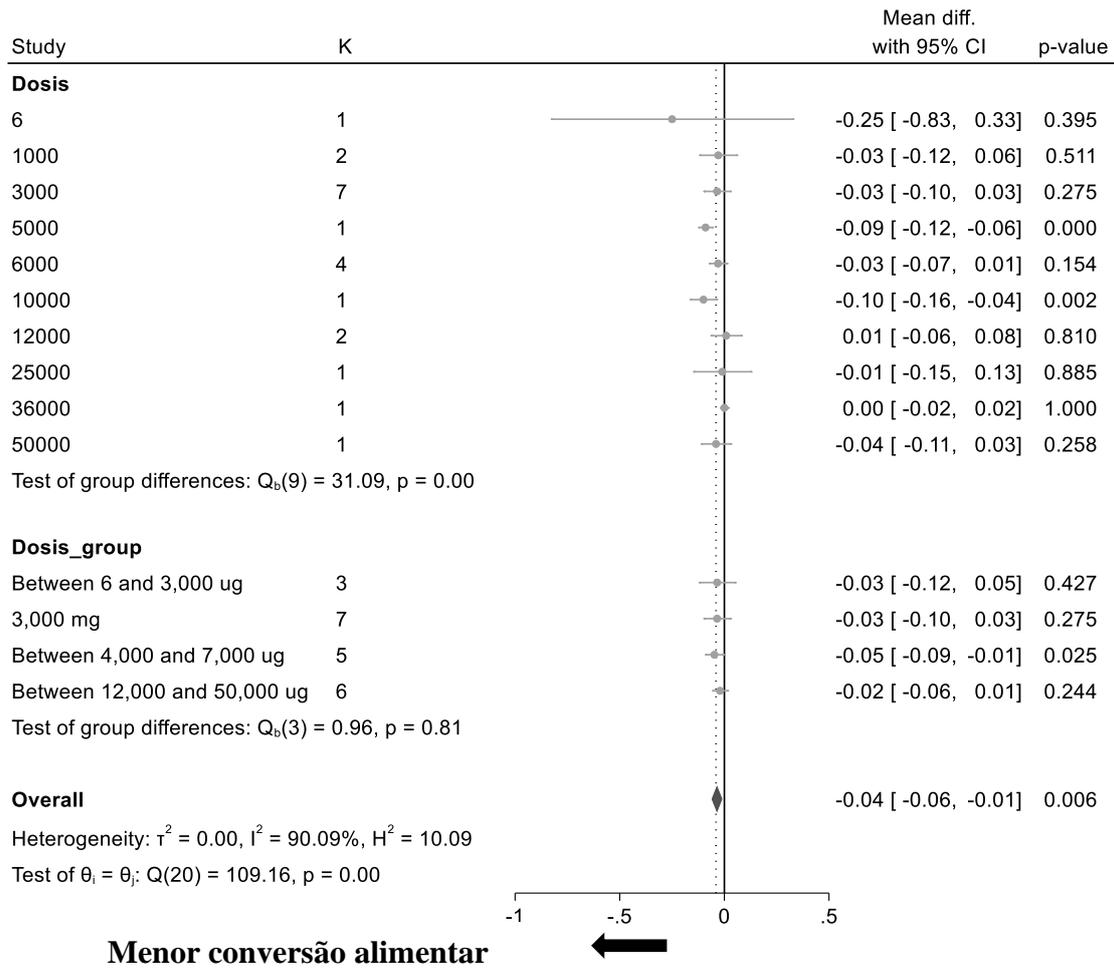
**Figura 5.** Resumo da variação do ganho de peso (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando os seguintes subgrupos: idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação, idade do embrião na inoculação e gênero das aves.



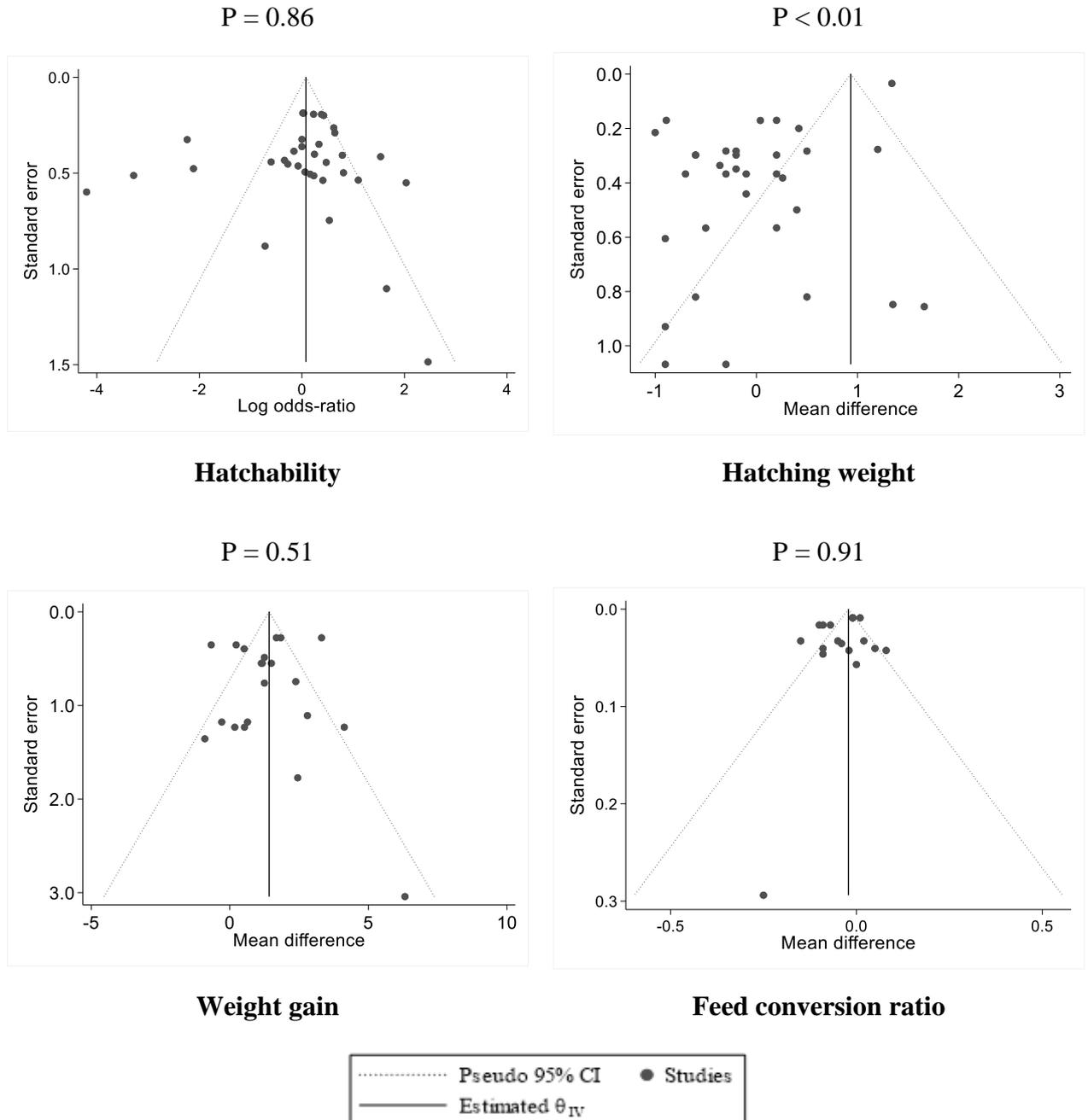
**Figura 6.** Resumo da variação do ganho de peso (%) de frangos de corte de ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.



**Figura 7.** Resumo da variação da conversão alimentar (%) dos ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando os seguintes subgrupos: idade das matrizes, linhagem das matrizes, local de inoculação do ovo, veículo de inoculação, idade do embrião na inoculação e gênero das aves.



**Figura 8.** Resumo da variação da conversão alimentar (%) de frangos de corte de ovos inoculados com vitamina C em relação ao respectivo tratamento controle, considerando as doses inoculadas.



**Figura 9.** Gráfico de funil da metanálise de estudos de inoculação de Vitamina C vs. Controle com intervalo de confiança de 95% obtido com o modelo de efeito aleatório para eclodibilidade, peso a eclosão, ganho de peso e conversão alimentar. Os valores de P foram obtidos pelo teste de Egger.