

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITOS DE PROBIÓTICO *IN OVO* SOBRE O RENDIMENTO DE
INCUBAÇÃO E AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE
PINTOS DE CORTE**

LARISSA KIANA SANTOS AZEVEDO MARTINS

**SALVADOR - BAHIA
MAIO - 2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ZOOTECNIA

**EFEITOS DE PROBIÓTICO *IN OVO* SOBRE O RENDIMENTO DE
INCUBAÇÃO E AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS
DE PINTOS DE CORTE**

LARISSA KIANA SANTOS AZEVEDO MARTINS

Zootecnista

SALVADOR - BA
MAIO - 2022

LARISSA KIANA SANTOS AZEVEDO MARTINS

**EFEITOS DE PROBIÓTICO *IN OVO* SOBRE O
RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO E AS CARACTERÍSTICAS
MORFOFISIOLÓGICAS DE PINTOS DE CORTE**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Dra. Vanessa Michalsky Barbosa

Coorientadora: Dra. Viviane de Souza Morita

SALVADOR - BA

MAIO - 2022

Martins, Larissa Kiana Santos Azevedo.

Efeitos de probióticos in ovo sobre o rendimento de incubação e as características morfofisiológicas de pintos de corte / Larissa Kiana Santos Azevedo Martins. - 2022.
119 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa.

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane de Souza Morita.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2022.

1. Zootecnia. 2. Produção animal. 3. Frango de corte - Nutrição. 4. Eclodibilidade. 5. Ovos - Incubação. 6. Probióticos. I. Barbosa, Vanessa Michalsky. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.5130855
CDU - 636.5

EFEITOS DE PROBIÓTICO IN OVO SOBRE O RENDIMENTO DE INCUBAÇÃO E AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE PINTOS DE CORTE

Larissa Kiana Santos Azevedo Martins

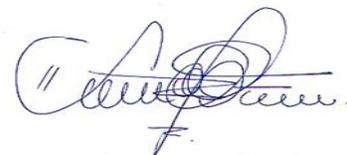
Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia

Salvador, 27 de maio de 2022

Comissão examinadora:



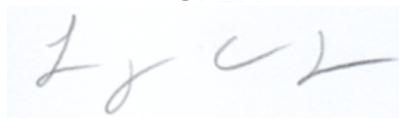
Dra. Vanessa Michalsky Barbosa
UFBA
Orientadora / Presidente



Dra. Juliana Cantos Faveri
UFBA



Dra. Lia Muniz Barretto Fernandes
UFBA



Dr. Leonardo José Camargos Lara
UFMG



Dra. Mariana André Pompeu
PUC-BETIM

Dedico este trabalho à minha querida avó Maria da Glória
(*in memoriam*) e a minha mãe, por todo o incentivo desde criança
a estudar e ser independente.

Estaremos sempre juntas!

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me fortalecer nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Jussara Azevedo e José Carlos, e meu irmão Anderson Azevedo, vocês sempre serão a razão da minha vida. Muito obrigada por todos os momentos que construímos juntos, sei que não foi fácil suportar essa distância todos os dias. Obrigada minha mãe por esse amor incondicional.

Ao meu fiel companheiro de longas datas, Nilton Vasques, o que seria de mim sem você?! Obrigada por ser meu amigo e compartilhar sua vida comigo diariamente. Por aceitar-me do jeito que eu sou, e me mostrar todos os dias que a vida é perfeita e não temos do que reclamar. Você é o cara mais incrível que eu conheço na vida.

A toda minha família que sempre torceram e me incentivaram em meus propósitos profissionais.

À minha orientadora Prof^a Vanessa Michalsky, eu não tenho palavras para agradecer por tudo que você já fez e continua fazendo por mim. Você puxou a minha mão, quando eu não sabia para onde ir. Me direcionou, incentivou, apoiou, confiou em mim. Muito obrigada pelo carinho, respeito e a relação que construímos ao longo desses anos. Você sempre fará parte da minha história e continuará fazendo parte da minha vida!

Ao meu grupo de pesquisa NUPIA, sem vocês nada disso estaria acontecendo. Até porque não se faz um doutorado sozinha. Este trabalho também é de Izabela Azevedo, Nayana Mercês, Taís Borges, Tayana França e Vanessa Michalsky. Quero agradecer eternamente por todos os momentos que nós vivemos juntas. Pelas experiências profissionais e pessoais trocadas ao longo desses 10 anos! Eu serei eternamente grata a cada uma de vocês, pela força em diversos momentos e ajuda para conduzir esse experimento em um incubatório comercial, sem vocês nada disso estaria sendo realizado. Estendo meus agradecimentos a todos os alunos da graduação/Pibics que participaram de alguma forma na realização deste experimento.

Aos professores da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA por me ajudarem nos momentos de dificuldade e também ao prof. Fúlvio Viegas da IFBA.

A professora Alexandra Estrela pelos ensinamentos e aprendizados para condução das análises de histomorfometria e aos pós-doutorandos do Laboratório de Patologia clínica do hospital de Medicina Veterinária da UFBA, em especial ao Vitor de Moraes, pela ajuda e orientação.

Ao professor Raphael Bermal pela paciência e enriquecedora colaboração nas análises estatísticas.

À patrocinadora deste trabalho, empresa BIOCAMP por financiar todo o experimento e me dar a oportunidade de realização do mesmo. Obrigada por apoiar a pesquisa brasileira.

À empresa Asa Branca, pela disponibilidade da condução e realização do experimento dentro do incubatório e pela oportunidade de conhecer diversos setores da Avicultura. E em especial ao Nezas e Danilo por toda paciência e gentileza, durante a condução experimental no incubatório.

Agradeço a todos os funcionários da Granja Asa Branca, por me recepcionar com muito carinho e preocupação. Obrigada a todos vocês pela ajuda e colaboração.

Aos membros da comissão examinadora, prof^a Juliana Faveri, prof^a Lia Fernandes, prof. Leonardo Lara e prof^a. Mariana Pompeu pela enriquecedora colaboração neste trabalho.

Às minhas amigas do coração, Camila Pimentel, Deicy Magalhães, Priscila Costa, Larissa Souza, Carine Lima, Taiana Cortez, Tatiana Cortez, Priscila Maia, Jamile Alves, por me dar oportunidade de compartilhar suas histórias de vida comigo. Cada uma de vocês estão guardadas em meus pensamentos e coração.

Aos meus amigos Robson Purificação, Vinicius Lins, Rodrigo Meira. Obrigada pelos momentos de muitas risadas.

A minha amiga Inês Michalsky, muito obrigada pelo apoio e carinho de sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (CAPES), pela concessão do Auxílio Financeiro e bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma cruzaram meu caminho e deixaram uma palavra de conforto, incentivo, conselho, ajuda, motivação. Muito obrigada!

Gratidão

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1.	Distribuição dos ovos incubáveis de acordo com os tratamentos.....	34
Figura 2.	Peso do ovo e seus componentes.....	35
Figura 3.	Medição da espessura da casca.....	36
Figura 4.	Teste de injeção da vacinadora <i>in ovo</i>	38
Figura 5.	Preparação da bolsa com probiótico.....	39
Figura 6.	Bolsa térmica contendo gelo para preservação da qualidade das substâncias.....	39
Figura 7.	Processo de inoculação <i>in ovo</i>	40
Figura 8.	Distribuição das bandejas dentro do nascedouro.....	41
Figura 9.	Análise do comprimento de pintinho.....	44
Figura 10.	Aparelho e cartuchos utilizados nas análises dos parâmetros fisiológicos...	45
Figura 11.	Órgãos separados para pesagem individual.....	47
Figura 12.	Osmômetro microprocessado PZL-1000®	50
Figura 13.	Histomorfologia intestinal de pintos de um dia.....	75
Gráfico 1.	Janela de nascimento dos pintos submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Resumo das espécies probióticas benéficas utilizadas na produção avícola.....	13
Tabela 1.	Características estruturais dos ovos incubados no experimento de acordo com os tratamentos.....	51
Tabela 2.	Parâmetros de rendimento de incubação de ovos não inoculados, vacinados <i>in ovo</i> , vacinados e suplementados com probiótico <i>in ovo</i>	52
Tabela 3.	Parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	56
Tabela 4.	Prevalência da condição de umbigo de pintos recém-eclodidos submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	58
Tabela 5.	Peso de órgãos em valores absolutos (g) e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino (%) recém eclodidos submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	59
Tabela 6.	Parâmetros hemogasométricos de pintos de um dia submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	61
Tabela 7.	Osmolalidade em substâncias e doses individuais utilizadas no experimento.....	64
Tabela 8.	Osmolalidade do plasma de pintos de um dia.....	65
Tabela 9.	Parâmetros sanguíneos de pintos de um dia submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	67
Tabela 10.	Altura e largura das vilosidades, altura de cripta e relação vilo:cripta dos segmentos do intestino delgado de pintos de corte recém eclodidos submetidos a vacinação <i>in ovo</i> com ou sem probiótico.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GGT	Gama Glutamiltransferase
HB	Hemoglobina
HCO ₃	Bicarbonato
HCT	Hematócrito
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HVT	Vacina de Marek
ICA	Cálcio ionizado
IOF	Alimentação/nutrição <i>in ovo</i>
K	Potássio
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
NA	Sódio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OMS	Organização mundial da saúde
PCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
RY	Saco vitelino residual
SO ₂	Saturação de oxigênio
TGO	Aspartato Aminotransferase
TGP	Alanina Aminotransferase
UI	Unidade universal
UR	Umidade relativa do ar
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
YFBM	Peso do pinto sem o saco vitelino

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Mudanças morfofisiológicas durante o desenvolvimento embrionário.....	3
2.1.1. Principais vias metabólicas embrionárias.....	3
2.1.2. Equilíbrio ácido-base do embrião.....	5
2.1.3. Desenvolvimento intestinal na fase final da incubação.....	8
2.2. Probiótico e seu uso na avicultura industrial.....	10
2.3.1. Substâncias utilizadas na nutrição <i>in ovo</i>	14
2.3.1.1. Probióticos <i>in ovo</i>	14
2.3.1.2. Prebióticos e simbióticos <i>in ovo</i>	19
2.3.1.3. Carboidratos <i>in ovo</i>	21
2.3.1.4. Aminoácidos <i>in ovo</i>	24
2.3.1.5. Vitaminas <i>in ovo</i>	26
2.3.1.6. Minerais <i>in ovo</i>	30
2.3.1.7. Importância, perspectivas e limitações da nutrição <i>in ovo</i>	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Primeira fase experimental.....	33
3.1.1. Local.....	33
3.1.2. Ovos.....	33
3.1.2.1. Variáveis analisadas em ovos.....	34
3.1.2.2. Peso específico dos ovos.....	35
3.1.2.3. Peso do ovo e seus componentes.....	35
3.1.2.4. Espessura de casca.....	36
3.1.3. Pré-incubação e incubação dos ovos.....	36
3.1.4. Ovos inférteis e embriões com mortalidade inicial observada na ovoscopia.....	37
3.1.5. Vacinação <i>in ovo</i>	37
3.1.6. Transferência para o nascedouro.....	40
3.1.8. Nascimento dos pintos.....	42
3.1.9. Análises de rendimento de incubação.....	42
3.1.9.1. Perda de peso dos ovos durante o período de incubação.....	42
3.1.9.2. Mortalidade embrionária e fertilidade (%).....	42
3.1.9.3. Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis (%).....	43

3.2. Segunda fase experimental.....	43
3.2.1. Variáveis Analisadas em pintos.....	43
3.2.1.1. Peso dos pintos no momento da eclosão.....	43
3.2.1.2. Comprimento do pintinho (cm).....	44
3.2.1.3. Escore de umbigo.....	44
3.2.1.4. Hemogasometria.....	44
3.2.1.5. Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia.....	45
3.2.1.6. Peso dos órgãos e Peso do pinto sem o saco vitelino.....	46
3.2.1.7. Glicogênio hepático.....	47
3.2.1.8. Histomorfometria intestinal.....	48
3.2.1.9. Osmolalidade das soluções e do plasma de pintos.....	49
3.3. Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÃO.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Efeitos de probiótico *in ovo* sobre o rendimento de incubação e as características morfofisiológicas de pintos de corte

RESUMO

A nutrição *in ovo* tem investigado a eficácia da administração de substâncias, como os probióticos, com o intuito de melhorar as respostas zootécnicas das aves e promover a substituição dos antibióticos. No entanto, a maioria das pesquisas realizadas com esse propósito utilizam metodologia incompatível com a aplicabilidade prática, analisam poucas variedades de cepas bacterianas e não realizam esse procedimento em incubatórios comerciais. Nosso objetivo com este estudo foi investigar se a inoculação *in ovo* automatizada e em larga escala de probiótico comercial de múltiplas cepas, associada a vacinação *in ovo*, interfere no rendimento de incubação, nas características morfofisiológicas e na qualidade dos pintos recém-eclodidos provenientes de matrizes Cobb® com 35 semanas de idade. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, distribuído em três tratamentos: controle (sem inoculação), vacinação *in ovo* (padrão do incubatório) e vacinação *in ovo* associada ao probiótico. A incubação ocorreu conforme rotina normal do incubatório e aos 18,5 dias de incubação as soluções foram injetadas diretamente na cavidade amniótica dos ovos. Foram avaliados parâmetros como: eclodibilidade, mortalidade embrionária, equilíbrio ácido-base do pinto, assim como o seu peso, peso do pinto sem o saco vitelino (YFBM), saco residual (RY), comprimento e escore de umbigo, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P > 0,05$). Os pesos de órgãos, parâmetros sanguíneos e morfometria intestinal revelaram diferenças em algumas variáveis analisadas ($p \leq 0,05$) sem prejuízos à qualidade dos pintos. A técnica de associação da vacinação *in ovo* ao probiótico de múltiplas cepas utilizado nesta pesquisa, é segura para ser realizada em escala industrial, pois preserva a homeostase dos pintos e não interfere no rendimento de incubação. É recomendado o aprofundamento de estudos associando probióticos *in ovo* de múltiplas cepas e seus efeitos ao longo do período de criação das aves, para constatar benefícios relacionados ao desempenho zootécnico e respostas aos desafios de campo.

Palavras-chave: Eclodibilidade, equilíbrio ácido-base, frangos de corte, nutrição *in ovo*, osmolaridade, vacinação *in ovo*.

Effects of in ovo probiotics on incubation performance and morphophysiological characteristics of broiler chicks

ABSTRACT

In ovo nutrition has investigated the effectiveness of substances, such as probiotics, in order to improve poultry performance and replace antibiotics. However, most research uses methodology incompatible with the practical applicability, analyzing few bacterial strains and do not perform this procedure in commercial hatcheries. Our goal with this study was to investigate whether large-scale, automated in ovo inoculation of a commercial multi-strain probiotics associated with in ovo vaccination, affects incubation yield, morphophysiological characteristics and quality of newly hatched chicks from broiler breeders Cobb® with 35 weeks of age. We used a completely randomized design, with three treatments: control (without inoculation), in ovo vaccination (hatchery standard) and in ovo vaccination associated with the probiotic. The incubation was performed according to the normal hatchery routine and at 18.5 days of incubation the solutions were injected directly into the amniotic cavity. We evaluated the parameters such as: hatchability, embryo mortality, acid-base balance of the newly-hatched chick, as well as its weight, YFBM, RY, length and navel score, with no statistical differences between treatments ($P>0.05$). Organ weights, blood parameters and intestinal morphometry revealed differences in some analyzed variables ($p\leq 0.05$) without chick quality damage. The technique of associating *in ovo* vaccination with the multi-strain probiotic used in this research is safe to be carried out in industry, as it preserves chick homeostasis and does not interfere with the incubation efficiency. It is recommended further studies associating the inoculation of *in ovo* multiple strains probiotics and their effects throughout the period of poultry farming, to verify benefits related to the performance and the answers to the challenges in the field.

Keywords: Acid-base balance, broilers, hatchability, in ovo nutrition, in ovo vaccination, osmolarity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As pesquisas relacionadas à nutrição *in ovo* têm investigado a eficácia da administração de substâncias, como os probióticos, com o intuito de melhorar as respostas fisiológicas e zootécnicas dos embriões e aves, e promover a substituição aos antibióticos (TRIPLETT et al., 2018; CASTANEDA et al., 2021).

Os probióticos são capazes de atuar na maturidade do trato gastrointestinal e aumentar a capacidade funcional de digestão e absorção de nutrientes, otimizando o desempenho das aves durante a criação. Visam principalmente promover a colonização precoce do intestino com bactérias benéficas e modular o sistema imunológico, a fim de diminuir a gravidade de infecções entéricas em aves (JHA et al., 2019).

Segundo Castañeda et al. (2020, 2021), durante as três primeiras semanas após a eclosão, há um *gap* na proteção contra patógenos. Os pintos carregam anticorpos maternos que conferem certa cobertura aproximadamente até sete dias após a eclosão, entretanto, o sistema imunológico se torna completamente desenvolvido após 21 dias de idade. Como as primeiras bactérias que chegam ao intestino tendem a colonizá-lo, a recomendação do uso precoce de probióticos na avicultura tem sido justificada principalmente para o controle de bactérias patogênicas de interesse em saúde pública, em razão da capacidade de exclusão competitiva dos probióticos, diminuindo uma possível colonização de bactérias indesejáveis.

O uso de probióticos pode ser potencializado por diferentes métodos, incluindo a combinação de múltiplas cepas e espécies probióticas e associação com diferentes substâncias ou nutrientes que agem sinergicamente (JHA et al., 2020). Leão et al. (2021) demonstraram que uma variedade de espécies microbianas tem sido comumente utilizada como probióticos, incluindo espécies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e leveduras. Entretanto, é necessário avaliar os efeitos que as espécies de probióticos podem ter sobre a incubação, visto que diferentes espécies possuem distintas respostas biológicas no organismo do animal. A maioria dos experimentos com inoculação de probiótico *in ovo* é conduzida utilizando uma quantidade limitada de espécies, e relata efeitos positivos (MAJIDI-MOSLEH et al., 2017; KHALIGH et al., 2018; OLADOKUN et al., 2021) como também negativos (TRIPLETT et al., 2018) sobre a eclodibilidade.

A inoculação destas bactérias benéficas durante a incubação é promissora para a avicultura moderna (LEÃO et al., 2021; DAS et al., 2021). Considerando a relevância e a projeção de aumento da produtividade avícola, a suplementação precoce com probióticos *in ovo* em escala comercial, tem se tornado um dos focos das pesquisas atuais, principalmente pela vantagem da aplicabilidade e possibilidade de acurácia quando comparada às vias orais.

Apesar da inoculação de probióticos *in ovo* ser uma prática próspera e ter apresentado resultados positivos em alguns experimentos (SALIM et al., 2013; JHA et al., 2020; LEÃO et al., 2021), estes em sua maioria, não foram realizados em incubatórios comerciais, usando sistemas de injeção automatizados (BECK et al., 2019). Ademais, apresentaram pequenas unidades experimentais, assim como volumes e concentrações de substâncias incompatíveis com as máquinas de vacinação *in ovo* utilizadas na indústria (DE OLIVEIRA et al., 2014; TEAGUE et al., 2017; ELMONEIM et al., 2019).

As incertezas sobre o momento e o local ideal para a inoculação *in ovo*, o desconhecimento sobre o volume adequado a ser injetado, a falta de dados sobre a compatibilidade de osmolaridade das soluções, assim como a ausência de informações sobre as alterações no equilíbrio ácido-básico e morfofisiologia embrionária, ainda são fatores limitantes para o sucesso da implementação nas empresas. Dessa forma, esta metodologia ainda demanda investigação sobre seus efeitos para que sejam validadas e seguras em larga escala. A vacinação *in ovo* é comumente realizada na transição entre a segunda e a terceira fase de desenvolvimento embrionário. Durante este período, dramáticas mudanças fisiológicas e metabólicas acontecem e qualquer intervenção nesta fase pode provocar distúrbios e afetar a sobrevivência do embrião, assim como seu crescimento pós-eclosão (LOURENS et al., 2006; MOLENAAR et al., 2010).

Portanto, objetivamos neste estudo investigar se a inoculação *in ovo* automatizada e em larga escala de probióticos de múltiplas cepas, associada a vacina, interfere no rendimento de incubação, nas características morfofisiológicas e na qualidade dos pintos recém-eclodidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mudanças morfofisiológicas durante o desenvolvimento embrionário

O entendimento das mudanças morfofisiológicas que ocorrem durante o período de desenvolvimento embrionário é essencial para o correto manejo de incubação, assim como para o estabelecimento de pesquisas e estratégias associadas à nutrição *in ovo*.

2.1.1. Principais vias metabólicas embrionárias

Os processos fisiológicos dos embriões de aves são dependentes de reações bioquímicas, ou seja, transformações de nutrientes do ovo em energia para o desenvolvimento e eclosão do pintinho (MORAN JR, 2007; GIVISIEZ et al., 2020).

Os principais processos fisiológicos que acontecem durante a incubação podem ser divididos em três fases metabólicas principais. Na primeira fase, aproximadamente entre zero a 96 horas, o embrião restabelece seu desenvolvimento com intensa multiplicação celular, diferenciação das estruturas e desenvolvimento dos órgãos (GONZALES, 2005). De acordo com Moran Jr (2007), durante os primeiros dias de incubação, ocorre reduzido desenvolvimento do sistema vascular, tornando o fornecimento de oxigênio para o embrião limitado devido à imaturidade das células sanguíneas e do sistema coriônico vascular. Dessa forma, a principal via metabólica energética para essa fase é através da glicólise anaeróbica, a partir da glicose presente no albúmen. Nesse período, ocorre aumento da produção de ácido lático, podendo este ser utilizado para a produção de glicose por meio da gliconeogênese, até que a membrana corioalantóide torne-se funcional (DE OLIVEIRA et al., 2008).

A partir do quinto dia de incubação, devido ao desenvolvimento da membrana corioalantóide, inicia-se a função respiratória, aumentando a circulação de oxigênio para o embrião, por meio dos poros da casca. Esta membrana torna-se completa por volta do sétimo e oitavo dia (SATO et al., 2006). Após esse momento, que compreende a segunda fase do desenvolvimento embrionário, a oxidação dos lipídios da gema torna-se a principal fonte de energia para os embriões até o momento da bicagem interna (DECUYPERE, 1992). Com a mobilização e hidrólise dos componentes da gema, ocorre a liberação dos ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos, principalmente os não essenciais, são utilizados na β -oxidação para a produção de energia, tendo também como produto a água metabólica (SPEAKE; DEANS, 2004). Os ácidos graxos

essenciais são conservados para a constituição das membranas celulares dos embriões. Nessa fase, os carboidratos presentes também estão sendo conservados para posterior utilização (MORAN JR, 2007).

De acordo com Yoshizaki (2002) e Uni e Ferket (2004), entre o 14º e 15º dia de incubação, a conexão seroamniótica promove a junção do albúmen e âmnio, na região mais fina do ovo. Após essa junção, o albúmen juntamente com o fluido amniótico, será consumido oralmente pelo embrião (BOHORQUEZ, 2010), sendo absorvidos pelos enterócitos que são capazes de absorver macromoléculas presentes no duodeno e jejuno. Os carboidratos ligados a essas proteínas (glicoproteínas ou proteínas glicosadas) são usados na gliconeogênese, resultando em aumento na concentração de glicose sanguínea, e posteriormente deposição de reservas de glicogênio no fígado e músculos (MORAN JR, 2007). Sendo assim, a quantidade e a qualidade do âmnio e albúmen influenciam a transição metabólica e fisiológica do embrião (UNI; FERKET, 2010).

O consumo do albúmen e fluido amniótico também fornece proteção para o embrião pela presença de IgA do albúmen e estende-se até que comece o processo de bicagem interna em torno do 19º dia de incubação (EVERAERT; DECUYPERE, 2013).

Zhai et al. (2011a,b) relatam que a glicose estocada na forma de glicogênio, alcança sua concentração máxima no fígado dos embriões até o 19º dia de incubação. Aproximadamente neste período inicia-se a terceira fase do desenvolvimento embrionário, onde os embriões começam a se preparar para o processo de eclosão e necessitam de uma alta demanda de energia, ocasionando redução das reservas de glicogênio.

Entre o 18º e 19º dia, o embrião rompe a membrana interna e a corioalantóide, tendo acesso à câmara de ar, iniciando assim a transição da respiração corioalantóide para pulmonar (MORAN JR, 2007; BARBOSA, 2011). Nesta última fase, a utilização de lipídio é limitada e o metabolismo volta a ser anaeróbico. No momento da bicagem interna até a alimentação pós-eclosão, a gliconeogênese hepática e muscular são importantes por serem uma das principais vias metabólicas responsáveis pelo fornecimento de glicose ao embrião (CHRISTENSEN et al., 2001).

Um manejo de incubação incorreto onde as condições ótimas para seu desenvolvimento não são alcançadas, faz com que o embrião, ao invés de estocar glicogênio para o crítico período do processo de eclosão, use suas reservas energéticas em prol de manter sua homeostase. A alta demanda de energia nestas fases, principalmente quando a deposição de glicogênio não é suficientemente adequada,

provoca a produção de energia a partir do aumento da degradação de proteína muscular pelo embrião (CHRISTENSEN et al., 2001; ZHAI et al., 2011a,b). No caso da diminuição da proteína corporal nos músculos de embriões, a consequência é a eclosão de pintos de menor qualidade e menor desenvolvimento na fase de criação.

A inoculação de substâncias e nutrientes *in ovo* é comumente realizada na transição entre a segunda e a terceira fase de desenvolvimento embrionário. Durante este período, dramáticas mudanças fisiológicas e metabólicas acontecem e qualquer intervenção nesta fase pode provocar distúrbios e afetar a sobrevivência do embrião, assim como seu desempenho pós-eclosão (LOURENS et al., 2006).

2.1.2. Equilíbrio ácido-base do embrião

A função normal das células do organismo é dependente de processos enzimáticos e bioquímicos do metabolismo celular. Diversos fatores devem ser mantidos dentro de estreitos limites para preservar a função celular, como a osmolaridade, os eletrólitos, as quantidades de nutrientes, oxigênio, dióxido de carbono e íon hidrogênio (DAWES; SIMKISS, 1969).

O equilíbrio ácido-base tem grande importância fisiológica e bioquímica, visto que a preservação do estado estrutural das proteínas e conseqüentemente o funcionamento ideal das células que constituem o organismo vivo, é influenciada pela concentração hidrogeniônica $[H^+]$ sanguínea, avaliada por meio do valor de pH. Pequenas variações da concentração do hidrogênio podem produzir grandes alterações na velocidade das reações químicas das células e estas alterações são capazes de modificar o metabolismo a ponto de inibir certas funções e até ocasionar a morte celular (ROBINSON, 2014).

A manutenção de um pH normal depende do balanço entre a produção e o consumo de ácido ou base, do seu metabolismo ou excreção. Desta forma, o processo de regulação ácido-base depende de sistemas tampão extra e intracelulares e de sistemas de compensação pelo pulmão e pelo rim (EVERAERT; DECUYPERE, 2013).

Os sistemas tampão extracelulares constituem a primeira linha de defesa do organismo, pois ocorrem instantaneamente a uma alteração de pH. Eles incluem o HCO_3^- (sistema bicarbonato - ácido carbônico) e as proteínas séricas (como por exemplo, a albumina) (EVERAERT et al., 2008). O HCO_3^- é capaz de doar ou receber

íons H^+ , minimizando alterações do pH e deslocando a reação para maior produção de CO_2 e água, que podem ser eliminados pela respiração (DIBARTOLA, 2000).

Os tampões intracelulares, que têm uma resposta mais lenta, incluem os ossos (fosfatos orgânicos) e as proteínas intracelulares (como por exemplo, a hemoglobina-Hb). As mensurações de Hb também são importantes para analisar a capacidade de oxigenação dos tecidos, sendo considerada o segundo tampão mais importante no sangue (FURLAN et al., 2002). Além disso, a mensuração de sO_2 (saturação de oxigênio) tem por finalidade medir a porcentagem de hemoglobinas que está transportando oxigênio (O_2) (WILSON, 2013). De acordo com Furlan et al. (2002), existe uma relação entre hematócrito (Hct) e hemoglobina. O Hct representa a porcentagem da massa de hemácias em relação ao volume sanguíneo (proporção de eritrócitos no sangue). Sintomas como anemia podem ser vistos quando os valores de Hct estão baixos e um valor alto pode ser causado por desidratação ou policitemia (espessamento do sangue).

Quando o tamponamento químico não é suficiente para evitar alterações de pH, inicia-se a compensação respiratória e/ou metabólica. Os mecanismos pulmonares envolvem o controle respiratório para a eliminação de CO_2 . Sendo assim, uma avaliação relevante na hemogasometria é a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e a pO_2 (pressão parcial de oxigênio) (ROBINSON, 2014).

De acordo com Everaert et al. (2007) e Furlan et al. (2002), a pCO_2 é medida pela concentração de CO_2 dissolvida no sangue. Representa o equilíbrio entre a produção de O_2 e a remoção de CO_2 . A pressão parcial de O_2 é determinada medindo a concentração de O_2 dissolvida no sangue, e como o oxigênio é capaz de se mover a partir do espaço aéreo dos pulmões para o sangue.

Se o CO_2 não for eliminado, a reação ocorre no sentido de produção do ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia em H^+ e HCO_3^- e aumenta a quantidade de hidrogênio no organismo, resultando em acidose. Já a alcalose respiratória, ocorre no caso de uma hiperventilação, e a redução de pCO_2 tem como consequência a redução na concentração de H_2CO_3 e dos íons H^+ (DIBARTOLA, 2000; BARBOSA et al., 2011).

Os mecanismos de defesa contra alterações do pH sanguíneo, incluem mecanismos de ação rápida, o respiratório; e o mecanismo renal, de ação mais lenta e eficaz apenas para compensar alterações crônicas ou de longa duração. Além de atuar na restauração do equilíbrio ácido-base, a compensação renal promove a manutenção do meio ambiente das células, o líquido extracelular. Os rins reagem aos distúrbios da

osmolaridade, desidratação e hipotensão, eliminando ácidos não voláteis e não carbônicos (DAWES; SIMKISS, 1969).

Nas aves, o ovo fornece ao embrião todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, exceto oxigênio (ROCHA; MAIORKA, 2013). Dessa forma, durante o processo de incubação, as trocas gasosas são primordiais para a sobrevivência do embrião e podem ser divididas em dois momentos importantes: fase pré-natal (compreende o início da incubação até a bicagem interna) e fase perinatal (inicia-se com a bicagem interna e termina com a bicagem externa até a efetiva saída do pintinho dentro do ovo) (BARBOSA et al., 2014). As mudanças na hemogasometria exercem influência direta sobre o status fisiológico da ave, podendo resultar em mudanças no equilíbrio ácido-base do sangue (YALÇIN et al., 2008; LAKE et al., 2020).

Nos primeiros dias de incubação, as trocas gasosas são realizadas por meio da área vascular, até o completo estabelecimento da membrana corioalantóide, na qual fornece O_2 necessário para a produção de energia (DE OLIVEIRA et al., 2008; EVERAERT; DECUYPERE, 2013). No decorrer da incubação, a pCO_2 do sangue aumenta principalmente por conta do crescente metabolismo embrionário (BOUTILIER et al., 1977) e efetivamente diminui a partir do momento em que o pintinho rompe a casca do ovo (TAZAWA; PIIPER, 1984), visto que a câmara de ar contém quantidade significativa de CO_2 (BARBOSA et al., 2014).

Rowlett e Simkiss (1989) demonstraram que durante o período final da incubação, o embrião passa por uma demanda metabólica de O_2 muito elevada e em razão desse momento, apesar do fluxo sanguíneo por meio da membrana corioalantóide ser intensificado, não mais supre os níveis necessários de oxigenação. A pCO_2 aumenta e o pH sanguíneo é regulado por meio de processos de compensação do HCO_3^- pelo rim ou casca, enquanto o âmnio parece ser tamponado pelo HCO_3^- do alantóide, tentando impedir a redução do pH (BOUTILIER et al., 1977).

O aumento da capacidade de tamponamento do sangue durante o desenvolvimento não é apenas explicado pelo aumento dos íons bicarbonato (TAZAWA; PIIPER, 1984), mas em conjunto, ocorre a elevação do hematócrito e concentração de hemoglobina, como também alterações na afinidade do O_2 pela hemoglobina (BARBOSA et al., 2014). Entretanto, apesar das adaptações nesta fase final, o embrião entra em hipóxia devido a redução da pO_2 , que desencadeia estímulo para a bicagem interna e acesso a câmara de ar. Posteriormente, inicia-se a bicagem externa e o pinto estabiliza a respiração pulmonar (BELLO et al., 2004).

O balanço de eletrólitos como cálcio ionizado (iCa), sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) no plasma também são importantes para o equilíbrio ácido-básico. A concentração de cálcio do plasma é elevada ao longo da segunda metade da incubação, por consequência da absorção de Ca²⁺, oriundo da casca do ovo. Além disso, o Na⁺ e o K⁺ são íons fundamentais na manutenção da pressão osmótica, controle da passagem dos nutrientes por meio da membrana celular e controle do volume hídrico da célula (BORGES et al., 2003). O Na⁺, por ser o principal cátion do líquido extracelular e estar obrigatoriamente acompanhado de um número igual ao dos ânions, cloro e bicarbonato, é o principal responsável pela osmolaridade dos líquidos (BUZZO et al., 2015).

É importante salientar que durante os processos como o de vacinação e/ou nutrição *in ovo*, que comumente acontecem entre o 18º e 19º dia de incubação, ocorre a perfuração da casca do ovo na região da câmara de ar. Este orifício pode provocar alterações metabólicas no embrião, já que essa perfuração pode ocasionar maior disponibilidade de oxigênio e alterar a troca de gases entre o embrião e o ambiente externo (MOLENAAR et al., 2010). Além disso, apesar da inoculação *in ovo* com probiótico ou outras substâncias terem sido pesquisadas e seus benefícios estarem documentados, pouco se sabe sobre as influências que essas substâncias poderiam causar no balanço hidroeletrólítico e equilíbrio ácido-base dos embriões e pintos. Algumas bactérias ácido lácticas, por exemplo, além de reduzir o pH intestinal, produzem vários metabólitos, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o que poderia influenciar no equilíbrio químico e na homeostase desses embriões (DANKOWIAKOWSKA et al., 2019).

2.1.3. Desenvolvimento intestinal na fase final de incubação

O início da formação do trato alimentar se dá nas primeiras horas de incubação. Ao final do terceiro dia, os embriões já têm o intestino anterior, médio e posterior definidos. No quinto dia de incubação, ocorre a diferenciação da boca, formação do proventrículo e moela, e no sexto dia inicia-se a formação do bico. Ao 14º dia de incubação há introdução do intestino na cavidade abdominal (PATTEN, 1951).

A medida que as alterações morfológicas e fisiológicas acontecem após a ingestão do líquido amniótico a partir do 14º e 15º dia de incubação, ocorre o rápido desenvolvimento da mucosa intestinal, que é evidenciado pelas alterações morfológicas e expressão das atividades enzimáticas e transportadores (GIVISIEZ et al., 2020).

Uni et al. (2003) demonstraram que as alterações morfológicas da mucosa intestinal podem ser observadas a partir do 15º dia incubação, com a presença de vilosidades rudimentares, e que no 17º dia as vilosidades já diferem em comprimento e forma.

Células do saco vitelino, mediadas por receptores, absorvem as lipoproteínas intactas por mecanismos de endocitose. Ocorre tanto a absorção direta como o transporte da gema para o intestino delgado. No final da incubação, o intestino delgado apresenta uma taxa de crescimento superior ao peso corporal. A relação entre o peso intestinal e o peso corporal aumenta de aproximadamente 1% no dia 17º para 3,5% no nascimento (MAIORKA et al., 2000; UNI et al., 2003).

Apesar do desenvolvimento morfológico do intestino estar anatomicamente completo e funcional no final da incubação, maiores mudanças ocorrem após a eclosão, com a presença dos nutrientes no lúmen intestinal (GEYRA et al., 2001). Além disso, o crescimento da mucosa intestinal é afetado pelas alterações hormonais, características físicas e químicas da dieta, como também a presença da microbiota intestinal (MAIORKA et al., 2000; GIVISIEZ et al., 2020).

Ao eclodir, os pintos apresentam os enterócitos do intestino delgado ainda imaturos (MAIORKA et al., 2006; MAIORKA, 2004). Após a eclosão, estas células aumentam rapidamente de comprimento com definição da borda em escova, implicando na necessidade elevada no aporte de energia. No entanto, as vilosidades do intestino delgado não se apresentam completamente desenvolvidas e suas criptas ainda não são observadas facilmente (CHEN et al., 2009). A maturação da mucosa intestinal consiste no aumento da produção de enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas que são rapidamente estimuladas quando há presença dos nutrientes no trato digestivo (MAIORKA et al., 2006). Portanto, quanto mais cedo o embrião receber dieta exógena, maior será a capacidade intestinal de atingir precocemente sua maturidade funcional, possibilitando o pintinho recém eclodido utilizar os nutrientes dietéticos com maior capacidade de digestão e absorção.

De acordo com De Jong et al. (2017), as principais características observadas para avaliar a capacidade funcional do intestino são a altura das vilosidades, profundidade das criptas, a relação altura da vilosidade/profundidade de cripta, contagem de números de células caliciformes e enterócitos do duodeno, jejuno e íleo. As criptas são responsáveis pelo aumento da altura e densidade das vilosidades intestinais, sendo então, uma importante característica para o desenvolvimento da

mucosa intestinal (WANG et al., 2017). Segundo Pluske et al. (1997), maior profundidade de cripta indica elevada atividade proliferativa celular para garantir adequada taxa de renovação epitelial, compensando as perdas nas extremidades das vilosidades. Além disso, Givisiez et al. (2020) relataram que a alta capacidade digestiva e absorptiva, está relacionada com alta vilosidade intestinal, apresentando mucosa diferenciada (UNI; FERKET, 2010; ODUTAYO et al., 2020).

A digestão e absorção dos nutrientes são afetados quando a saúde intestinal é prejudicada, aumentando a colonização de bactérias patogênicas e causando baixos índices zootécnicos. Portanto, para atingir o máximo potencial genético das aves é crucial que o trato gastrointestinal esteja saudável, completamente desenvolvido e eficiente na utilização de nutrientes. Esse sistema engloba a fisiologia dos animais, nutrição, microbiologia e imunologia, tornando-se bastante complexo (JHA et al., 2019).

2.2. Probiótico e seu uso na avicultura industrial

O mercado de probióticos na avicultura ultrapassou US\$ 85 milhões em 2020, e a maior demanda por esse produto natural na alimentação de aves, como também os seus benefícios bem documentados, impulsiona ainda mais o crescimento do mercado global, que deve atingir US\$ 130 milhões/ano até 2027 (AHUJA; BAYAS, 2021).

A utilização de probióticos na indústria avícola tem sido crescente ao longo dos anos, principalmente como alternativa aos antibióticos, que foram proibidos na União Europeia há mais de uma década (FALLAH et al., 2013). Esta proibição deveu-se às populações bacterianas patogênicas desenvolverem resistência aos antibióticos, como também, a ocorrência de resíduos de antibióticos em produtos cárneos, tornando-se o uso um risco para a saúde humana e animal (VIECO-SAIZ et al., 2019).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu probióticos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro". De acordo com JHA et al. (2020), os probióticos podem ser conceituados como microrganismos vivos, capazes de favorecer o hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal.

As espécies probióticas mais utilizadas na avicultura são *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Bifidobacterium spp.* (FONTANA et al., 2013; PARK et al., 2015). Cada espécie bacteriana possui propriedades, vantagens e finalidades

diversas (Tabela 1). Como exemplos, *Bacillus* são formadores de esporos, resistentes para sobreviver ao trânsito intestinal, pH baixo e sais biliares, além de apresentarem rápido crescimento (SHIVARAMAIAH et al., 2011). Adicionalmente, suportam altas temperaturas durante os processos de fabricação de ração (CASTAÑEDA et al., 2021). Uma das principais vantagens das espécies de *Bacillus* é sua capacidade de regulação da atividade da microbiota intestinal, assim como a proteção das células epiteliais do intestino contra a oxidação (JHA ET AL., 2020). *Lactobacillus* são bastonetes ou cocobacilos não formadores de esporos, acidúricos ou acidófilos, geralmente caracterizados pela formação de ácido lático como único ou principal produto final de sua fermentação de açúcar (SALVETTI et al., 2012). Também são bactérias resistentes a pH baixo, sais biliares, têm alta aderência no epitélio intestinal e desempenham um papel importante na fisiologia de seu hospedeiro, pois mantêm o equilíbrio da microflora intestinal. Além disso, melhoram a digestão e assimilação de nutrientes e removem substâncias tóxicas (DEC et al., 2014).

A suplementação com probióticos favorece o hospedeiro não somente por meio da modificação da microbiota intestinal (VAN COILLIE et al., 2007; LEBEER et al., 2008; ANEE et al., 2021), como também pela estimulação do sistema imunológico (KABIR, 2009; OTUTUMI et al., 2012; AHMED et al., 2014; AL-KHALAIFAH, 2018), prevenção da colonização por patógenos (PAN; YU, 2014) e conseqüentemente aumento do desempenho zootécnico durante a criação das aves (MOUNTZOURIS et al., 2007; SAMLI et al., 2007; SAMLI et al., 2010; ZHAO et al., 2013; PENDER et al., 2017). Estudos já relataram que os probióticos podem prevenir e controlar patógenos em aves, como *Salmonella enteritidis* (MARTINS et al., 2015), *Salmonella Pullorum* (CHEN et al., 2020), *Salmonella Typhimurium* (PARK; KIM, 2015) e *Salmonella Gallinarum* (OH et al., 2017). Além disso, cepas probióticas de *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* demonstraram aumentar a concentração de imunoglobulinas IgA, IgY e IgM em frangos de corte, contribuindo para maior resistência a doenças e conseqüentemente melhor crescimento (ZHANG; KIM, 2014; FATHI et al., 2017, ABDEL-MONEIM et al., 2019).

Os mecanismos de ação dos probióticos para promover esses benefícios incluem a competição com outros microrganismos por nutrientes (KABIR et al., 2004), sítios de ligação, receptores na mucosa intestinal e produção de compostos inibitórios, como por exemplo, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e defensinas (ABDEL-MONEIM et al., 2020). Abd El-Hack et al. (2020) demonstraram que a modulação imune adaptativa que

depende dos linfócitos B e T para produzir anticorpos, as barreiras físicas e químicas (imunidade inata), a produção de ácidos orgânicos (como os ácidos láctico e acético), e a redução do pH intestinal, também são mecanismos dos probióticos contra bactérias patogênicas.

O uso de probióticos pode ser potencializado por diferentes métodos, incluindo seleção e a combinação de múltiplas cepas probióticas, manipulação de genes e associação com diferentes substâncias ou nutrientes que agem sinergicamente (JHA et al., 2020).

Os probióticos são comumente utilizados na ração, mas podem ser fornecidos via água ou por spray (BAI et al., 2013; OLNOOD et al., 2015; PENDER, et al., 2017), como também administrados ao embrião em desenvolvimento usando a mesma tecnologia de vacinação *in ovo* (BECK et al., 2019).

A inoculação destas bactérias durante a incubação torna-se promissora na avicultura moderna (LEÃO et al., 2021; DAS et al., 2021). Segundo Castañeda et al. (2021), durante as três primeiras semanas após a eclosão, há um *gap* na proteção contra patógenos. Os pintos carregam anticorpos maternos que conferem certa proteção contra infecções aproximadamente até sete dias após a eclosão, entretanto, o sistema imunológico não está completamente desenvolvido antes dos 21 dias de idade.

Considerando o aumento da produtividade avícola, a alta eficiência alimentar e rápido crescimento das linhagens modernas, a suplementação precoce com probióticos em escala comercial tem se tornado um dos focos das pesquisas atuais, principalmente pela vantagem da aplicabilidade e possibilidade de acurácia quando comparada às vias orais. Estes microrganismos são utilizados como estratégia para antecipar o desenvolvimento e a colonização do trato gastrointestinal, com objetivo de reduzir a suscetibilidade das aves aos desafios durante as primeiras semanas de vida e consequentemente, otimizar o desempenho durante a criação (JHA et al., 2019).

Quadro 1 - Resumo das espécies probióticas benéficas utilizadas na produção avícola.

Bactéria	Características	Benefícios	Referências
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéria aeróbia facultativa, Gram positiva, forma esporos e produz de compostos ativos antimicrobianos insensíveis à oxidação.	Regula a atividade da microbiota intestinal, protege as células epiteliais do intestino contra a oxidação, estimula a resposta imune contra diversos patógenos.	Stein (2005) Jha et al. (2020)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bactéria anaeróbia, Gram-positiva não formadora de esporos, produtora de ácido láctico.	Favorece o sistema imunológico, fisiologia intestinal, e saúde. Além de ser fonte de vitaminas (B12, K, biotina).	Koenig et al. (2011) Sadeghi et al. (2015)
<i>Lactobacillus animalis</i>	Bactéria aeróbia, Gram positiva, não formadora de esporos, produtora de ácido láctico.	Regula o pH ambiental, reduz a multiplicação de bactérias patogênicas, alta adesão ao epitélio do TGA.	Beck et al. (2019)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bactéria aeróbia, Gram positiva, não formadora de esporos, encontradas em humanos e animais no TGI e boca.	Regula a microbiota intestinal, estimula a resposta imune protetora e o desempenho. Alta aderência ao epitélio intestinal formando barreira protetora.	Jin et al. (2018) Ozogul e Hamed, (2016)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Bactéria aeróbia, Gram positiva, não formadora de esporos que habitam naturalmente o intestino de mamíferos e aves.	Melhora a histomorfologia intestinal, sistema imunológico e induz a colonização intestinal. Produz vitamina B12 e sintetiza L-lisina e ácido fólico.	Ahmed et al. (2014)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Bactéria aeróbia, Gram-positiva, termofílica encontrada no TGI de mamíferos e produtos fermentados naturalmente.	Cria um ambiente para formação de ácido láctico, estabiliza flora intestinal e impede o crescimento de microorganismos patogênicos.	Batistuzzo et al. (2016)
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	Bactéria ácido-láctica, aeróbia, Gram-positiva, encontrada no trato gastrointestinal humano e animal.	Modula a microbiota intestinal pela atividade antimicrobiana, melhorando o desempenho do crescimento e a saúde digestiva.	Timmerman et al. (2006)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bactéria ácido-láctica, unidas em cadeias longas, utilizam a lactose como substrato energético e secretam ácido láctico	Auxilia o sistema digestivo, principalmente a melhor digestibilidade de carboidratos complexos e proteínas.	Kano H et al. (2013)
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Bactéria aeróbia, gram positiva, não formadora de esporos isolado do trato gastrointestinal (TGI) humano, suíno e aviário.	Regula a microbiota intestinal, estimulam a resposta imune protetora, inibem a atividade enzimática fecal, produzem AGCC e diminui pH do intestino.	Messaoudi et al. (2013) Barros et al. (2019)
<i>Enterococcus faecium</i>	Bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa que vivem como parte da flora natural no trato intestinal de animais e humanos.	Resistência aos sais biliares e baixo pH encontrados na digestão, melhor desempenho na criação e morfologia intestinal.	Klare et al. (2003) Zommiti et al. (2018)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura aeróbia facultativa, fazem fermentação alcoólica, liberam CO ₂ . Podem produzir biomassa, CO ₂ e água, quando em aerobiose.	Melhora o desempenho, com o aumento das vilosidades intestinais, proporcionando uma melhoria na capacidade absorviva, na inibição de microrganismos patogênicos no TGI.	Souza et al. (2011) Jadhav et al. (2015)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Bactéria ácido-láctica Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não esporulada, produz peptídeos antimicrobianos, comumente encontrada na microbiota intestinal de mamíferos..	Modula a microbiota intestinal pelo amplo espectro de atividade antimicrobiana, melhorando a saúde digestiva.	Papagianni e Anastasiadou (2009)

2.3. Nutrição *in ovo*

Os ovos férteis contêm os elementos essenciais para o desenvolvimento do embrião, no entanto, o conteúdo nutricional do ovo pode variar de acordo com diversos fatores, como: a alimentação, idade das matrizes, o tamanho do ovo, além do estado sanitário das aves, podendo gerar limitações na disponibilidade de nutrientes. Os pesquisadores Grodzik et al. (2013) e Retes et al. (2018) afirmaram que a quantidade de nutrientes presentes no ovo pode ser limitada ou insuficiente para o desenvolvimento embrionário nas aves geneticamente melhoradas para o rápido crescimento. Ademais, o próprio manejo de incubação quando inadequado, pode fazer com que o embrião, a fim de manter sua homeostase, utilize suas reservas energéticas em detrimento da formação de músculos e utilização no processo de eclosão (CHRISTENSEN et al., 2001; BARBOSA et al., 2011).

Dessa forma, a inoculação *in ovo* (IOF) de carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais, prebióticos e probióticos é estudada como estratégia para melhorar precocemente o aporte energético, o estado nutricional dos embriões, o desenvolvimento funcional e a colonização precoce do trato gastrointestinal, assim como o sistema imunológico, e conseqüentemente, a qualidade do pintinho e o desempenho pós eclosão.

Diante do exposto foi elaborado uma revisão dos estudos realizados na última década até os dias atuais, sobre os principais nutrientes e substâncias inoculadas *in ovo*, com a finalidade de elucidar os seus efeitos e possibilidades para a utilização prática nos incubatórios industriais.

2.3.1. Substâncias utilizadas na nutrição *in ovo*

2.3.1.1. Probióticos *in ovo*

Durante o período pós eclosão, os pintinhos apresentam o sistema imunológico imaturo e ineficiente, tornando as aves vulneráveis às bactérias patogênicas presentes no meio ambiente (JHA et al., 2019). Na indústria avícola, os antibióticos são usados para prevenir patógenos e doenças de aves e conseqüentemente melhorar a produção de carne e ovos. No entanto, o uso de antibióticos resultou em diversas implicações como, por exemplo, o

desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos, o que impacta negativamente na saúde humana (VAZ et al., 2010). A União Europeia proibiu o uso sub-terapêutico de antibióticos como aditivos para alimentação animal (PENDER et al., 2017) e dessa forma, ao longo dos anos, tornou-se necessário buscar alternativas que auxiliem a prevenção contra agentes infecciosos e que sejam capazes de manter a saúde intestinal da ave (AGYARE et al., 2018), sem impedir o seu desempenho.

Uma das alternativas consideradas revolucionárias para a substituição aos antibióticos é o uso de probióticos *in ovo*. O termo probiótico foi definido como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio intestinal” (FULLER, 1989), apresentando capacidade para modular o sistema imunológico e reduzir significativamente infecções entéricas em aves (PAN; YU, 2014; GETACHEW, 2016).

Leão et al. (2021) demonstraram que uma variedade de espécies microbianas tem sido usada como probióticos, incluindo espécies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e numerosas culturas de leveduras.

De acordo com Kadam et al. (2013), os probióticos podem ser administrados ainda no período do desenvolvimento embrionário, utilizando a mesma técnica de vacinação *in ovo*, que ocorre durante o 18º a 19º dia nos incubatórios industriais.

Pedroso et al. (2016), Ding et al. (2017) e Lee et al. (2019) demonstraram que o sistema reprodutivo da ave possui microrganismos benéficos que podem ser transmitidos verticalmente para o embrião durante o processo de formação do ovo. Estes microrganismos benéficos podem se estabelecer quando começa a ingestão do líquido amniótico, como também durante a absorção do saco vitelino após o 18º dia de incubação e conseqüentemente, constituírem a microbiota intestinal dos pintos recém eclodidos (WEN et al., 2021). Dessa forma, os embriões não são estéreis antes do nascimento (AKINYEMI et al., 2020; WEN et al., 2021) e o fornecimento precoce de probióticos *in ovo*, possibilita que o trato gastrointestinal seja colonizado por bactérias benéficas antes das patogênicas (ARREGUIN-NAVA et al., 2019; BECK et al., 2019).

Peebles (2018) relatou que a administração precoce de probióticos pode favorecer a maturação e colonização do trato gastrointestinal ainda no período pré-natal, tornando os embriões de frangos de corte mais resistentes a possíveis contaminações durante o processo de incubação ou nos primeiros dias pós-eclosão.

As bactérias probióticas também protegem os vilos e as superfícies absortivas contra toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos, permitindo, assim, a regeneração da mucosa intestinal lesada (SHEHATA et al., 2021).

Salim et al. (2013) observaram que a colonização de *E. coli* foi reduzida no trato gastrointestinal após a utilização de *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de frangos de corte. Essas características são encontradas devido às bactérias patogênicas escolherem um ambiente de pH neutro, enquanto certas bactérias probióticas podem permanecer em um pH ácido em torno de 5. Esses microrganismos probióticos constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro, participando da regulação da permeabilidade celular, da expressão de genes de células caliciformes e da secreção de peptídeos antimicrobianos (JAVANSHIR et al., 2021).

A melhoria da saúde intestinal através da microbiota afeta positivamente o metabolismo como um todo (PRUSZYNSKA-OSZMALEK et al., 2015). Um exemplo é o *Enterococcus faecium*, uma espécie comumente utilizada como probiótico, que é capaz de alterar a partição e utilização dos carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e lipídios no fígado de frangos de corte por meio do aumento da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo e defesa antioxidante. Além disso, exerce papel simbiótico e sinérgico ao complementar o crescimento do *Lactobacillus acidophilus* e também produzir ácido DL-lático, o que baixa o pH dos intestinos, além de produzir a enzima amilase (ZHENG et al., 2014).

Estudos mostraram que a colonização precoce do trato gastrointestinal das aves por meio da IOF de probióticos é viável e favorece a exclusão das bactérias patogênicas. Quando bem administrados, também não prejudicam a eclosão de pintos de corte (BILONI et al., 2013; SHEHATA et al., 2021). Um experimento conduzido por Leandro et al. (2010) testaram a inoculação manual em ovos embrionados com água ou solução de probióticos (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ ufc/g) na cavidade alantóide, no 16^o dia de incubação, e revelaram que os pintos de corte que receberam estas bactérias *in ovo* evitaram a colonização de *Salmonella enteritidis* no papo e no ceco, analisados aos 7 e 21 dias pós-eclosão. O probiótico não alterou a eclodibilidade, o desenvolvimento do embrião, o peso ao 1^o dia de vida, como também, o ganho de peso no período inicial de criação.

De Oliveira et al. (2014) utilizaram probióticos *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium in ovo* para avaliar a proteção contra infecções por *S. Enteritidis* em frangos Ross 308[®]. As soluções foram injetadas manualmente no líquido amniótico no 17,5^o dia de incubação. Os autores observaram que a presença da bactéria *E. faecium* diminuiu o número de pintos positivos para *S. Enteritidis*, indicando que a colonização *in ovo* de probiótico tem o potencial de ser efetivamente usada para combater infecções bacterianas intestinais.

Triplett et al. (2018) avaliaram a inoculação de várias bactérias com efeito probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* ou *Bifidobacterium animalis*) e diferentes volumes de injeções no âmnio (10^3 cfu, 10^4 cfu, 10^5 cfu, ou 10^6 cfu de bactérias / 50 μ L de diluente) em ovos embrionados de frangos de corte, utilizando sistema de inoculação automatizada. As IOF de *L. acidophilus* e *B. animalis* não causaram impacto negativo sobre as características relacionadas ao nascimento mesmo com o aumento das concentrações. No entanto, o *Bacillus subtilis* apresentou significativa redução na taxa de eclodibilidade nos diferentes volumes injetados, que foram apenas 34%; 6,4%; 1,7% e 48%, de eclosão, respectivamente. Os pesquisadores justificaram que houve competição entre embrião e bactéria, pois o *Bacillus subtilis* é um microrganismo formador de esporos, que secretam bacteriocinas e enzimas digestivas (amilase, proteases, celulose). Durante a esporulação, essas bactérias secretam estes subprodutos que competem pelos mesmos nutrientes que seriam utilizados pelo embrião durante a eclosão. Dessa forma, essa competição afetou negativamente o nascimento. No trabalho, a queda de eclodibilidade deveu-se principalmente aos pintos mortos na bicagem. Os autores justificaram que provavelmente houve insuficiência energética do pintinho no momento da bicagem, visto que a energia pode ter sido desviada também para atender um maior estímulo do sistema imunológico.

Contrariamente, Oladokun et al. (2021), inoculando manualmente 200 μ l de *B. subtilis* (10×10^6 cfu da bactéria/200 μ l de solução salina diluente) no âmnio, aos 18,5 dias de incubação, registraram taxa de eclodibilidade de 90,9%. Os demais parâmetros avaliados, incluindo ovos com mortalidade tardia, peso ao nascer e relação peso do pinto/peso do ovo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com ou sem inoculação de *B. subtilis*. A porcentagem de ovos bicados neste estudo, foi superior para o grupo sem inoculação (6,38%) quando comparada ao uso do probiótico *in ovo* (2,69 %). Castanêda et al. (2021) demonstraram que o

efeito da inoculação de *B. subtilis* sobre a eclodibilidade é dependente do sorotipo utilizado. Os autores relataram que o *B. subtilis* ATCC 9466 não afeta a eclodibilidade, no entanto, o *B. subtilis* ATCC 6051 reduziu esta variável em 17,3%.

Diversas pesquisas relataram não haver efeito negativo da IOF de bactérias benéficas sobre a eclodibilidade, como por exemplo nos achados de Majidi-Mosleh et al. (2017), que injetaram diferentes cepas probióticas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus acidilactici*) (10^7 cfu em 0,5 mL/ovo) e encontraram em todos os tratamentos eclodibilidade superior a 95%. Khaligh et al. (2019) avaliaram *Lactobacillus salivarius* e *L. plantarum* inoculando 0,1 ml da solução contendo 10^9 cfu de cada bactéria. Beck et al. (2019) utilizaram 10^6 cfu/50 μ l de injeção *in ovo* de *L. animalis*, *E. faecium* ou a sua combinação. Skjøt-Rasmussen et al. (2019) trabalharam com $1,4 \times 10^7$ cfu/ovo de *E. faecium* e Alizadeh et al. (2020) inocularam uma mistura de várias cepas de *Lactobacillus* em diferentes concentrações. As inoculações ocorreram entre o 17º e 18º dia nestes experimentos e o local escolhido foi o âmnio. Nenhum dos quatro experimentos citados encontraram diferenças significativas sobre a eclosão.

Estudos com o intuito de avaliar características morfofisiológicas também foram realizados, como o de Castanêda et al. (2020) que demonstraram que a IOF automatizada, diretamente na cavidade amniótica, com várias concentrações de um probiótico à base de *E. faecium* (GalliPro® Hatch (GH) ($10^5, 10^6, 10^7$ cfu GH/50 μ l e 50 μ L de vacina de Marek) no 18º dia de incubação, resultou em aumento do peso do baço em todas as concentrações estudadas quando comparadas ao grupo controle (somente vacina de Marek). De acordo com os autores, a detecção antecipada de uma “bactéria” poderia resultar numa aceleração da maturação do sistema imune, sendo o aumento do peso do baço um fato promissor para a proteção precoce contra doenças na primeira semana pós-eclosão. Foram observados no dia 0 a 7 após a eclosão, aumento no peso da moela, duodeno, jejuno, íleo e ceco em todas as doses de probiótico testadas. Aumento do comprimento do jejuno, íleo e ceco, também foram observados, exceto para a menor dosagem do probiótico. Os pesquisadores explicaram que a modulação intestinal obtida com o probiótico pode ter resultado em uma aceleração da absorção do saco vitelino, sendo que as alterações na morfologia intestinal podem ter causado melhor absorção de nutrientes, resultando em melhor desempenho na primeira semana de criação.

Dunislawska et al. (2021) avaliaram as alterações do proteoma do fígado de galinhas, em resposta à IOF de 0,2 ml de *Lactobacillus plantarum* e rafinose, diretamente na câmara de ar, no 12º dia incubação. Os autores relataram que a maioria das proteínas alteradas neste estudo está presente nas mitocôndrias hepáticas e que as principais vias metabólicas de produção de energia no fígado de frangos podem ter sido aceleradas, refletindo na expressão de proteínas relacionada a cadeia transporte de elétrons, ciclo de Krebs e síntese de ATP. Além disso, foi observada diminuição da expressão da proteína de choque térmico 70 (HSP70) nos fígados das aves que receberam o tratamento em comparação ao controle.

A IOF no saco vitelino, com 200 µl de *Bifidobacterium bifidum* ATTC 29521 (5×10^9 e 1×10^7 cfu) e *Bifidobacterium longum* ATTC 15707 (5×10^9 e 1×10^7 cfu) no 17º dia de incubação foi investigada por El-Moneim et al. (2019). Os autores acompanharam a criação dos frangos de corte e relataram melhora da conversão alimentar em todos os grupos injetados durante o período de 1 a 35 dias de vida. Foi observado aumento significativo na altura da vilosidade e na relação altura da vilosidade/profundidade da cripta ileal em todos os grupos que receberam as cepas probióticas. Neste estudo as características hematológicas e bioquímicas avaliadas não foram afetadas, assim como também não houve alteração na função hepática e renal das aves.

Alizadeh et al. (2021) avaliaram a IOF (10^6 ou 10^7 cfu/100 µl/ovo, no saco vitelino) ao 18º dia de incubação e a administração oral nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de criação, de uma variedade de *Lactobacilos*. De acordo com os autores, a inoculação de (10^7 cfu) *in ovo* associada com a suplementação oral, apresentaram maior expressão de citocinas no baço e na Bursa de Fabricius, além de aumentar a porcentagem de células T CD4+ e CD4+ CD25+ no baço. Em conclusão, os autores afirmaram que a inoculação de *Lactobacilos* pode desencadear resposta imune inata e adaptativa, proporcionando proteção precoce aos recém eclodidos.

2.3.1.2. Prebióticos e simbióticos *in ovo*

Atualmente os prebióticos são definidos como “ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios à saúde e bem-estar do hospedeiro” (SHEHATA et al., 2021).

Os prebióticos mais estudados para suplementação *in ovo* são galactooligosacarídeos (GOS), frutanos (frutooligosacarídeos e rafinose), mananoligosacarídeos (MOS) e inulina (BOGUCKA et al., 2016; BERROCOSO et al., 2017; SLAWINSKA et al., 2019). Esses carboidratos fibrosos não são hidrolisados pelas enzimas digestivas endógenas de animais monogástricos como as aves e, assim, percorrem intactos até o intestino grosso e ceco, onde são hidrolisados por bactérias que convertem esses prebióticos em fonte de energia (DANKOWIAKOWSKA et al., 2019).

Os mecanismos de ação dos prebióticos mais citados na literatura incluem substrato para induzir o crescimento de bactérias benéficas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus spp.*, que geram metabólitos importantes como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e são absorvidos pelo hospedeiro (OLADOKUN; ADEWOLE, 2020). Além disso, esses ácidos orgânicos podem alterar o pH intestinal e limitar o crescimento de patógenos (RICKE et al., 2020). Os prebióticos agem também como estimuladores do sistema imunológico, atuando indiretamente em componentes inespecíficos e específicos (macrófagos e linfócitos B e T) da resposta imune, resultando em melhor defesa contra infecções virais e bacterianas (ABD EL-HACK et al., 2017).

Bednarczyk et al. (2016) inocularam *in ovo*, usando sistema automático, três prebióticos durante o desenvolvimento embrionário: (DiNovo[®]) um extrato de beta-glucanos; (Bi2tos[®]), um trans-galacto-oligosacarídeos (GOS); e um oligossacarídeo da família da rafinose, extraído de sementes de tremçoço (*Lupinus luteus*). Todos os prebióticos melhoraram significativamente o ganho de peso nas primeiras 3 semanas de vida, assim como o consumo e a conversão alimentar, em comparação com o grupo controle.

Berrocoso et al. (2017) conduziram uma pesquisa em ovos embrionados de frangos de corte, utilizando três níveis de solução de rafinose (1,5, 3,0 e 4,5 mg em 0,2 mL de diluente aquoso) que foram injetadas na câmara de ar no 12º dia incubação e um controle sem injeção. Os autores demonstraram que as diferentes concentrações do prebiótico não apresentaram efeitos significativos no peso corporal à eclosão e aos 21 dias de idade. Os pesos relativos dos órgãos digestivos, como proventrículo e moela, e peso de músculo peitoral e coxa, também não foram afetados. A altura das vilosidades e a razão entre a altura das vilosidades e a profundidade da cripta dos pintos de um dia aumentaram linearmente com doses

mais altas de rafinose, entretanto não houve efeito na profundidade da cripta aos 21 dias de criação. Quando utilizado 4,5 mg de rafinose, houve aumento significativo da expressão gênica de *CD3* e *ChB6*, que estão associados à atividade de células T e células B.

Angwech et al. (2019) conduziram experimento inoculando na câmara de ar de ovos embrionados de frangos de corte, ao 12º dia de incubação, 200uL de solução salina fisiológica contendo um prebiótico comercial (trans-galactoligossacarídeos Bi2tos®) na dose de 3,5mg/embrião. Os pesquisadores concluíram que a utilização de prebiótico *in ovo*, sozinho ou combinado com antibiótico pós eclosão, reduziu a replicação de coccídios que foram induzidos pela infecção natural por *Eimeria*, assim como reduziu a gravidade das lesões intestinais, quando comparados ao grupo controle não injetado.

De acordo com Shehata et al. (2021), a administração *in ovo* de prebióticos pode modular a microbiota intestinal na fase inicial de vida. A união de prebióticos e probióticos são definidos como simbióticos e atuam sinergicamente para melhorar a saúde intestinal do hospedeiro (HUYGHEBAERT et al., 2011).

Calik et al. (2017) inocularam manualmente simbióticos contendo inulina e *Enterococcus faecium* por via intra amniótica no 17º dia de incubação e posteriormente utilizaram o mesmo simbiótico na dieta dos frangos de corte. Os autores demonstraram que a administração de simbiótico *in ovo* não afetou a eclodibilidade, o peso à eclosão e os pesos dos órgãos. Entretanto, foi observado efeito positivo na conversão alimentar de 1 aos 42 dias de idade para as aves do tratamento que receberam apenas o simbiótico *in ovo*. Não houve efeito de interação sobre o desempenho das aves entre os tratamentos *in ovo* e da dieta durante os diferentes períodos experimentais. Porém, essa combinação elevou significativamente as populações bacterianas benéficas de *Lactobacillus* no 21º de criação e a concentração de butirato cecal ao final do experimento.

2.3.1.3. Carboidratos *in ovo*

O ovo apresenta baixos valores de carboidratos, não mais que 1%, sendo que apenas 0,3% de glicose livre é presente na gema. Os demais carboidratos podem ser encontrados ligados às proteínas e aos lipídios (CAMPOS et al., 2011; DAMASCENO et al., 2017). Dessa forma, os carboidratos estão sendo pesquisados

como fonte para a produção de glicose no período pré-natal, visando melhorar o aporte deste nutriente, principalmente no estágio final do desenvolvimento embrionário (BRANJA et al., 2014; BERROCOSO et al., 2017; KANAGARAJU; RATHNAPRABA et al., 2019; NEVES et al., 2020). Estes pesquisadores relatam que, aumentando a energia disponível para o embrião, elevam-se as reservas de glicogênio que serão utilizadas no momento da eclosão, podendo favorecer a diminuição da utilização de proteínas musculares para obtenção de energia. Além disso, esses carboidratos aumentam a ação das enzimas presentes no intestino e conseqüentemente, promovem maior capacidade de digestão e de absorção dos nutrientes. Em conjunto, é observado que os carboidratos aumentam os níveis de insulina, o que favorece maior estímulo à proliferação das células intestinais (JIA et al., 2011).

Estudos foram conduzidos utilizando glicose, sacarose, maltose e dextrina isolados (ZHAI et al., 2011 a,b,c; SALMANZADEH et al., 2012; SHAFEY et al., 2012) ou em combinação com outros nutrientes (CHEN et al., 2010; RASHTI et al., 2018). Inoculando dextrina e HMB em solução salina, Kornasio et al. (2011) observaram aumento na reserva de glicogênio, peso corporal e peso do músculo peitoral no período pré e pós eclosão. Retes et al. (2018) explicaram que a inoculação de carboidratos exógenos como fonte de energia pode melhorar os níveis de glicogênio hepático e muscular, reduzindo a necessidade de produção de glicose via gliconeogênese, evitando assim a mobilização de proteínas para obtenção de energia.

Zhai et al. (2011a) testaram a inoculação de soluções de carboidratos (250 mg/mL de glicose, frutose, sacarose, maltose ou dextrina) com volumes de 0,1, 0,4, 0,7 ou 1,0 ml aos 18º de incubação, por meio de sistema de injeção automatizada. As concentrações de glicogênio e glicose no fígado embrionário (ao 19º de incubação) foram aumentadas por todas as soluções, exceto pela combinação de glicose e dextrina. O teor de gordura hepática foi reduzido, com o uso de todas as soluções de carboidratos, exceto pelo tratamento contendo apenas dextrina. Os autores concluíram que para obter uma eclosão de 90%, o volume de injeção não poderia exceder 0,4 mL para frutose ou sacarose e 0,7 mL para glicose, maltose ou dextrina.

Carboidratos combinados com outros nutrientes, como por exemplo, monohidrato de creatina (CMH) foram pesquisados por Zhang et al. (2016). Os autores avaliaram a inoculação na cavidade amniótica de 0,4 mL de uma solução contendo 25 mg de glicose, individual ou associada com 6 mg CMH, no 17,5º dia de

incubação, utilizando também um controle negativo sem inoculação e um controle positivo com injeção de 0,4 mL de diluente. Os autores demonstraram que os tratamentos avaliados não influenciaram a eclodibilidade nem a duração da incubação. A inoculação de glicose com CMH elevou as concentrações de glicogênio hepático e glicose em embriões com 19,5 dias de incubação. Também foi observado que a combinação de glicose e CMH aumentou 1,56% o peso corporal relativo ao peso do ovo, e aumentou o ganho de peso corporal dos pintos na primeira semana (0 a 7 dias) em 4,47 g quando comparado ao controle não injetado. Neste estudo, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para peso ao nascer, relação peso do pinto/peso do ovo e YFBM (peso corporal livre de gema). Anteriormente, Zhai et al. (2011b) relataram que a inoculação *in ovo* de 1,2 mL de solução contendo (0,30 g/mL de glicose em solução salina 0,85%) injetado no âmnio durante o 18,5º dia de incubação, apresentou diminuição de YFBM e eclodibilidade (75,9%).

Alguns estudos também demonstraram resultados positivos com a inoculação de glicerol *in ovo* devido a função de proporcionar aumento da glicose e das reservas de glicogênio dos embriões (SUNNY; BEQUETTE, 2011; HU et al., 2017), como também apresentarem melhorias nas condições do epitélio intestinal dos pintos recém eclodidos (NEVES et al., 2016). Dal Pont et al. (2019) testaram a inoculação de glicerol, no 17º dia de incubação, com doses de 6 ou 12 mg/ml em ovos leves e pesados, oriundos de duas idades de matrizes (32 e 60 semanas). Os autores relataram que as variáveis eclodibilidade, mortalidade embrionária e número de pintos prematuros não foram afetadas pelos tratamentos avaliados. Independente do peso do ovo, os pintos de matrizes jovens aumentaram o consumo de ração e o ganho de peso aos 7 dias de idade quando comparados aos provenientes das matrizes velhas.

Neves et al. (2020) administraram 0,5 ml de solução contendo 10 nmol/mL de glicerol (GLY) e 100 ng/mL de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) individualmente ou associados, no 17,5º dia de incubação, diretamente no líquido amniótico de embriões de frangos de corte. Os autores demonstraram que o tratamento com GLY apresentou maior altura de vilosidades (282µm) e profundidade de criptas (64µm) à eclosão, e maior altura de vilosidades no íleo (513µm) aos 7 dias de idade. O peso relativo do fígado na eclosão foi maior em todas as soluções testadas. Não foi observado neste estudo alteração na glicemia dos pintos com a inoculação de diferentes soluções, mesmo com a redução da atividade da frutose 1,6

bifosfato fosfatase, observado nos tratamentos com GLY, IGF-I e GLY + IGF-I. Além disso, o maior consumo de ração, ganho de peso e a melhor conversão alimentar foram obtidos aos 14 dias de criação no tratamento com IGF-I. As soluções inoculadas não promoveram efeitos sobre a eclodibilidade e composição da carcaça de frangos de corte.

2.3.1.4. Aminoácidos *in ovo*

Ao longo dos anos, os benefícios da IOF de aminoácidos, como por exemplo, Treonina, L-arginina, L-lisina, L-leucina, foram relatados por diversos pesquisadores, indicando melhora na morfologia intestinal (EBRAHIMI et al., 2017; KERMANSHAHI et al., 2016), ganho de peso e melhora na conversão alimentar (AZHAR et al., 2016), aumento do peso de órgãos linfóides pós eclosão (TOGHYANI et al., 2019), como também, maior termotolerância (HAN et al., 2020).

A IOF de L-arginina (Arg) é bem conhecida pelas suas atribuições fisiológicas e seu potencial no desenvolvimento intestinal e função imunológica. A Arg proporciona melhora do estado energético e conseqüentemente aumenta o desempenho de crescimento dos frangos de corte. Ademais, regula o metabolismo de nutrientes por meio da liberação hormonal, potencializando o desenvolvimento destes animais (YU et al., 2018a, b). O efeito da IOF de Arg sobre o ganho de peso corporal aos 7 e 21 dias pós eclosão foi relatado por Gao et al. (2017) ao inocular 1% deste AA em frangos de corte.

Dai et al. (2020) realizaram uma pesquisa com IOF manual de L-arginina no âmnio (2, 6 ou 10 mg em 0,1 mL de solução), um controle injetado com solução salina e um grupo controle sem injeção. Os autores demonstraram que a IOF de 10mg de Arg originou o maior peso dos pintos aos 21 dias (183,85 g), em comparação ao grupo não injetado (174,60 g). Além disso, o peso do duodeno aumentou linearmente nos pintos aos 3 dias de idade, e o peso do jejuno aos 14 dias de idade, nos grupos tratados com Arg. A composição do microbioma cecal e a colonização de bactérias benéficas foram aceleradas ao inocular este aminoácido nos tratamentos com 6 e 10 mg. Omidi et al. (2019) também observaram aumento de lactobacilos cecais (9,44 cfu/g), redução de *Escherichia coli* (5,73 cfu/g) e coliformes (5,92 cfu/g) em frangos de corte aos 30 dias de idade, quando utilizaram

inoculação de 0,5% de Arg no líquido amniótico, no 14º dia de incubação, em relação ao grupo controle (sem injeção e com injeção de água destilada).

Miri et al. (2022), investigaram o efeito de baixas temperaturas (ET) durante o desenvolvimento embrionário e a inoculação *in ovo* de 1% de Arg no 17,5º dia de incubação, em conjunto com a suplementação de 0,6 g/kg de ácido guanidinoacético (GAA) na dieta de frangos. Foram demonstrados efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário, menor mortalidade dos embriões e maior YFBM na eclosão, com a combinação de baixa ET e IOF de Arg. Além disso, os autores evidenciaram que a associação de IOF de Arg e GAA apresentaram efeito sinérgico na aquisição de tolerância ao frio em frangos de corte.

Outro aminoácido utilizado na nutrição *in ovo* é a L-glutamina por exercer funções importantes no metabolismo de proteínas e carboidratos. A L-glutamina atua na síntese de glicogênio no fígado, doação de grupos amina para a síntese de outros aminoácidos, aumenta a síntese de proteína e diminui a degradação de proteína no músculo. Além disso, é precursor da prolina, necessária para a formação do tecido conjuntivo (GRODZIK et al., 2013). Reicher et al. (2022) demonstraram o efeito da glutamina sobre a reconstituição da mucosa intestinal, principalmente porque esse aminoácido é considerado o principal substrato energético para células de proliferação rápida, como enterócitos intestinais e linfócitos ativados.

Grodzik et al. (2013) demonstraram que a glutamina (Gln) associada com nanopartículas de diamante (ND) contribuiu para o rápido crescimento e maturação das células musculares, em especial no músculo peitoral de embriões de galinha, quando estes receberam 0,3ml de solução com ND, Gln e Gln/ND (50 mg/L) injetados na câmara de ar no primeiro dia de incubação.

Reicher et al. (2022) avaliaram os efeitos da inoculação *in ovo* de L-glutamina (Gln) na morfologia e função dos enterócitos e o seu potencial sobre a maturação do intestino delgado. No 17º dia de incubação, foram inoculados 0,6 mL de solução de Gln (1% em NaCl 0,4%) ou NaCl (0,75%), no líquido amniótico. Os pesquisadores demonstraram que a administração de Gln promoveu o aumento de 20% dos enterócitos e microvilosidades jejunais pós eclosão (dias 3 e 7 de criação) quando comparado ao grupo controle não injetado. Além disso, a expressão de SGLT-1 (Sodium-Glucose Co-Transporter) responsável pelo transporte de glicose para o interior da célula, apresentou aumento de 57% no sétimo dia pós eclosão, enquanto a expressão do grupo NaCl e controle não diferiram entre si. Dessa forma,

a Gln melhorou o potencial de absorção de glicose, como também de di e tripeptídeos por meio da regulação positiva da expressão de Pept-1 (di-tri Peptide transporter 1) após a eclosão. Em estudo anterior e complementar (REICHER et al., 2021), os autores observaram no 19º dia de incubação, aumento de 40% (Gln) e 19% (NaCl) na contagem total de células das vilosidades do intestino delgado dos embriões, em comparação com o tratamento controle.

2.3.1.5. Vitaminas *in ovo*

A nutrição materna é a principal fonte de vitaminas para o embrião, entretanto, fatores ligados a suplementação ineficiente dessas substâncias na dieta ou a utilização de vitaminas de baixa qualidade podem resultar em deficiências que levam à mortalidade durante o período médio ou final do desenvolvimento embrionário (GOEL et al., 2013). A deficiência de vitaminas durante o desenvolvimento do embrião também pode provocar deformidades como: membros encurtados e torcidos, vísceras expostas, protrusões desorganizadas no cérebro, bicos pequenos ou altos, corpo curto e degeneração. As vitaminas A, D e E são essenciais para potencializar a imunocompetência das aves, possibilitando melhor eficiência alimentar e conseqüentemente ótimo crescimento (CAMPOS et al., 2011).

Goel et al. (2013) suplementaram *in ovo* vitaminas A, B1, B2, B6 e vitamina E, no 14º dia de incubação, para avaliar a eclodibilidade, o crescimento pós-eclosão, a imunocompetência e os perfis bioquímicos sanguíneos. Os autores concluíram que os frangos que receberam a suplementação *in ovo* com vitamina B1 e B2 obtiveram maior peso corporal, e que as vitaminas A, B1, B6 e E modularam a imunidade em frangos de corte. Liu et al. (2016) inocularam aos 11 dias de incubação uma solução salina de ácido fólico em níveis de 50, 100 e 150 µg no saco vitelino de frangos de corte por meio de injeção manual. O tratamento contendo 150 µg/dose aumentou a expressão do IGF2 (fator de crescimento semelhante à insulina 2), apresentando grande capacidade de promover o crescimento durante o período embrionário como também no período pós-eclosão.

O colecalciferol (vitamina D3) exerce função principal no metabolismo ósseo, sendo diretamente responsável pelo desenvolvimento e crescimento esquelético. O embrião metaboliza a vitamina D presente na gema do ovo para a formação do esqueleto da ave, ou seja, esta vitamina participa da regulação do

metabolismo do cálcio (BRITO et al., 2010; CASTRO, 2011). Os resultados obtidos por Bello et al. (2013, 2014a,b,c, 2015) inoculando vários níveis de 25-hidroxicolecalciferol em ovos embrionados de frango de corte no 18º dia de incubação, por meio de injeção automatizada, demonstraram que a administração *in ovo* de 25(OH)D₃ não causou efeitos prejudiciais na eclodibilidade. Nos níveis de 0,30 a 1,20µg de 25(OH)D₃, houve elevação das concentrações séricas de 25(OH)D₃ em embriões aos 19 dias de incubação (BELLO et al., 2013). Além disso, a injeção *in ovo* de até 1,20µg dessa vitamina não afetou a sobrevivência ou o desempenho dos pintos após o nascimento (BELLO et al., 2014). Quando comparado esse efeito entre machos e fêmeas, Bello et al. (2015) evidenciaram que a dose de 0,60 µg de 25(OH)D₃ eliminou as diferenças de cálcio na gema associadas ao sexo do embrião, aumentando a porcentagem de cálcio no saco vitelino de ambos os machos e fêmeas.

Fatemi et al. (2020) estudando a inoculação *in ovo* de vitamina D₃, 25 hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃) e um tratamento controle apenas com diluente, em ovos de matrizes Ross 708[®], observaram que a mortalidade embrionária final, o consumo de ração e a taxa de conversão alimentar foram menores para o tratamento contendo 25 hidroxicolecalciferol. Em estudo similar, Fatemi et al. (2021) investigaram os efeitos da inoculação de 50 µl de diluente contendo 2,4µg de vitamina D₃ ou 2,4µg de 25-hidroxivitamina D₃ (25OHD₃), e a combinação entre eles (2,4 µg de D₃ + 2,4 µg de 25OHD₃). Os autores avaliaram o rendimento de carne de peito, incidência da miopatia conhecida como “peito amadeirado” (woody breast myopathy - WBM) e desempenho de frangos de corte alimentados com dietas restritas em Ca e P disponíveis. Foram demonstrados que a IOF de 25OHD₃ aumentou o rendimento de carne de peito (27,9%) e diminuiu a severidade de WBM dos frangos aos 40 dias, em comparação com as aves do tratamento D₃+25OH₃ ou controle (diluente).

A vitamina E (VE) tem funções importantes no organismo das matrizes pelo efeito antioxidante, possibilitando melhorar taxas de eclosão de ovos férteis e consequentemente a qualidade dos pintinhos (URSO et al., 2015). Araújo et al. (2019) investigaram a inoculação de VE e seus efeitos sobre a incubação, estado oxidativo de pintos recém-eclodidos e os resultados iniciais de desempenho. Foi inoculado *in ovo* 0,5 de mL de óleo de girassol com diferentes concentrações de VE (0,0, 27,5, 38,5, 49,5 e 60,4 UI) no 17,5º dia de incubação, por meio da cavidade amniótica. Os resultados de eclodibilidade foram superiores quando elevaram as

concentrações de VE, principalmente nos níveis de 49,5 UI (88,89%) e 60,4 UI (92,32%) comparado ao grupo controle (86,04%). Foram constatados menor janela de nascimento, pintinhos com maior comprimento e aumento na altura das vilosidades do duodeno no tratamento que recebeu 60,4 UI de VE, em comparação aos demais tratamentos. Além disso, esta concentração proporcionou maiores valores de CAT (enzimas antioxidantes) (36,1 U/mg) e proteínas totais (1605,9 mg/mL) no fígado de pintos recém eclodidos.

A vitamina C (ácido ascórbico) também é amplamente estudada na nutrição *in ovo* por apresentar diversas funções biológicas importantes. Possui ação anti stress em altas temperaturas (KHAN et al., 2012; JANG et al., 2014), antioxidante (EL-SENOUSEY et al., 2018), tem função imunológica (JENA et al., 2013; SGAVIOLI et al., 2019) e podem participar como cofator enzimático em várias reações metabólicas no organismo animal, sendo importante no processo de desmetilação ativa do DNA e de histonas (YOUNG et al., 2015). Também foi demonstrado que a vitamina C aumentou a expressão gênica da proteína de choque térmico 60 (HSP60), proteína 1 relacionada ao frizzled secretada (SFRP1) e piruvato desidrogenase quinase (PDK4), resultando em menor estresse térmico (ZHU et al., 2019).

Pesquisas inoculando ácido ascórbico *in ovo* resultaram em aumento da eclodibilidade (SOLTANI et al., 2019; ZHU et al., 2020). Um experimento foi realizado por Nowaczewski et al. (2012), com inoculação diretamente na câmara de ar de 3 e 6 mg de ácido ascórbico dissolvido em 0,1 ml de solução, em diferentes períodos de incubação (13, 15 e 17 dias). Os pesquisadores verificaram aumento da eclodibilidade no tratamento que recebeu 6 mg de ácido ascórbico, no 15º dia de incubação, quando comparado ao grupo controle.

Zhang et al. (2019) investigaram os efeitos da injeção *in ovo* de diferentes dosagens de ácido L-ascórbico sobre o desempenho pós eclosão, características de carcaça, capacidade antioxidante plasmática e qualidade da carne de frangos de corte. Os ovos receberam inoculação diretamente na cavidade amniótica no 17º dia de incubação, contendo 3, 6, 12 ou 36 mg de L-ascórbico por meio de sistema semi-automatizado de injeção. Os autores sugeriram que a injeção *in ovo* dessa vitamina nas dosagens de 3 a 12 mg, tem efeitos positivos duradouros no crescimento pós-eclosão, desenvolvimento muscular e capacidade antioxidante de frangos de corte.

A fim de compreender a capacidade antioxidante, estado imunológico e o desempenho dos frangos pós-eclosão, Zhu et al. (2020) inocularam 3 mg de vitamina C no saco vitelino de embriões de frangos de corte aos 11 dias de incubação. Os autores observaram aumento significativo no teor plasmático de vitamina C dos pintos recém-eclodidos que receberam a inoculação durante a incubação (10,09µg/ml) quando comparados ao tratamento NC (controle com soro fisiológico) (5,13µg/ml). As aves também foram analisadas quanto ao parâmetro capacidade antioxidante total (T-AOC), que aumentou significativamente aos 42 dias de idade (5,28 U/ml), quando comparada ao grupo controle (3,75 U/ml). Também foi observado maior produção de imunoglobulinas e atividade de lisozima aos 21 dias após a eclosão, no tratamento com vitamina C *in ovo*. Adicionalmente, a taxa de eclodibilidade (93,0%) foi superior quando comparada ao grupo controle (74,1%). Nesse estudo, a expressão de citocinas pró inflamatória e anti-inflamatória foram eficientes para reduzir o estado de estresse do baço dos frangos aos 42 dias de criação.

Em outro estudo mais recente, Zhu et al. (2021) também demonstraram que 3 mg de vitamina C inoculada diretamente no saco vitelino ao 11º dia de incubação, aumentou a eclodibilidade e diminuiu a mortalidade embrionária quando os embriões foram submetidos ao estresse térmico no 20º de incubação. Houve aumento do nível plasmático de vitamina C nos pintos recém eclodidos e foram encontrados maior conteúdo de vitamina C no fígado, rim e cérebro.

Diferentes estratégias de inoculação de vitaminas associadas ou não a outros compostos têm mostrado resultados positivos para os embriões e conseqüentemente para os frangos na fase adulta, como foi demonstrado por Alizadeh et al. (2022) que administraram vitamina A (90 µmol/ovo), vitamina D (0,6 µg/ovo) e *Lactobacilos* (10⁷ UFC/ovo) isolados ou em combinação, no 18º dia de incubação, diretamente na cavidade amniótica. Os autores observaram que a expressão de citocinas Th1 (IFN-γ e IL-12) e Th2 (IL-13) na Bursa de Fabricius foi maior para os embriões que receberam apenas vitamina A *in ovo*. Essas moléculas são consideradas importantes para mediações de respostas imunes e inflamatórias. Os autores também demonstraram que a inoculação de *Lactobacilos* probióticos com vitamina A aumentou sinergicamente os títulos séricos de anti-SRBC (*sheep red blood cells*), os níveis de anti-KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), imunoglobulinas IgY e IgM, no sétimo dia após a imunização dos frangos (que ocorreram aos 14 e 21 dias após a

eclosão). No entanto, neste estudo não foi observada diferença na resposta de anticorpos a diferentes antígenos, quando foi injetado vitamina D isolada ou em combinação com *Lactobacilos*.

2.3.1.6. Minerais *in ovo*

A principal fonte dos minerais Fe, Zn, P, Cu, e Mn para o embrião são provenientes da gema, enquanto o albúmen é a principal fonte de Na e K e a casca a principal fonte de Ca (YAIR; UNI, 2011). Os minerais estão envolvidos em diversas funções no organismo: participam de processos metabólicos pois fazem parte de estruturas de enzimas e proteínas, atuam na manutenção do sistema imunológico e da secreção de hormônios (TORRES; KOVER, 2018). Durante a segunda semana de incubação os embriões mobilizam em torno de 90% do total de cobre, zinco e manganês (YAIR; UNI, 2011). As ausências de minerais durante o desenvolvimento embrionário e nos primeiros dias após o nascimento podem prejudicar o desenvolvimento ósseo e conseqüentemente, a formação do esqueleto durante o crescimento, provocando danos locomotores (YAIR et al., 2013, 2015).

Experimentos conduzidos por Oliveira et al. (2015a,b) estudaram os efeitos da injeção automatizada *in ovo* no 17º dia de incubação contendo os microminerais Zinco (Zn), Manganês (Mn) e Cobre (Cu). As variáveis analisadas foram eclodibilidade, tempo de retenção pós-eclosão, tempo de retenção (TR) na percentagem de cinzas ósseas (PCO) e concentração de minerais na tíbia de frangos de corte. Foram definidos 4 tratamentos, sendo o tratamento 1 sem injeção, o tratamento 2 apenas com injeção de diluente, o tratamento 3 recebeu injeção de diluente contendo 0,181 (Zn), 0,087 (Mn) e 0,010 (Cu) (mg/ml), e os ovos do tratamento 4 foram inoculados com diluente contendo 0,544 (Zn), 0,260 (Mn) e 0,030 (Cu) mg/ml. A eclodibilidade foi significativamente mais baixa no grupo que recebeu a maior concentração de minerais. Foi justificado que esta alta concentração interferiu na embriogênese por causar desequilíbrio mineral no âmnio. Além disso, os embriões de ovos do tratamento 4 tiveram PCO significativamente maior em comparação com os outros tratamentos. No primeiro dia pós-eclosão as concentrações de manganês na tíbia foram superiores em ambos os grupos de tratamento com minerais, em comparação aos dois grupos controle. No 7º dia de criação, os níveis mais altos de minerais inoculados apresentaram maiores

concentrações ósseas de manganês e maiores concentrações ósseas de zinco aos 21 dias, comparado com o grupo controle.

Peebles et al. (2021) avaliaram os efeitos IOF de microminerais orgânicos (0,0816 mg de zinco; 0,0390mg de manganês e 0,0054mg de cobre) e o tempo entre o nascimento e a alimentação (HT) sobre a temperatura corporal diária pós eclosão (0 a 39 dias de idade) em frangos de corte Ross 708[®]. Os autores demonstraram que não houve interação significativa entre os tratamentos nem efeito sobre a temperatura corporal das aves.

Uma pesquisa foi conduzida por Joshua, Valli e Balakrishnan (2016) para elucidar os efeitos da inoculação *in ovo* de zinco (20, 40, 60 e 80 µg/ovo), cobre (4, 8, 12 e 16 µg/ovo) e selênio (0,075, 0,15, 0,225 e 0,3 µg/ovo). No 18º dia de incubação, os minerais foram inoculados na cavidade amniótica e posteriormente foi avaliado a eclodibilidade e desempenho pós eclosão de frangos de corte. De acordo com os autores, não foram observadas diferenças na eclodibilidade, peso do ovo e peso ao nascimento entre todos os minerais e concentrações avaliadas. A melhor eficiência alimentar foi evidenciada quando foram inoculados níveis de 40, 4 e 0,225 µg/ovo, de zinco (2,16), cobre (2,46) e selênio (2,51), respectivamente.

Biria et al. (2020), ao suplementar *in ovo* nanopartículas de óxido de zinco (50, 75 e 100 ppm) diretamente na câmara de ar no primeiro dia de incubação, observaram melhor taxa de eclodibilidade com o uso dos minerais (em torno de 62%) quando comparado ao grupo controle (58,81%). No entanto, as taxas de eclodibilidade dessa pesquisa foram 20% menores em comparação ao estudo anterior de Bakyaraj et al. (2012), onde os autores relataram a eclodibilidade de 81,3% quando inocularam *in ovo* selênio (0,3 µg), zinco (80 µg), cobre (16 µg) e manganês (120 mg/ovo) na cavidade amniótica, no 18º dia de incubação.

2.3.1.7. Importância, perspectivas e limitações da nutrição *in ovo*

A administração *in ovo* de nutrientes ou substâncias é amplamente discutida na avicultura moderna e tornou-se ferramenta essencial que deve ser adequada para atender as exigências nutricionais e modular a saúde intestinal de embriões e pintinhos geneticamente melhorados. Essa tecnologia também tem demonstrado ser promissora em substituição aos antibióticos, que atualmente são considerados

impróprios para o uso em animais ao redor do mundo (PEEBLES, 2018; LEÃO et al., 2021).

Pesquisas relataram os efeitos benéficos que a inoculação *in ovo* pode proporcionar aos embriões, como por exemplo: a antecipação da maturidade do trato gastrointestinal, estabelecimento precoce da microbiota benéfica intestinal, melhorias do sistema imunológico e expressão dos genes relacionados a imunidade, aumento do aporte energético e das reservas de glicogênio hepático e muscular, maior capacidade de digestão e absorção, crescimento da deposição de músculo e peso corporal, como também maior eficiência alimentar pós-eclosão e rendimento de carcaça. Por outro lado, a capacidade epigenética desta tecnologia na modulação da expressão de genes no metabolismo das aves ainda tem sido pouco explorada.

Apesar da nutrição *in ovo* ser uma prática bastante promissora e revelar bons resultados em experimentos, muitas vezes não são técnicas colocadas em prática pelas empresas produtoras de pintos de um dia, devido às incertezas e dificuldades de implantar essa tecnologia em escala industrial (JHA et al., 2019). Este método ainda demanda de ajustes e reconhecimentos de efeitos que sejam eficazes em larga escala, usando sistemas de injeção automatizados.

Adequar o momento ideal da inoculação nos ovos embrionados com o período que ocorre a vacinação *in ovo* no incubatório, que é realizado durante o processo de transferência dos ovos para o nascedouro, por exemplo, ainda é um dos principais fatores limitantes para o sucesso da implementação nessas empresas (OHTA; KIDD, 2001; JOCHEMSEN; JEURISSEN, 2002). Outro fator relevante é a ausência de consenso sobre a quantidade e quais nutrientes devem ser inoculados, pois as máquinas vacinadoras são programadas para injetar entre 0,05 a 0,10 mL. As mudanças causadas ao se perfurar os ovos e mudanças no ambiente da câmara de ar, a compatibilidade com a vacina e diluente e a osmolaridade das substâncias, também são fatores que devem ser considerados pois, em altas concentrações, a solução nutritiva pode provocar desequilíbrios osmótico, ácido-base e provocar a morte do embrião (UNI; FERKET, 2003).

É necessário que pesquisas futuras se concentrem nas adequações da técnica para a utilização da suplementação *in ovo* em larga escala. Adicionalmente, um campo interessante a ser explorado é a combinação de diversos nutrientes para realizar uma suplementação efetiva e que tenha consequências positivas a longo prazo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas fases experimentais. Na primeira fase, foram realizadas avaliações da qualidade dos ovos incubáveis e do processo de incubação. A segunda fase experimental foi caracterizada pelas análises de qualidade e parâmetros morfofisiológicos dos pintos de um dia.

Os protocolos experimentais utilizados estão de acordo com as diretrizes da Universidade Federal da Bahia e do Comitê de Ética do Uso de Animais – CEUA protocolo nº 21/2022.

3.1. Primeira fase experimental

3.1.1. Local

A primeira fase experimental foi realizada no incubatório comercial da Granja Asa Branca, localizada no município de São Cristovão – SE.

3.1.2. Ovos

Foram realizadas duas incubações. Em cada incubação, foram utilizados 4320 ovos incubáveis de matrizes pesadas da linhagem Cobb® com idade de 35 semanas, provenientes do Matriseiro da Granja Asa Branca, localizado no município de Estância-SE. Utilizou-se ovos de dois galpões, pertencentes à segunda coleta do mesmo dia. Imediatamente após a coleta, ainda na granja, os ovos destinados à incubação foram desinfetados pelo método de fumigação com paraformaldeído na concentração de 10g/m³ e posteriormente transportados para o incubatório em veículo climatizado, com temperatura inferior ao ponto zero fisiológico, considerado aproximadamente 21°C.

Na chegada ao incubatório realizou-se a seleção dos ovos, eliminando aqueles considerados não incubáveis (sujos, trincados, quebrados, pequenos e deformados). Em seguida os ovos incubáveis foram colocados em bandejas de incubação com capacidade para 96 ovos cada. Um total de 45 bandejas foram selecionadas e identificadas aleatoriamente, sendo 15 bandejas identificadas como tratamento C

(Controle), 15 bandejas foram identificadas como tratamento V (Vacinação *in ovo*) e 15 bandejas identificadas com tratamento P (Vacinação *in ovo* + Probiótico *Bio21*[®]). Uma bandeja por tratamento foi selecionada ao acaso para análise dos ovos e as 14 restantes para incubação (1440 ovos por tratamento).

Nestas condições, os ovos dos respectivos tratamentos permaneceram na sala de armazenamento por três dias, com médias de temperatura e umidade relativa do ar (UR) de 20°C e 80%, respectivamente.



Figura 1 – Distribuição dos ovos incubáveis de acordo com os tratamentos.

Tratamento C (Controle - etiqueta Preta) - embriões que não receberam nenhum tratamento no momento da transferência; Tratamento V (Vacina - etiqueta Azul) correspondente aos embriões que receberam vacinação *in ovo* contra a doença de Marek; e Tratamento P (Vacinação *in ovo* + Probiótico *Bio21*[®] - etiqueta vermelha) - embriões que foram vacinados e receberam probiótico *in ovo*.

Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.2.1. Variáveis analisadas em ovos

Foram selecionados ao acaso 40 ovos de uma bandeja por tratamento para análises de peso dos ovos e seus componentes, espessura de casca e peso específico. Estas análises foram realizadas com o objetivo de conferir a homogeneidade dos ovos incubados em ambos os tratamentos e assegurar que as características estruturais eram compatíveis com a idade da matriz.

3.1.2.2. Peso específico dos ovos

O peso específico foi determinado por meio de soluções com cinco diferentes densidades, de acordo com Olsson (1934). No preparo das soluções, foram utilizados cinco baldes graduados com 10 L de água em temperatura ambiente. Em cada um destes baldes foi adicionado cloreto de sódio em quantidades para se obter as soluções com as densidades de 1.070, 1.075, 1.080, 1.085 e 1.090. As densidades das soluções foram confirmadas com um densímetro de massa específica (Incoterm® 1,000/1,100:0,001) e monitoradas a cada 10 minutos. Os dados de peso específico foram registrados em números absolutos.

3.1.2.3. Peso do ovo e seus componentes

Para as avaliações de peso dos ovos, gema, albúmen e casca, os ovos foram pesados em balança analítica digital (0,001g) Mater® modelo AY200 e, após a quebra dos mesmos, foram separados o albúmen, a gema e a casca. A separação da gema foi realizada manualmente e o resíduo da clara, aderida a gema, foi removido com o auxílio de papel absorvente. Após este procedimento, as gemas foram pesadas individualmente (Figura 2). As cascas, depois de lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de albúmen, secaram a temperatura ambiente durante 24 horas, e foram pesadas individualmente. O peso do albúmen foi obtido pela diferença entre o peso do ovo inteiro e o peso da gema mais o peso da casca.



Figura 2 - Peso do ovo e seus componentes. Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.2.4. Espessura de casca

A espessura da casca dos ovos foi mensurada por meio de um micrômetro digital (Digimess® resolução 0.001mm, 0-25mm) em fragmentos retirados das regiões apical, equatorial e basal, a partir dos quais se obteve a espessura média por ovo. Para todas as mensurações foram retiradas as membranas. Os ovos utilizados nesta análise foram os mesmos utilizados nas análises anteriores (Figura 3).



Figura 3 – Medição da espessura da casca dos ovos. Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.3. Pré-incubação e incubação dos ovos

Após o período de armazenamento e antes do início da incubação, realizou-se um pré-aquecimento dos ovos durante 8 horas. A sala de pré-aquecimento foi mantida em temperatura média de 28°C e UR média de 55%. Após este período e imediatamente antes da entrada dos ovos na incubadora, cada bandeja com 96 ovos foi pesada de acordo com os tratamentos.

Para a incubação foi utilizada uma máquina incubadora modelo CASP CM 125 HD de estágio múltiplo, com capacidade para 124.416 ovos e controle digital de temperatura, umidade e viragem.

A máquina de incubação foi regulada para manter a temperatura de bulbo seco em 37,8°C (100,04°F) e temperatura de bulbo úmido em 28,9°C (84°F).

Foi preconizado que todas as bandejas de todos os tratamentos fossem distribuídas aleatoriamente somente do lado esquerdo da máquina para que todas as bandejas recebessem as mesmas condições ambientais. As bandejas dos tratamentos

foram colocadas na parte superior, no meio e na parte inferior, desprezando as duas primeiras e as duas últimas fileiras da máquina. Os demais espaços da máquina foram preenchidos com ovos que não fizeram parte do experimento, porém de idades de matrizes e lotes semelhantes para assegurar o equilíbrio da incubadora.

Para controle da temperatura embrionária, entre o 10º e o 18º dia de incubação, foram realizadas uma vez ao dia, mensurações da temperatura da casca dos ovos através do aparelho Thermoscan® Braun modelo IRT 4520. Foram selecionados dois ovos no centro de cada bandeja do experimento, após confirmação da fertilidade dos mesmos por meio de ovoscopia.

3.1.4. Ovos inférteis e embriões com mortalidade inicial observada na ovoscopia

No 12º dia de incubação, todos os ovos do experimento foram analisados em um ovoscópio. Os ovos claros foram retirados e quebrados, sendo identificados os ovos inférteis e aqueles com embriões mortos. Os dados foram registrados para posteriormente serem incluídos na análise final de mortalidade embrionária e fertilidade.

3.1.5. Vacinação *in ovo*

No 18,5º dia de incubação, todas as bandejas do experimento foram novamente pesadas, e posteriormente foram encaminhadas para a sala de vacinação *in ovo*. Nas bandejas identificadas como tratamento V, o processo de vacinação *in ovo* ocorreu conforme rotina normal do incubatório. Foi utilizada máquina de vacinação *in ovo* modelo Embrex Inc® NO. IOM. 007, porte médio. Antes de iniciar a vacinação *in ovo*, a máquina foi lavada e desinfetada em quatro etapas diferentes: inicialmente foi utilizado detergente neutro para remoção de resíduos e logo após foi colocado desinfetante. Em seguida a máquina foi enxaguada com água e álcool e por último foi usada água destilada para remover qualquer resíduo dos produtos utilizados. Após a lavagem e desinfecção, foi realizado o teste das injetoras, para garantir que todos os bicos de injeção estivessem funcionando normalmente (Figura 4).



Figura 4 – Testes de injeção da vacinadora *in ovo*. Fonte: Arquivo pessoal.

Após o teste de injeção, ocorreu a preparação das vacinas na sala de vacinação. As vacinas de Marek (HVT) associadas com Gumboro da marca Biovet[®] foram armazenadas em temperatura de -180°C dentro de um botijão contendo nitrogênio líquido. As ampolas de vacina, antes de serem injetadas no diluente, foram colocadas em banho-maria até a obtenção de temperatura ambiente. Ao atingir a temperatura ambiente, as vacinas (no tratamento V - Vacinação *in ovo*) e as vacinas mais 50 ml de probiótico (no tratamento P - Vacinação + Probiótico) foram injetados nos diluentes por meio da utilização de uma seringa (Figura 5). Em seguida, foram transportadas para a sala de vacinação *in ovo* em uma bolsa térmica contendo gelo (Figura 6).

O probiótico utilizado foi o produto comercial (Bio21[®] da empresa Biocamp[®]) que é composto de 21 cepas bacterianas com os seguintes níveis garantidos: uma cepa de *Bacillus subtilis* ($1,0 \times 10^8$ UFC/g), seis cepas de *Enterococcus faecium* ($6,0 \times 10^8$ UFC/g), uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* ($1,0 \times 10^8$ UFC/g), uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ($1,0 \times 10^8$ UFC/g), três cepas de *Lactobacillus plantarum* ($3,0 \times 10^8$ UFC/g), cinco cepas de *Lactobacillus reuteri* ($5,0 \times 10^8$ UFC/g), uma cepa de *Lactobacillus salivarius* ($1,0 \times 10^8$ UFC/g), e três cepas de *Pediococcus acidilactici* ($3,0 \times 10^8$ UFC/g).



Figura 5 – Preparação da bolsa com probiótico. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 6 – Bolsa térmica contendo gelo para preservação da qualidade das substâncias. Fonte: Arquivo pessoal.

Ao iniciar a vacinação, foram desprezados os primeiros jatos, com a finalidade de eliminar qualquer resíduo de produtos que ainda estejam na máquina, a fim de evitar contaminação. Através de uma agulha acoplada em cada bocal injetor, cada ovo recebeu a solução (Vacina + Diluente) ou (Vacina + Probiótico + Diluente) em quantidade de 0,05 ml, que foi programada para ser injetada diretamente na cavidade amniótica dentro do ovo (Figura 7).



Figura 7 – Processo de inoculação *in ovo*. Fonte: Arquivo pessoal.

Os ovos foram transferidos para bandejas de eclosão, identificadas de acordo com os tratamentos e as suas respectivas bandejas de incubação. Os ovos das bandejas de incubação que foram identificados como tratamento C não foram vacinados, mas permaneceram na sala de vacinação por igual período e foram transferidos para as bandejas de eclosão previamente identificadas, da mesma forma que descrito em relação ao tratamento V e P.

Após o processo de inoculação, um ovo por bandeja foi coletado em todos os tratamentos para averiguação do estágio de desenvolvimento embrionário (entre 18 e 19 dias). Também foi possível confirmar que a inoculação estava corretamente depositada no fluido amniótico e que não houve punção nos tecidos.

3.1.6. Transferência para o nascedouro

Os ovos dos tratamentos foram colocados em um nascedouro modelo CASP 125 HT 21, com capacidade para 20.736 ovos. Nesta máquina o termostato foi programado para manter a temperatura do bulbo seco em 36,8°C (98,2°F) e a

temperatura do bulbo úmido em 25,8°C (78,4°F). A temperatura média da sala de nascedouro manteve-se em 24,9 °C e a UR em 67,7%.

No nascedouro, as bandejas de eclosão foram distribuídas aleatoriamente conforme os tratamentos (Figura 8). O carrinho pertencente ao experimento foi posicionado na parte da frente do nascedouro, para facilitar o manejo durante a contagem dos pintos durante a janela de nascimento. O carrinho e a máquina utilizada para o experimento foram preenchidos com ovos dos mesmos lotes de matrizes e com a mesma idade de incubação, os quais não fizeram parte desta pesquisa.



Figura 8 - Distribuição das bandejas dentro do nascedouro. Fonte: Arquivo pessoal.

3.1.7. Dispersão do nascimento

O momento em que os ovos foram colocados na incubadora, foi denominado hora zero. A partir de 462 horas de incubação, com intervalo de 6 em 6 horas, os pintos nascidos em cada bandeja dos tratamentos foram registrados para posterior avaliação da “janela de nascimento”, que compreendeu o momento entre os primeiros e os últimos pintos nascidos.

3.1.8. Nascimento dos pintos

A retirada dos pintos dos nascedouros ocorreu com 504 horas (21 dias) de incubação. No final da incubação os pintos nascidos foram colocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos. Todas as caixas foram encaminhadas para sala de pintos, onde foi contabilizado o total de pintos mortos, o escore de umbigo e presença de anormalidades, como canela vermelha, ponto vermelho no bico, caixa craniana aberta, cavidade abdominal aberta, pintos desidratados, balofos e aleijados. Após a contagem de pintos nascidos, foram retirados ao acaso uma amostra de 28 pintos por tratamento (2 pintos por bandeja) para as análises posteriores.

3.1.9. Análises de rendimento de incubação

3.1.9.1. Perda de peso dos ovos durante o período de incubação

A perda de peso dos ovos foi determinada pela pesagem individual de todas as bandejas de cada tratamento antes dos ovos serem colocados na incubadora e no momento em que foram transferidos para o nascedouro; quando foram calculados os pesos médios dos ovos. O percentual de perda de peso dos ovos foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Perda de peso} = \frac{(\text{Peso dos ovos na incubação} - \text{Peso dos ovos na transferência})}{\text{Peso dos ovos no início da incubação}} \times 100$$

3.1.9.2. Mortalidade embrionária e fertilidade (%)

O número de ovos não eclodidos de cada máquina foi registrado, sendo os mesmos examinados para se determinar o percentual de ovos inférteis, ovos bicados (pintos que não conseguiram eclodir) e a fase em que ocorreu a mortalidade embrionária, incluindo a observação sobre mau-posicionamento e anormalidades

morfológicas e conformacionais, de acordo com Barbosa (2011). A caracterização dos ovos não eclodidos foi a seguinte:

- Ovos inférteis;
- Ovos com embriões mortos no início da incubação (0 a 7 dias);
- Ovos com embriões mortos entre 8 a 18 dias de incubação;
- Ovos com embriões que morreram entre 19 a 21 dias;
- Ovos bicados com embriões vivos ou mortos;
- Ovos contaminados (ovos nos quais os embriões morreram devido à contaminação microbiana);
- Ovos desidratados (devido a trincas da casca ocorridas durante o processo).

Após esta análise, os dados de mortalidade inicial e infertilidade obtidos aos 12 dias na ovoscopia foram somados, e então o percentual total de mortalidade embrionária foi calculado sobre o número de ovos férteis. A fertilidade do lote foi obtida através da fórmula (100% - % de ovos inférteis).

3.1.9.3. Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis (%)

Os ovos inférteis foram identificados no momento da ovoscopia e no embriodiagnóstico. A taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis foi determinada, dividindo-se o número total de pintos nascidos pelo número de ovos férteis, e multiplicando-se por 100.

3.2. Segunda fase experimental

3.2.1. Variáveis Analisadas em Pintos

3.2.1.1. Peso dos pintos no momento da eclosão

Os pintos nascidos foram colocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e repetições. Dois pintos de cada caixa (repetição por tratamento) foram selecionados aleatoriamente e pesados individualmente em balança eletrônica, com sensibilidade de 0,001kg (Toledo® 9094) para obtenção do peso médio.

3.2.1.2. Comprimento do pintinho (cm)

Todos os pintinhos de cada tratamento foram medidos por uma régua considerando a ponta do bico até o dedo do membro inferior direito (a escolha do membro inferior é de acordo com o avaliador, portando todos os animais tiveram as medidas pela perna esquerda) desconsiderando a unha (Figura 9).



Figura 9 – Análise do comprimento de pintinho. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.1.3. Escore de umbigo

Os pintinhos foram classificados quanto à cicatrização do umbigo, onde receberam escores: escore 1 - umbigo fechado e área do umbigo limpa; escore 2 - botão negro até 2 mm no umbigo ou presença de fio negro; escore 3 - botão negro maior que 2 mm ou umbigo aberto.

3.2.1.4. Hemogasometria

Após o nascimento, os 28 pintos por tratamento foram selecionados aleatoriamente para a obtenção do sangue por meio da veia jugular. Foram coletados 0,25mL de sangue em seringa de 1mL e agulha 30G. Imediatamente após cada coleta individual, cerca de 100 μ L de sangue foram inseridos nos cartuchos Cartridge CG8+[®] e direcionados ao aparelho analisador clínico portátil i-STAT (Figura 10) que automaticamente fizeram a leitura dos parâmetros mencionados: pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂), pressão parcial de oxigênio (pO₂), sódio (Na),

potássio (K), cálcio ionizado (iCa), bicarbonato (HCO_3), saturação de oxigênio (sO_2), hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb).

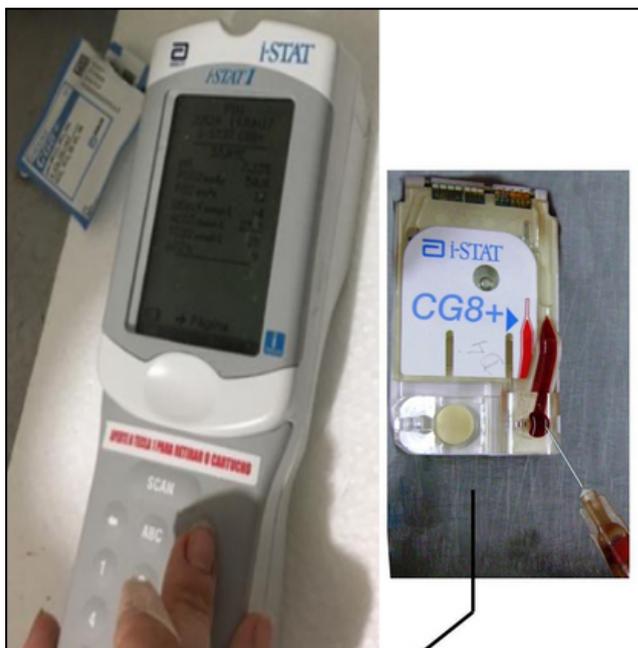


Figura 10 - Aparelho e cartuchos utilizados nas análises dos parâmetros fisiológicos. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.1.5. Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia

Para avaliar o status fisiológico dos pintos de um dia, as mesmas amostras de 28 pintos por tratamento foram utilizadas. Os pintinhos foram eutanasiados por deslocamento cervical e as amostras de sangue coletadas. 14 amostras de cada tratamento foram coletadas para a produção de soro e 14 amostras para a separação do plasma. Imediatamente após a coleta, para a separação do soro ou plasma, as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos tipo Vacutainer[®], sendo que aqueles tubos destinados à coleta de plasma eram heparinizados. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 3000rpm. As alíquotas com soro ou plasma foram transferidas através de micropipetas para novos tubos *ependorff* devidamente identificados de acordo com os tratamentos e foram conservadas a -20°C até ser iniciado o processamento das amostras.

As determinações de glicose¹, lactato², ácido úrico³ (mensurados no plasma), triglicerídeos⁴, colesterol total⁵ e suas frações colesterol HDL⁶, LDL⁷ e VLDL⁸ como

também as enzimas ALT⁹, AST¹⁰ e GGT¹¹ (mensurados no soro), foram realizadas em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca GlobalTechnology[®], utilizando-se kits comerciais em comprimento de onda apropriados.

¹ Glicose K082. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

² Lactato K084. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: UV enzimático.

³ Ácido úrico K139. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

⁴ Triglicérides K117. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

⁵ Colesterol total K082. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

⁶ Colesterol HDL enzimático K015. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

^{7,8} Para a determinação das concentrações do Colesterol VLDL e LDL foram calculadas segundo a equação de Friedewald descrito na bula do ⁶Colesterol HDL Enzimático, onde:

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicérides} / 5$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

⁹ Transaminase AST K034. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: colorimétrico.

¹⁰ Transaminase ALT K035. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: colorimétrico.

¹¹ Gama GT Cinético K080. Bioclin[®]. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: cinético.

3.2.1.6. Peso dos órgãos e Peso do pinto sem o saco vitelino

Os mesmos pintos que foram amostrados para análises sanguíneas, tiveram seus órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago, intestinos, bursa, baço e saco vitelino) coletados para que pudessem ser pesados individualmente em balança analítica de 0,001g (Figura 11). A abertura da cavidade abdominal se iniciou pelo orifício umbilical com exposição de todos os órgãos. Primeiramente se retirou o saco residual da gema. Os órgãos abdominais foram retirados em conjunto e depois foram separados, sendo coletado o fígado, o proventrículo + moela e depois os intestinos. O coração também foi coletado, finalizando-se com a retirada dos pulmões e bursa. Esses órgãos foram expressos de forma absoluta e também de forma relativa em relação ao peso do corpo sem o saco vitelino (YFBM – *yolk free body mass*), que foi obtido pela subtração entre o peso do pinto e o peso do saco vitelino residual. O percentual de saco vitelino residual foi obtido em relação ao peso corporal.



Figura 11 – Órgãos separados para pesagem individual. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.1.7. Glicogênio hepático

A determinação do glicogênio hepático foi realizada conforme a metodologia descrita por Bidinotto et al. (1998). A amostra de fígado de cada pintinho identificado conforme tratamento foi pesada na proporção de 100 a 110mg e logo em seguida, a amostra foi transferida para tubo de ensaio onde foi adicionado 1,0 ml de KOH 6,0N, sendo incubada por 5 minutos em banho maria a 100°C para sua completa dissolução. Dissolvido os tecidos completamente, 125 μ l deste extrato foi transferido para um novo tubo previamente identificado e adicionado 1,5ml de etanol e 50 μ l de K₂SO₄ 10%, seguidos de agitação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado re-suspendido em 2 ml de água destilada. Após a mistura realizou-se a transferência de 100 μ l da amostra, 250 μ l de fenol e 1 ml de H₂SO₄ para parar a reação. Posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca GlobalTechnology® a 480 nm. O conteúdo de glicogênio está expresso em μ moles de glicosil-glicose/mg de tecido total.

3.2.1.8. Histomorfometria intestinal

Para a avaliação da histomorfometria do intestino delgado foram utilizados 10 pintos de cada tratamento escolhidos aleatoriamente. Após deslocamento cervical e retirada do órgão, segmentos de aproximadamente 2 cm do duodeno, jejuno e íleo foram coletados. O duodeno foi coletado a partir do piloro até a porção distal da alça de Meckel, o jejuno foi separado considerando a porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel e o íleo foi recolhido entre o divertículo de Meckel e a porção inicial dos cecos.

A técnica utilizada foi descrita por Prophet et al. (1992). As amostras foram lavadas com água destilada, armazenadas em potes previamente identificados contendo formol tamponado a 10% para posterior análise histológica. As amostras foram processadas no laboratório de Patologia Veterinária HOSPMEV/UFBA no município de Salvador - Bahia.

Foram realizados três processos de preparação de tecido para a análise histológica: desidratação, diafanização e inclusão. Inicialmente as amostras foram seccionadas desprezando as bordas de cada segmento a fim de eliminar possíveis fragmentos dilacerados, em seguida foram lavadas em água corrente com a finalidade de retirar o fixador utilizado. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série graduada de banhos crescentes de álcool 70% a 100% de concentração, diafanizado em duas trocas em xilol. Em seguida foi realizada a infiltração das amostras em parafina numa temperatura de 58-60°C. Após esse processamento, os tecidos foram emblocados em parafina utilizando um módulo de inclusão em parafina aquecida e posteriormente resfriados em uma placa de refrigeração. Os blocos de parafina contendo as amostras foram cortados em uma espessura de 4µm utilizando um micrótomo rotativo de parafina equipado com navalhas descartáveis, obtendo-se uma série de cortes.

Em cada lâmina histológica foram colocados 2 cortes semi seriados, sendo que entre um corte e o subsequente foram desprezados aproximadamente 10 cortes. As lâminas foram levadas para a estufa a uma temperatura de 58°C para que ocorresse o processo de desparafinização. Após esses procedimentos as lâminas seguiram para o processo de coloração. As amostras receberam um banho quente e um banho frio de xilol, para a remoção da parafina na lâmina e no tecido; e foram

seguidas por banhos decrescentes de álcool para reidratação das amostras. A seguir, foram submetidas à coloração por hematoxilina, lavadas em água corrente e posteriormente coradas com eosina.

As visualizações das lâminas foram feitas em microscópio biológico trilocular de ótica finita acromático Global Optics[®], com as lentes objetivas de 40x para observação. Para cada animal, foram observadas 20 vilosidades íntegras de cada segmento (duodeno, jejuno e íleo) mensurando a altura da vilosidade (a partir da base superior da cripta até o ápice da vilosidade), a largura da vilosidade e profundidade de cripta (medidas entre as vilosidades da base inferior até a base superior da cripta). As fotos foram realizadas com a câmera acoplada ao microscópio, e por meio do aplicativo Image J[®] (National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi possível mensurar as vilosidades intestinais.

3.2.1.9. Osmolalidade das soluções e do plasma de pintos

As análises de osmolalidade foram realizadas por meio do aparelho Osmômetro microprocessado PZL-1000[®] (Figura 12) nas substâncias Probiótico Bio21[®], Diluente Biovet[®] e Vacina Marek-Gumboro C Biovet[®]. No momento da vacinação *in ovo*, as substâncias preparadas para as doses individuais aplicadas *in ovo* (Vacina+Diluente) e (Vacina+Probiótico+Diluente) também foram coletadas para a mesma finalidade. 10 repetições de cada substância foram utilizadas. Posteriormente, esta análise também foi realizada no plasma sanguíneo de 28 pintos de cada um dos três tratamentos



Figura 12 – Osmômetro microprocessado PZL-1000[®]. Fonte: Arquivo pessoal.

3.3. Análise Estatística

O experimento foi realizado e repetido (duas incubações consecutivas). Para a obtenção dos dados desse estudo, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado.

Nas análises realizadas em ovos (peso específico, peso total, componentes e espessura da casca), foram utilizados 40 ovos por tratamento, sendo o ovo considerado a repetição. Para as variáveis de rendimento de incubação foram utilizadas 14 bandejas por tratamento, sendo a bandeja com 96 ovos considerada a repetição. Nas análises de qualidade e parâmetros morfofisiológicos dos pintos de um dia, foram utilizados 28 pintinhos por tratamento, e o pintinho considerado a unidade experimental. Para as variáveis de histomorfometria foram analisadas 10 repetições por tratamento, sendo o pinto a repetição. Dentro de cada repetição foram avaliadas 20 alturas de vilos, largura e profundidade de cripta, por segmento (duodeno, jejuno e íleo).

Os dados normais e homogêneos foram submetidos às análises de variância (ANOVA, teste F) e as médias quando significativas foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se o nível de significância de 5%.

Todas as variáveis foram analisadas com o procedimento GLM ou MIXED do pacote de software SAS 9.2 (SAS Institute, 2009). Para todas as variáveis foi considerado efeito significativo com valor de probabilidade em $p \leq 0,05$.

O modelo geral usado para todos os dados foi:

$$Y_{ijkl} = \mu_i + \text{TRAT}_j + e_{ijkl},$$

Onde μ é a média geral, TRAT_i é o tratamento usado e e_{ijkl} , é o erro. As médias foram obtidas por meio do LSMEANS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às características dos ovos de cada tratamento estão descritos na Tabela 1. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os ovos que foram separados e identificados para compor cada tratamento ($p \geq 0,05$). As variáveis peso do ovo, peso da gema, peso do albúmen, peso da casca, relação gema/albúmen, espessura de casca e peso específico foram realizadas antes da incubação com o intuito de verificar a homogeneidade das amostras, garantindo que os ovos de todos os tratamentos apresentassem as mesmas características e qualidade. Outro cuidado importante a ser considerado em experimentos de incubação artificial, é a utilização de ovos após a primeira coleta do dia, evitando que a amostra contenha ovos que por ventura foram postos no dia anterior, pois podem ter seu estágio de desenvolvimento embrionário modificado pelo período de postura e/ou temperatura no galpão (MARTINS, 2017).

Tabela 1 - Características estruturais dos ovos incubados no experimento de acordo com os tratamentos.

Variáveis	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Peso ovo (g)	66,45	65,94	65,67	2,436	0,201
Peso da gema (g)	17,05	17,17	16,99	1,034	0,634
Peso do albúmen (g)	43,57	42,96	42,91	2,139	0,172
Peso da casca (g) ¹	5,82	5,80	5,75	0,457	0,679
Relação gema/albúmen	0,39	0,40	0,39	0,032	0,401
Espessura da casca (mm) ¹	0,42	0,42	0,42	0,041	0,920
Peso específico(g/mlH ₂ O)	1,08	1,08	1,08	0,004	0,744

n= 40 por tratamento e incubação. Casca sem membrana¹. Médias na linha são semelhantes pelo teste F ($p > 0,05$).

Estes resultados demonstram que houve uniformidade da amostra que foi retirada nos galpões e distribuída aleatoriamente entre os três tratamentos. Os valores médios do peso do ovo e seus componentes estão de acordo com a literatura para a idade das matrizes deste estudo (35 semanas) (NANGSUAY et al., 2015, 2016). Uma desigualdade na proporção dos componentes dos ovos, poderia comprometer aspectos fisiológicos da incubação, visto que casca, gema e albúmen são substratos

para reações químicas responsáveis pelo desenvolvimento e eclosão dos pintos (MORAN JR, 2007).

A análise de peso específico e espessura da casca podem ser utilizados como indicadores da qualidade da casca dos ovos que serão incubados. Na prática dos incubatórios comerciais é preconizado como meta que os ovos incubáveis tenham valores de peso específico ≥ 1.080 (ROQUE; SOARES, 1994), o que corresponde aos resultados encontrados neste experimento.

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados de rendimento de incubação. Não houve efeito dos tratamentos em todas as variáveis analisadas ($p > 0,05$). Estes resultados encontrados são relevantes sob o ponto de vista econômico, pois validam a técnica de vacinação *in ovo* e também a inoculação de probióticos durante este procedimento, pois uma queda nos valores de eclosão ou alterações no padrão de mortalidade poderiam tornar questionável a utilização desta técnica juntamente com a inoculação das múltiplas cepas de probióticos associado à vacina de Marek.

Os resultados dos parâmetros perda de peso dos ovos, fertilidade, mortalidade embrionária inicial (0-7d) e mortalidade embrionária média (8-18d) estão dentro da normalidade, e confirmam a homogeneidade das amostras e o controle da condição experimental, pois a administração do produto ocorreu no momento da transferência dos ovos da incubadora para o nascedouro (aos 18,5 dias de incubação).

Tabela 2 - Parâmetros de rendimento de incubação de ovos não inoculados, vacinados *in ovo*, vacinados e suplementados com probiótico *in ovo*.

Variáveis (%)	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Perda de peso	11,61	11,10	11,57	2,434	0,684
Fertilidade	98,50	98,68	98,27	1,204	0,452
Eclosão total sobre ovos férteis	92,94	93,79	94,07	2,626	0,249
Mortalidade embrionária total	7,06	6,20	5,93	2,626	0,249
Mortalidade embrionária inicial (0 - 7d)	3,63	3,12	2,74	1,734	0,161
Mortalidade embrionária média (8 -18d)	1,25	0,82	0,86	1,264	0,377
Mortalidade embrionária final (19 - 21d)	1,17	1,33	0,85	1,130	0,282
Bicados vivos ou mortos	1,01	0,93	1,48	1,206	0,187
Mortalidade embrionária final + bicados	2,18	2,26	2,33	1,732	0,946

Expressos em percentagem de ovos férteis (n= 14 bandejas com 96 ovos incubados por tratamento e incubação). Médias na linha são semelhantes pelo teste F ($p > 0,05$).

A ausência de diferença significativa entre os tratamentos, referente aos dados de eclodibilidade sobre os ovos férteis, mortalidade embrionária final (19-21d), ovos bicados e mortalidade embrionária + bicados, indica que a utilização da técnica *in ovo* não influenciou o desempenho zootécnico da incubação. Esses resultados corroboram com os dados encontrados por Majidi-Mosleh et al. (2017) que injetaram no líquido amniótico aos 17 dias de incubação, (10^7 cfu) em 0,5 mL/ovo das cepas probióticas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus acidilactici*). Estes pesquisadores apresentaram resultados de eclodibilidades superiores a 95% em todos os tratamentos. Beck et al. (2019) inocularam 10^6 cfu/50 μ l/ovo de bactérias *Lactobacillus animalis*, *Enterococcus faecium*, e sua combinação, e compararam ao controle (Vacina de Marek), utilizando procedimento de injeção automatizado no âmnio, no 18º dia de incubação. Os autores não observaram impactos negativos relacionados ao rendimento de incubação, e apresentaram resultados de eclodibilidades de (94,62%, 93,24%, 95,52% e 93,37%, respectivamente). Castanêda et al. (2020) demonstraram que a inoculação *in ovo* automatizada, com várias concentrações de um probiótico comercial à base de *E. faecium* (GalliPro® Hatch (GH), associada a vacina de Marek (10^5 , 10^6 , 10^7 cfu GH/50 μ l) no 18º dia de incubação, resultaram em eclodibilidades variando de 92,0% a 94,3% entre os tratamentos, sem diferir estatisticamente do controle (94,0%), que recebeu apenas vacina.

Entretanto, Triplet et al. (2018) demonstraram que as espécies de bactérias podem apresentar efeitos e induzir respostas biológicas diferentes nos embriões. Os autores avaliaram o uso comercial de injeção *in ovo* de várias bactérias com efeito probiótico (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* ou *Bifidobacterium animalis*) e diferentes concentrações no âmnio (10^3 cfu, 10^4 cfu, 10^5 cfu, ou 10^6 cfu de bactérias / 50 μ L de diluente) em ovos embrionados de frangos de corte. As IOF de *L. acidophilus* e *B. animalis* não causaram impacto negativo sobre as características relacionadas ao nascimento mesmo com o aumento das concentrações. No entanto, o *B. subtilis* apresentou significativa redução na taxa de eclodibilidade nos diferentes volumes injetados, que foram apenas 34%; 6,4%; 1,7% e 48%, de eclosão, respectivamente. Os pesquisadores justificaram que houve competição entre embrião e bactéria, pois o *B. subtilis* é um microorganismo formador de esporos, que secretam bacteriocinas e enzimas digestivas (amilase, proteases, celulose). Durante a esporulação, essas bactérias secretam estes subprodutos que competem pelos

mesmos nutrientes que seriam utilizados pelo embrião durante a eclosão. Dessa forma, essa competição afetou negativamente o nascimento. A queda de eclodibilidade, deveu-se principalmente aos pintos mortos na bicagem. Os autores justificaram que provavelmente houve insuficiência energética do pintinho no momento da bicagem, visto que a energia pode ter sido desviada também para atender um maior estímulo do sistema imunológico. No caso de nosso estudo, o produto comercial utilizado continha uma cepa de *B. subtilis* ($1,0 \times 10^8$ UFC/g), mas não houve alteração das variáveis analisadas. Oladokun et al. (2021) inoculando manualmente 200 µl de *B. subtilis* (10×10^6 cfu da bactéria/200 µl de solução salina diluente) no âmnio, aos 18,5 dias de incubação, registraram uma taxa de eclodibilidade de 90,9% corroborando com os resultados desta pesquisa. Os demais parâmetros avaliados, incluindo ovos com mortalidade tardia, peso ao nascer e relação peso do pinto/peso do ovo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com ou sem inoculação de *B. subtilis*. Em outro estudo mais recente, Castanêda et al. (2021) demonstraram que o efeito da inoculação de *B. subtilis* e o impacto sobre a eclodibilidade pode ser dependente do sorotipo utilizado. Os autores relataram que o *B. subtilis* ATCC 9466 não afeta a eclodibilidade, no entanto, o *B. subtilis* ATCC 6051 reduziu este parâmetro em 17,3%. Sendo assim, a influência do sorotipo e o mecanismo de ação de cada cultura probiótica sobre a eclodibilidade também merece investigação adicional.

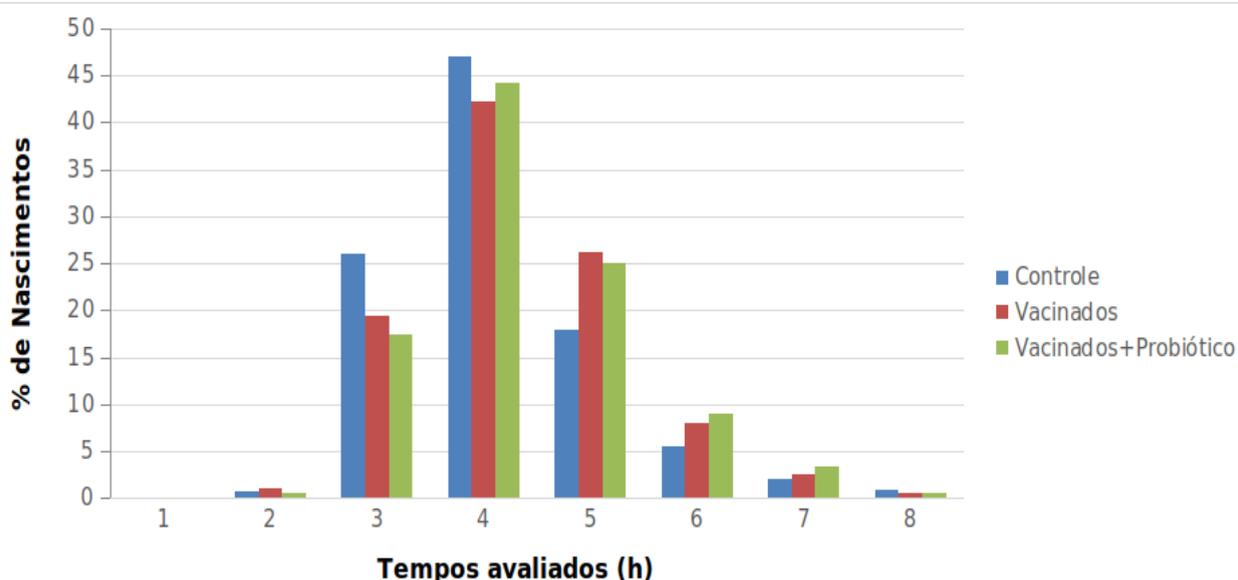
Vários fatores podem conferir baixa eclodibilidade após a inoculação *in ovo*, incluindo, volume da solução, local da injeção, momento da aplicação, como também as características e concentrações das cepas utilizadas (LEÃO et al., 2021). Além disso, um fator que influencia a eclodibilidade e é pouco avaliado nos trabalhos *in ovo* é a osmolaridade das soluções a serem injetadas. Após a adição do probiótico, influências negativas poderiam estar relacionadas a alterações na osmolaridade tanto da substância inoculada como consequentemente do plasma dos embriões. Nesta pesquisa verificamos que as soluções a serem administradas *in ovo* estavam dentro dos valores sugeridos por pesquisadores e que a osmolaridade no plasma era semelhante estatisticamente (Tabelas 7 e 8, que serão discutidas posteriormente).

Neste experimento, os resultados demonstrados na tabela 2, indicaram que a inoculação *in ovo* com múltiplas cepas destas bactérias benéficas, não prejudica o desenvolvimento embrionário final e nem a capacidade de o pintinho eclodir. Sendo

assim, esses resultados validam a aplicação deste produto em escala comercial, a ser realizado no mesmo momento da vacinação *in ovo* nos incubatórios (entre 18 e 19 dias de incubação).

O tempo médio de nascimento dos pintos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($p>0,05$) conforme demonstrado no gráfico 1. Foram encontrados valores de 480,6h ($\pm 3,5$) para o tratamento controle, 481,8h ($\pm 3,1$) para aqueles vacinados *in ovo* e 482,2h ($\pm 3,5$) para o tratamento vacina *in ovo* + probiótico.

Gráfico 1 - Janela de nascimento dos pintos submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.



Legenda:

O número de pintos está representado pelo eixo y e o tempo de nascimento estão no eixo x.

Tempo de nascimento: 1 =462h; 2 =468h; 3 =474h; 4 =480h; 5 =486h; 6 =492h; 7 =498h; 8 =504h.

*ns = não significativo ($p\geq 0,05$).

Molenaar et al. (2010) estudaram os efeitos que um orifício na câmara de ar poderia causar sobre o desenvolvimento perinatal de poedeiras. Foi verificado maior duração do período entre a bicagem interna e externa da casca ($p\leq 0,05$) em ovos que possuíam o orifício, quando comparados aos ovos controle não perfurados. De acordo com os pesquisadores, o furo realizado na casca promoveu maior pressão de O_2 na câmara de ar e conseqüentemente, menor estímulo para a bicagem, visto que este estímulo ocorre principalmente pela hipóxia causada no embrião no final da incubação. MARTINS (2017), ao comparar a janela de eclosão de pintos de corte vacinados ou não vacinados *in ovo*, também relataram que os embriões vacinados *in*

ovo prolongaram o momento da bicagem externa e eclosão. Além disso, foi encontrado um maior percentual de ovos bicados no tratamento com vacinação *in ovo* (1,57% x 0,52%).

Diante destes fatores, recomenda-se uma análise criteriosa da dispersão do nascimento nos experimentos e nos incubatórios industriais, quando técnicas como vacinação e suplementações *in ovo* são realizadas. Pressupõe-se que uma das razões dos relatos de diminuição de eclosão estejam relacionadas com o momento inadequado de retirada dos pintos dos nascedouros, pois estas técnicas podem ocasionar prolongamento do processo de nascimento.

Os resultados referentes à qualidade dos pintos estão demonstrados na Tabela 3. Verifica-se que não houve efeito dos tratamentos sobre parâmetros de qualidade avaliados ($p>0,05$).

Tabela 3 - Parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.

Variáveis	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Peso do pinto (g)	44,24	44,83	44,44	2,770	0,631
YFBM (g)	40,33	40,35	40,13	2,159	0,889
RY (g)	3,91	4,32	4,00	1,098	0,237
Comprimento (cm)	18,87	18,86	18,69	0,412	0,103
Qualidade de umbigo ¹	1,78	1,73	1,65	0,654	0,691

n= 28 por tratamento e incubação. YFBM (peso do pinto sem o saco vitelino – yolk free body mass); RY (saco vitelino residual). ¹Condição de umbigo, onde 1= bom, 2= moderado, 3= pobre. Médias na linha são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$).

Os resultados de peso médio do pinto no momento da eclosão foram semelhantes entre os tratamentos ($p>0,05$), estão dentro do esperado e de acordo com os achados por Beck et al. (2019), que obtiveram peso ao nascer variando entre 45 e 46 g, quando estudaram o efeito de injeção *in ovo* de *L. animalis*, *E. faecium* ou sua combinação no 18º dia incubação, utilizando vacinação automatizada.

Arreguin-Nava et al. (2019) relataram que a inoculação de probióticos *in ovo* pode influenciar o peso ao nascimento. No experimento destes pesquisadores, foi observado aumento significativo de 19% no peso dos pintos recém eclodidos (47,8 g) ao inocularem no âmnio aos 18 dias de incubação, *B. subtilis* associado a *B.*

amyloliquefaciens, quando comparado ao controle (40,3 g) sem inoculação. Resultados semelhantes também foram observados posteriormente por Arreguin-Nava et al. (2020) após inocular bactérias ácido lácticas.

Os dados da nossa pesquisa não corroboram com os estudos de Arreguin-Nava et al. (2019, 2020), pois não houve aumento do peso médio dos pintos eclodidos no tratamento com a inoculação das múltiplas cepas probióticas no momento da vacinação *in ovo*, entretanto, não encontramos efeito negativo sobre esta variável.

Em nosso estudo não observamos diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para a variável de YFBM e RY demonstrando que independente dos tratamentos, os embriões foram igualmente eficientes na absorção e conversão do saco residual em massa corporal, refletindo também na semelhança dos comprimentos dos pintos entre os tratamentos e na qualidade do umbigo ($p > 0,05$).

Nangsuay et al. (2011) relataram que o YFBM é um parâmetro mais fidedigno quando comparado ao peso bruto do pintinho, pois representa o que realmente foi convertido de nutrientes pelo embrião em massa corporal a partir do saco vitelino. Além disso, o comprimento do pintinho está relacionado positivamente à massa corporal livre de gema na ocasião do nascimento (MEIJERHOF, 2006).

Castañeda et al. (2020), trabalhando com diferentes concentrações de *E. faecium in ovo* aos 18 dias de incubação, encontraram peso relativo de RY menor ($p \leq 0,005$) para todos os tratamentos quando comparados ao controle (inoculados apenas com vacina de Marek). Os autores atribuíram este resultado a modulação intestinal causada pelo probiótico, que resultou em eficiência na absorção do saco vitelino, promovendo aumento no peso e comprimento intestinal.

Um estudo que abordou a inoculação de carboidratos e aminoácidos também traz informações relevantes. Zhang et al. (2016), administrando 25 mg de glicose associada com 6 mg creatina monohidratada (CMH) *in ovo* no 17,5º dia de incubação e comparando a um tratamento controle sem inoculação, encontraram valores médios semelhantes de YFBM. No entanto, os pintos que receberam a substância *in ovo* apresentaram maior saco residual de gema (6,3 g) quando comparado ao controle não injetado (5,7 g). Os autores justificaram que, dependendo do nutriente que é utilizado, os embriões podem absorver e utilizá-los preferencialmente ao invés da absorção primária de nutrientes do saco vitelino.

Os resultados da prevalência de condição de umbigo estão apresentados na Tabela 4. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos para a variável qualidade de umbigo neste experimento, conforme dados das Tabelas 3 e 4.

Tabela 4 - Prevalência da condição de umbigo de pintos recém-eclodidos submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.

Variáveis	Escore 1 (%)	Escore 2 (%)	Escore 3 (%)	Escore 2 + 3 (%)
Controle	34,17	55,00	10,83	65,83
Vacinados <i>in ovo</i>	40,00	50,00	10,00	60,00
Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	40,83	51,67	7,50	59,17
Média (%)	38,33	52,22	9,45	61,67
SEM	13,778	13,194	9,078	13,777
P-valor	0,8755	0,9299	0,9312	0,8755

n= 28 por tratamento e incubação. Condição de umbigo, onde 1= bom, 2= moderado, 3= pobre. Médias na linha são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$)

Segundo Meijerhof (2006, 2009) a má-cicatrização umbilical e o acometimento do saco vitelino residual podem prejudicar significativamente o desempenho pós-eclosão. Desta forma, a condição de umbigo é um parâmetro de qualidade relevante, pois quanto mais próximo do escore 1, mais eficiente é o fechamento da cavidade abdominal. No presente estudo, a utilização do probiótico *in ovo* associado com a vacinação *in ovo* de Marek+Gumboro, não interferiu negativamente nesse parâmetro.

Um estudo conduzido por MARTINS (2017), encontrou que a qualidade de umbigo foi superior para pintos vacinados *in ovo* (score 1,51), quando comparada ao grupo controle não vacinado (score 1,89). A autora hipotetizou que a perfuração na casca provocada pela vacinação *in ovo*, ao modificar a disponibilidade de oxigênio para o embrião e fazer com que estes iniciem o processo de eclosão mais tardiamente, também influencie em maior tempo no período perinatal para o fechamento adequado da cavidade abdominal.

Os resultados do peso de órgãos em valores absolutos e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino encontram-se na Tabela 5. Não foram encontradas diferenças significativas para os valores absolutos das variáveis coração, intestino, pulmão, baço, pâncreas e bursa ($p>0,05$). No entanto, o peso absoluto do fígado e estômago (proventrículo + moela), apresentaram diferenças significativas ($p\leq 0,05$).

As médias do peso do fígado no grupo controle apresentaram pintos com maior peso do fígado, quando comparado com pintos provenientes de ovos que receberam a vacina + probiótico, pintos oriundos de ovos que receberam apenas vacina apresentaram resultados intermediário. Entretanto, o peso relativo do fígado, não diferiu estatisticamente entre os grupos ($P>0,05$).

O peso relativo dos órgãos foi expresso com base no YFBM, considerando o peso da massa corporal desenvolvida durante a incubação, representando um parâmetro mais preciso. Dessa forma, o peso relativo do coração, fígado, intestino, pulmão, pâncreas e bursa foram semelhantes ($p>0,05$) entre os tratamentos, demonstrando que a maturação destes órgãos no período final de incubação não foi alterada em embriões que receberam probióticos *in ovo* associado a vacina de Marek+Gumboro ou naqueles que foram apenas vacinados *in ovo*. Entretanto, o peso relativo do estômago (proventrículo + moela) e baço apresentaram diferenças significativas ($p\leq 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 5 - Peso de órgãos em valores absolutos (g) e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino (%) recém-eclodidos submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.

Variáveis	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Coração (g)	0,295	0,282	0,292	0,032	0,191
Coração (%)	0,730	0,704	0,731	0,080	0,248
Fígado (g)	1,315 ^a	1,163 ^{a,b}	1,124 ^b	0,350	0,040
Fígado (%)	3,283	2,905	2,834	1,004	0,120
Estômago (g)	2,845 ^a	2,641 ^b	2,717 ^{a,b}	0,274	0,004
Estômago (%)	7,014 ^a	6,570 ^b	6,820 ^{a,b}	0,608	0,007
Intestino (g)	1,994	2,058	2,045	0,269	0,534
Intestino (%)	4,974	5,134	5,160	0,696	0,455
Pulmão (g)	0,425	0,413	0,405	0,049	0,211
Pulmão (%)	1,040	1,027	1,036	0,110	0,871
Baço (g)	0,018	0,015	0,018	0,006	0,051
Baço (%)	0,045 ^{a,b}	0,037 ^b	0,049 ^a	0,016	0,010
Pâncreas (g)	0,076	0,075	0,076	0,024	0,944
Pâncreas (%)	0,185	0,186	0,194	0,059	0,790
Bursa (g)	0,066	0,064	0,060	0,015	0,270
Bursa (%)	0,162	0,160	0,154	0,039	0,711

n= 28 por tratamento e incubação. Estômago = proventrículo + moela.

Médias seguidas de letras distintas na linha são diferentes pelo teste Tukey ($p\leq 0,05$).

Para as médias de peso relativo do estômago, que seguiram o mesmo padrão do peso absoluto ($p \leq 0,05$), as aves provenientes do tratamento vacina+probiótico foram semelhante aos tratamentos de vacinação *in ovo* e controle, sendo os mesmos diferentes entre si. A estimulação do desenvolvimento e maturação dos órgãos do sistema digestório acontece pela presença dos nutrientes ingeridos durante o desenvolvimento embrionário e após a eclosão. Uma pesquisa conduzida por Castanêda et al. (2020) demonstraram que a inoculação *in ovo* automatizada com várias concentrações ($10^5, 10^6, 10^7$ cfu GH) de um probiótico à base de *E. faecium* (GalliPro® Hatch (GH), associadas a 50 μ L de vacina de Marek) no 18º dia de incubação, observaram que todas as doses de probióticos aumentaram o peso da moela em comparação ao controle (Vacina de Marek).

Em nosso experimento, quando houve inclusão do probiótico, o peso relativo do baço apresentou-se maior ($p \leq 0,05$) comparado ao tratamento onde só a vacina de Marek foi inoculada, embora não tenha sido observada diferença entre o tratamento controle. Do mesmo modo, Castanêda et al. (2020), encontrou aumento significativo do peso do baço dos pintos em todas as concentrações de probióticos estudadas. Os autores não observaram diferenças do peso da bursa entre todos os tratamentos, assim como no presente estudo.

A microbiota benéfica intestinal é capaz de ativar os tecidos linfóides e produzir aumento na resposta imunológica devido à sua ação antibacteriana, imunomoduladora e também nutricional (KABIR et al., 2009; PENDER et al., 2017). O baço atua diretamente no sistema imunitário, formando os glóbulos brancos, promovendo a liberação de linfócitos B e T, além de outras células linfóides que combatem a infecção e produzem os anticorpos (SLAWINSKA et al., 2014). Recentemente, Alizadeh et al. (2021) avaliaram a administração *in ovo* com variedade de *Lactobacilos*, no saco vitelino, durante o 18º dia de incubação e oralmente, após a eclosão. De acordo com os autores, a inoculação *in ovo* associada a suplementação oral, resultou em maior expressão de citocinas no baço e na bursa de Fabricius, além de aumentarem a porcentagem de células T CD4+ e CD4+ CD25+ no baço. Os autores concluíram que a inoculação de *Lactobacilos* pode desencadear resposta imune inata e adaptativa, proporcionando proteção precoce aos pintos.

Segundo Castañeda et al. (2021), durante as três primeiras semanas após a eclosão, há um *gap* na proteção contra patógenos. Os pintos carregam anticorpos

maternos que conferem certa proteção contra infecções aproximadamente até sete dias após a eclosão, entretanto, o sistema imunológico não está completamente desenvolvido antes dos 21 dias de idade. Dessa forma, após a inoculação de probióticos, pequenas alterações observadas neste órgão durante o desenvolvimento embrionário podem ser promissoras para maiores estudos sobre uma proteção precoce contra patógenos nas primeiras semanas pós-eclosão.

Os valores médios dos parâmetros hemogasométricos de pintos recém eclodidos, estão apresentados na Tabela 6. Não houve efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros hemogasométricos avaliados nos pintos recém-eclodidos ($p>0,05$). Os valores obtidos estão de acordo com os previamente estabelecidos por Everaert et al . (2008) e Barbosa et al. (2014).

Tabela 6 - Parâmetros hemogasométricos de pintos de um dia submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.

Variáveis	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
pH	7,27	7,29	7,29	0,071	0,575
pCO ₂ (mm Hg)	46,46	45,93	44,98	6,070	0,444
pO ₂ (mm Hg)	26,95	28,40	25,00	6,275	0,330
Na ⁺ (mmol/L)	138,85	138,50	138,50	2,603	0,672
K ⁺ (mmol/L)	4,20	4,03	4,11	0,593	0,632
Ica (mmol/L)	1,36	1,35	1,34	0,075	0,476
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	21,55	22,03	21,47	2,521	0,915
sO ₂ (%)	41,75	45,60	37,95	14,941	0,424
Hct (%)	18,59	17,78	18,58	2,226	0,978
Hb (g/dL)	6,32	6,04	6,32	0,766	0,958

n= 28 por tratamento e incubação.

Médias na linha são semelhantes pelo teste F ($p>0,05$).

Com base em nossa revisão de literatura, percebemos uma escassez de experimentos avaliando os parâmetros hemogasométricos e sanguíneos de pintos recém eclodidos após inoculações *in ovo*.

No entanto, para efetivar a utilização de vacinas e nutrientes *in ovo* em escala comercial, faz se necessário estudar as possíveis mudanças que ocorrem no período final do desenvolvimento embrionário e as alterações fisiológicas causadas após a

interação da vacina com os probióticos, para garantir que não há distúrbios na homeostase.

As mudanças na hemogasometria exercem influência direta sobre o status fisiológico do animal, podendo resultar em mudanças no equilíbrio ácido-básico do sangue (YALÇIN et al., 2008; LAKE et al., 2020). A manutenção do equilíbrio tem grande importância fisiológica e bioquímica, visto que a preservação do estado estrutural das proteínas e conseqüentemente o funcionamento ideal das células que constituem o organismo vivo, é influenciada pela concentração hidrogeniônica sanguínea. Desta forma, pequenas variações das concentrações na escala de pH, desviando-se do valor normal para cada espécie, podem causar mudanças acentuadas e até mesmo prejudiciais aos processos orgânicos vitais (MOLENAAR et al., 2008). O pH do sangue das aves varia sob condições fisiológicas, na faixa de 7,20 a 7,36 (FURLAN et al., 1993, 2002; BARBOSA et al., 2014), o que está de acordo com os resultados encontrados neste experimento (7,27 a 7,29).

Além do pH, uma avaliação relevante na hemogasometria é a pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) e $p\text{O}_2$ (pressão parcial de oxigênio). De acordo com Everaert et al. (2007), a $p\text{CO}_2$ é medida pela concentração de CO_2 dissolvida no sangue. Representa o equilíbrio entre a produção de O_2 e a remoção de CO_2 . Se o CO_2 não for eliminado, a reação ocorre no sentido de produção do ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia em H^+ e HCO_3^- e aumenta a quantidade de hidrogênio no organismo, resultando em acidose. A pressão parcial de O_2 é determinada medindo a concentração de O_2 dissolvida no sangue, e como o oxigênio é capaz de se mover a partir do espaço aéreo dos pulmões para o sangue.

O processo de inoculação *in ovo* ocorre no final da incubação entre o 18º e 19º. Nesse período há alta demanda energética e devido a escassez de O_2 nessa fase, o embrião passa a realizar glicose anaeróbica (MORAN JR, 2007). Esse processo desencadeia aumento de lactato favorecendo maior concentração de íons H^+ no sangue, porém o sistema tampão bicarbonato é ativado para evitar a redução do pH (BOUTILIER et al., 1977).

Os sistemas tampão extracelulares constituem a primeira linha de defesa do organismo, pois ocorrem instantaneamente a uma alteração de pH. Eles incluem o HCO_3^- (sistema bicarbonato - ácido carbônico) e as proteínas séricas (como por exemplo, a albumina) (EVERAERT et al., 2008). O HCO_3^- é capaz de doar ou receber íons H^+ , minimizando alterações do pH e deslocando a reação para maior

produção de CO₂ e água, que podem ser eliminados pela respiração (DIBARTOLA, 2000). Os tampões intracelulares, que têm uma resposta mais lenta, incluem os ossos (fosfatos orgânicos) e as proteínas intracelulares (como por exemplo, a hemoglobina-Hb). As mensurações de Hb também são importantes para analisar a capacidade de oxigenação dos tecidos, sendo considerada o segundo tampão mais importante no sangue (FURLAN et al., 2002). Além disso, a mensuração de sO₂ (saturação de oxigênio) tem por finalidade medir a porcentagem de hemoglobinas que está transportando oxigênio (O₂) (WILSON, 2013). De acordo com Furlan et al. (2002), existe uma relação entre hematócrito (Hct) e hemoglobina. O Hct representa a porcentagem da massa de hemácias em relação ao volume sanguíneo (proporção de eritrócitos no sangue). Sintomas como anemia podem ser vistos quando os valores de Hct estão baixos e um valor alto pode ser causado por desidratação ou policitemia (espessamento do sangue).

O balanço de eletrólitos como cálcio ionizado (iCa), sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) no plasma também são importantes para o equilíbrio ácido-básico. A concentração de cálcio do plasma é elevada ao longo da segunda metade da incubação, por consequência da absorção de Ca²⁺, oriundo da casca do ovo. Além disso, o Na⁺ e o K⁺ são íons fundamentais na manutenção da pressão osmótica, controle da passagem dos nutrientes por meio da membrana celular e controle do volume hídrico da célula (BORGES et al., 2003).

Segundo Molenaar et al. (2010), o orifício provocado no ovo para a inoculação da vacina pode provocar algumas alterações metabólicas, já que essa perfuração pode ocasionar uma maior troca de gases entre o embrião e o ambiente externo. Em experimento destes pesquisadores, a perfuração na casca proporcionou aumento da pressão de O₂ na câmara de ar, o que pode ter ocasionado menor estímulo para a bicagem externa, uma vez que este é influenciado pela hipóxia causada no embrião durante o período final da incubação. Em nosso estudo anterior (MARTINS, 2017), o percentual de pintos bicados na incubação com vacinação *in ovo* foi maior ($p \leq 0,05$) em comparação aos pintos não vacinados. Com base nesses achados, e no comportamentos da dispersão do nascimento no presente estudo, sugerimos que os embriões que receberam maior aporte de O₂ em razão da vacinação *in ovo* podem levar mais tempo para nascer, sendo necessária avaliação adequada do tempo de retirada do nascedouro, conforme discutido na avaliação da janela de nascimento, exposta no Gráfico 1.

Os resultados da osmolalidade dos produtos e substâncias inoculadas *in ovo* e do plasma sanguíneo de pintos de um dia estão demonstrados na tabela 7 e 8. Todas as médias de osmolalidade estão dentro da normalidade.

Tabela 7 – Osmolalidade em substâncias e doses individuais utilizadas no experimento.

Substância	mOsmol/Kg
Probiótico Bio21 [®]	332
Diluyente Biovet [®]	108
Vacina Marek-Gumboro C 3000 doses Biovet [®]	2271
Dose individual (<i>in ovo</i>)*	mOsmol/Kg
Vacina+Diluyente	111
Vacina+Probiótico+Diluyente	119

n= 10 por produto e incubação.

*Médias na coluna são semelhantes pelo teste Kruskal-Wallis

No presente estudo os valores das osmolaridades referentes às substâncias utilizadas estiveram dentro do limite sugerido por Uni e Ferket et al. (2003). De acordo com Ferket et al. (2005), as osmolaridades das soluções nutritivas a serem inoculadas *in ovo* não devem ultrapassar 650 mOsm, ou seja, elevadas concentrações das soluções injetadas podem interferir no equilíbrio osmótico do embrião e afetar negativamente o seu desenvolvimento, principalmente no estágio final da incubação, resultando na mortalidade.

Além dos parâmetros hemogasométricos avaliados e a importância destes para o bom funcionamento celular, a melhoria da saúde intestinal por meio da microbiota afeta positivamente o metabolismo de modo geral (Pruszyńska-oszmałek et al. 2015). De acordo com Dankowiakowska et al. (2019), as bactérias produzem vários metabólitos, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ácido láctico, que poderiam influenciar o equilíbrio químico e a homeostase desses embriões. Além disso, subprodutos da microbiota também desempenham papel importante na comunicação intercelular e na transdução de sinal entre a microbiota intestinal e as células hospedeiras. Castañeda et al. (2020) exemplificam que o

Enterococcus faecium, uma espécie comumente utilizada como probiótico, é capaz de alterar a partição e utilização dos carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e lipídios no fígado de frangos de corte por meio do aumento da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo e defesa antioxidante, por isso poderiam interferir nas variáveis fisiológicas analisadas, visto que, as vias metabólicas são interligadas. Portanto, a composição química das soluções utilizadas *in ovo* e as substâncias produzidas pelas bactérias benéficas poderiam modificar o status fisiológico dos pintos no período final da incubação.

Outro fator a ser considerado é a concentração e interação das bactérias probióticas a serem inoculadas com a vacina. Nesse contexto, as respostas positivas não dependem somente da composição da solução e do volume inoculado, mas também da osmolaridade das soluções injetadas na cavidade amniótica durante o processo de vacinação *in ovo* (FERKET et al., 2005).

Robinson (2014) define a osmolaridade, que também é conhecida como concentração osmótica, como a quantidade de partículas de soluto por unidade de volume de solvente. A osmolalidade expressa a quantidade de partículas de soluto por unidade de massa de solvente. A medição laboratorial é feita em osmolalidade, e como as medidas são aproximadamente iguais em soluções diluídas, na prática, são valores intercambiáveis

Portanto, adicionalmente, foi mensurada a osmolalidade do plasma dos pintos de um dia conforme demonstrado na Tabela 8. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Osmolalidade do plasma de pintos de um dia.

Plasma Sanguíneo	mOsmol/Kg
Controle	141
Vacinação <i>in ovo</i>	143
Vacina + Probiótico <i>in ovo</i>	144

n= 20 por produto e incubação.

Médias na coluna são semelhantes pelo teste Kruskal-Wallis.

Mair e Hernandez (2006) propuseram que a osmolalidade sanguínea é fundamentalmente a dosagem de sódio (Na^+) dissolvido no soro. Na^+ é o principal

eletrólito no sangue e funciona com o potássio (K⁺), cloreto e CO₂ (na forma de bicarbonato) para manutenção do equilíbrio ácido-base.

O Na⁺, por ser o principal cátion do líquido extracelular e estar obrigatoriamente acompanhado de um número igual ao dos ânions, cloro e bicarbonato, é o principal responsável pela osmolaridade dos líquidos (BUZZO et al., 2015). Atua na pressão osmótica corporal, atividade elétrica das células nervosas e do músculo cardíaco, permeabilidade celular e absorção dos monossacarídeos e aminoácidos. O potássio (K⁺) é o principal cátion do fluido intracelular, responsável por muitos processos metabólicos, incluindo o balanço osmótico, equilíbrio ácido básico e hídrico corporal. Além disso, o potássio participa no metabolismo protéico e dos carboidratos, integridade da atividade muscular e nervosa. Consequentemente, mudanças no equilíbrio de K⁺ podem afetar as funções celulares e o controle da quantidade de água no meio celular (LUMEIJ, 1985).

Portanto, um desequilíbrio osmótico exerce alterações na membrana citoplasmática e nos mecanismos de absorção e liberação de água, ocasionando nas células a degeneração hidrópica (acúmulo de água no meio intracelular) (SCHMIDT et al., 2007). Dessa forma, considerando os dados obtidos nas Tabelas 6 e 8, reforçam que tanto a vacinação *in ovo* como a inoculação de probiótico associada com a vacina de Marek não provocaram desequilíbrio osmótico nos pintos recém-eclodidos.

Os parâmetros bioquímicos de pintos de um dia estão demonstrados na Tabela 9. Não houve efeito dos tratamentos nos níveis de glicose, glicogênio, ácido úrico, VLDL (Lipoproteína de muita baixa densidade), TGP (Alanina Aminotransferase) e GGT (Gama Glutamiltransferase) ($p > 0,05$).

As variáveis lactato, triglicerídeos, colesterol total, LDL (Lipoproteína de baixa densidade), HDL (Lipoproteína de alta densidade) e TGO (Aspartato Aminotransferase) apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

A avaliação dos metabólitos do sangue pode indicar o estado de funcionamento de órgãos como os rins, fígado, pâncreas, músculos, como também o estado nutricional e fisiológico geral das aves (BARBOSA et al., 2011).

Os teores de glicose circulante e de glicogênio hepático obtidos nesta pesquisa estão de acordo com os encontrados previamente por Barbosa (2011) e Nangsuay et al. (2011, 2015).

Tabela 9 - Parâmetros sanguíneos de pintos de um dia submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.

Variáveis	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in</i> <i>ovo</i>	SEM	P-valor
Glicose (mg/dL)	198	195	202	10,5	0,239
Glicogênio (mg/g/tecido)	8,63	8,96	8,93	0,15	0,233
Lactato (mmol/l)	0,77 ^{a,b}	0,74 ^b	0,92 ^a	0,31	0,028
Ácido úrico (mmol/l)	0,15	0,17	0,18	0,07	0,196
Triglicérides (mg/dL)	23,61 ^b	26,50 ^a	24,01 ^{a,b}	4,76	0,019
Colesterol total (mg/dL)	161,51 ^b	177,11 ^a	146,35 ^c	17,37	<0,001
VLDL (mg/dL)	4,72	4,93	4,41	0,99	0,075
LDL (mg/dL)	116,69 ^b	127,17 ^a	102,95 ^c	17,43	<0,001
HDL (mg/dL)	40,76 ^a	45,36 ^b	37,63 ^a	8,27	<0,001
TGP (ALT) (U/L)	1,93	2,04	1,93	1,80	0,878
TGO (AST) (U/L)	29,62 ^a	28,60 ^b	29,0 ^{a,b}	3,03	0,050
GGT (U/L)	1,48	1,37	1,5	0,26	0,943

n= 28 por tratamento e incubação.

Médias seguidas de letras distintas na linha são diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

Estes parâmetros costumam estar mais baixos em pintinhos logo após a eclosão e indicam a utilização da glicólise anaeróbica pelo embrião, bastante comum no fim da incubação devido à hipóxia nesse período. Entretanto, os teores podem reduzir drasticamente em casos de jejum prolongado, doença hepática severa, ou distúrbios endócrinos (principalmente alterações no pâncreas) (NANGSUAY et al., 2015), o que não foi o caso do presente estudo.

Em relação a variável lactato, aves provenientes de ovos do grupo vacinado probiótico apresentaram valores maiores que aves provenientes de ovos do tratamento que recebeu apenas vacina, o grupo controle não diferiu dos demais ($p < 0,05$).

A utilização de diferentes vias metabólicas para obtenção de energia no final da incubação influencia o lactato. O aumento é comum no embrião na fase de

transição entre a respiração cório-alantóide e pulmonar, em que há baixa disponibilidade de oxigênio para a realização da beta-oxidação e o embrião passa a utilizar glicólise anaeróbica (DE OLIVEIRA, 2008). A alta demanda por energia faz com que os embriões possam esgotar suas reservas de glicogênio, e conseqüentemente, com a falta de oxigênio, metabolizam as proteínas musculares para a produção de energia (GIVISIEZ et al., 2020). Dessa forma, o lactato é produzido no músculo principalmente, durante o metabolismo anaeróbico e metabolizado no fígado para ser convertido em glicose.

Apesar dos valores encontrados na literatura para esta variável em pintos de um dia estarem dentro da faixa de normalidade (BARBOSA, 2011; NANGSUAY et al., 2011, 2015) e todos os pintos dos tratamentos utilizarem lactato para a produção de energia, o aumento do lactato no grupo que recebeu probiótico pode estar relacionado a presença de ácido láctico proveniente dos *Lactobacillus* ssp. presente no produto comercial utilizado, em comparação ao tratamento somente com vacina. Em relação à semelhança dos resultados nos tratamentos que recebeu apenas vacina e vacina com probiótico em comparação com o controle, não foram encontradas explicações para tal fato, justificando ainda mais o aprofundamento no estudo da fisiologia embrionária em frangos de corte.

Esta resposta também está intimamente relacionada com os valores de ácido úrico plasmático. Neste experimento não foram observadas diferenças significativas para esta variável entre os tratamentos ($p > 0,05$). O ácido úrico é o principal metabólito resultante do metabolismo de nitrogênio (proteínas) pelo organismo das aves. Portanto, alterações nos níveis de ácido úrico são bastante específicas como indicador de catabolismo proteico para a produção de glicose, conforme relatado por Molenaar et al. (2010; 2013). Dessa forma, podemos dizer que o probiótico não influenciou negativamente o metabolismo proteico e demais tratamento, assim como o peso final e YFBM dos pintos neste estudo. Além disso, de acordo com Dembow (2015) as bactérias localizadas nos cecos contribuem para o metabolismo de nitrogênio catalisando ácido úrico em amônia, que é absorvida e direcionada para síntese de aminoácidos.

As variáveis relacionadas ao metabolismo lipídico incluindo, triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL, apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

As concentrações de triglicerídeos no tratamento com probiótico foram semelhantes aos tratamentos controle e vacinação *in ovo*, que foram diferentes entre

si ($p \leq 0,05$). O aumento dos triglicerídeos no sangue pode estar relacionado à alta mobilização dos lipídios para a utilização de energia pelos embriões de frangos de corte no final da incubação. Suas concentrações podem variar em função de vários fatores (MOLENAAR et al., 2010). Os triglicerídeos são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo de embriões, tanto do ponto de vista qualitativo, por acumular grandes quantidades no organismo animal, como também pelo ponto de vista quantitativo, por apresentar grande quantidade de energia quando comparado a outros grupos, como os carboidratos e proteínas.

As médias encontradas para as variáveis colesterol total apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). A menor média foi encontrada para variável colesterol no tratamento que recebeu probiótico *in ovo*. Alguns metabólitos de bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides* e *Clostridium*, estão relacionados ao metabolismo lipídico. Apresentam efeito sobre a absorção de gorduras, podem agir como sinalizadores da função endócrina na regulação de triglicerídeos, colesterol, glicose e homeostase de energia (SWANN et al., 2011). Os probióticos são capazes de modificar o ciclo entero-hepático e reduzir o colesterol através da assimilação do colesterol da dieta em células bacterianas e desconjugação de sais biliares no intestino, impedindo-os de atuar como precursores na síntese de colesterol (ST-ONGE et al., 2000; KALAVATHY et al., 2003). St-Onge et al. (2000) relataram que a redução dos níveis de colesterol na gema após as aves serem alimentadas com probióticos poderia estar relacionada a uma maior secreção de sais biliares, que por sua vez são produzidos a partir do colesterol por hepatócitos. Quando estes são absorvidos e direcionados para o fígado, há uma redução na reciclagem do ácido biliar resultando em uma redução das concentrações séricas de colesterol.

Baixos valores de LDL foram observados no tratamento da vacina+probiótico, em comparação aos outros dois tratamentos ($p \leq 0,05$), sendo que esta redução pode ser considerada positiva para o bom funcionamento do organismo.

O HDL está envolvido no metabolismo das VLDL e colesterol. Os valores de HDL no grupo controle e vacina+probiótico obtiveram médias estatisticamente iguais, sendo ambos diferentes do grupo vacinado *in ovo*. Dessa forma, podemos sugerir que as bactérias podem ter interferido no metabolismo de LDL, porém o mesmo não foi observado para HDL. A concentração também pode depender do

estado fisiológico dos embriões ou pintos, pois os mesmos podem mobilizar o colesterol para a produção de energia, causando oscilações (CATALAN et al., 2013).

A melhoria da saúde intestinal por meio da microbiota afeta positivamente o metabolismo de modo geral (PRUSZYNSKA-OSZMALEK et al., 2015). Um exemplo é o *Enterococcus faecium*, uma espécie comumente utilizada como probiótico, que é capaz de alterar a partição e utilização dos carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e lipídios por meio do aumento da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo. Esta interação entre a microbiota e o hospedeiro pode influenciar o metabolismo energético desses embriões (CASTAÑEDA et al., 2020).

Os níveis séricos enzimáticos podem ser usados como auxiliares do diagnóstico da integridade do sistema hepático em aves, contudo, existem poucos trabalhos sobre os níveis de referência dessas variáveis em pintos recém-eclodidos que receberam vacinação *in ovo* com ou sem probiótico em escala industrial. Segundo Kaneko (2008), o aumento dos níveis sérico-enzimáticos de TGO (AST), TGP (ALT), e GGT são considerados indicadores de disfunção hepática, inflamação hepática, ruptura dos hepatócitos, alterações na permeabilidade da membrana celular, além da diminuição ou interrupção do fluxo biliar (colestase). Dessa forma, quando ocorrem rompimentos celulares essas enzimas são liberadas na corrente circulatória, e quando detectadas podem ajudar no diagnóstico da saúde das aves.

As concentrações de ALT em aves são expressas em baixas quantidades e em nosso estudo não foi observado diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os níveis séricos da AST apresentaram diferenças estatísticas apenas entre o tratamento controle e vacinados *in ovo*, e ambos não diferiram do tratamento que recebeu probiótico. A maior média foi encontrada para o tratamento controle e vacina + probiótico, em comparação ao pintos que foram apenas vacinados *in ovo*.

AST é responsável pela catalisação de transaminação reversível de aspartato e cetogluturato em oxalacetato e glutamato (THRALL et al., 2015) e por ser considerada mais sensível, é mais utilizada nas aves para medir possíveis danos hepáticos juntamente com outros indicadores. Por essa razão, avaliamos se as múltiplas cepas probióticas inoculadas *in ovo*, afetariam a atividade das enzimas hepáticas no soro sanguíneo do fígado de pintos recém eclodidos e não houve alterações significativas entre os tratamentos neste trabalho.

Os resultados desta pesquisa, estão de acordo com os encontrados por Pruszyńska-Oszmalek et al. (2015) quando avaliaram a inoculação de inulina + *Lactobacillus lactis* na câmara de ar utilizando sistema de injeção automático, no 12º dia de incubação. Os autores encontraram em pintos de um dia valores médios de AST (37.81 UI/L) e ALT (3.89 UI/L) no tratamento com probióticos e demonstraram não ter influência negativa dos aditivos utilizados *in ovo*. Em nosso estudo, as atividades dos marcadores enzimáticos não apresentaram elevação significativa, demonstrando assim não haver influências negativas sobre o sistema hepático com a utilização do probiótico *in ovo*.

Não houve efeito dos tratamentos para a variável GGT ($p > 0,05$). A enzima gama-glutamiltransferase (GGT) tem baixa atividade no tecido hepático das aves. Nestes animais a GGT é uma enzima mais específica ao epitélio biliar, e a sua maior concentração está relacionada às condições coleestáticas e aos processos de desordens do epitélio biliar.

De acordo com os parâmetros sanguíneos avaliados é possível concluir que o uso de substâncias *in ovo* promove alterações no metabolismo energético dos pintos recém-eclodidos, sem alterar negativamente os indicadores de danos hepáticos e biliares. Mais estudos devem ser conduzidos para elucidar os modos de ação dos probióticos no metabolismo das aves e avaliar se há consequências destas mudanças fisiológicas no período de criação.

Os dados relativos à histomorfometria intestinal encontram-se na Tabela 10. As análises dos dados em pintos de frangos de corte recém eclodidos demonstraram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhuma das variáveis (altura da vilosidade, largura da vilosidade, altura de cripta e a relação vilo/cripta), para o segmento do duodeno. Neste experimento, o período estudado pode não ter sido suficiente para que houvesse diferenciação entre os tratamentos.

Apesar de o desenvolvimento morfológico e funcional do intestino delgado começar antes da eclosão, os pintos recém-eclodidos apresentam os enterócitos do intestino delgado ainda imaturos e maiores mudanças acontecem no período pós-eclosão (GIVISIEZ et al., 2020). Após o nascimento estas células aumentam rapidamente de comprimento com definição da borda em escova. Nessa fase, as vilosidades do intestino delgado não se apresentam desenvolvidas e suas criptas ainda não são observadas facilmente (MAIORKA et al., 2000). As criptas começam

a se formar algumas horas após o nascimento e se tornam bem definidas em torno de 2 a 3 dias.

De acordo com Geyra et al. (2001), os segmentos intestinais sofrem as alterações nas suas características morfológicas celulares em diferentes períodos. No duodeno esse processo ocorre até 216 horas após o nascimento. Essas observações podem justificar o fato de que na literatura a maioria dos trabalhos com probiótico *in ovo* não apresenta essas mensurações com pintos de um dia.

Tabela 10 - Altura e largura das vilosidades, altura de cripta e relação vilo:cripta dos segmentos do intestino delgado de pintos de corte recém eclodidos submetidos a vacinação *in ovo* com ou sem probiótico.

Variáveis (μm)	Tratamentos			p-valor
	Controle	Vacinados <i>in ovo</i>	Vacinados + Probiótico <i>in ovo</i>	
Duodeno				
Altura da vilosidade	262,49	237,14	252,12	0,2338
Largura da vilosidade	53,02	52,44	53,46	0,8218
Altura cripta	60,86	62,99	66,46	0,0883
Relação Vilo/Cripta	4,31	3,76	3,79	0,2856
Jejuno				
Altura da vilosidade	177,00	196,13	197,09	0,0957
Largura da vilosidade	47,12	49,74	46,53	0,0997
Altura cripta	51,86 ^b	57,71 ^a	58,68 ^a	0,0014
Relação Vilo/Cripta	3,41	3,39	3,35	0,3906
Íleo				
Altura da vilosidade	172,29 ^b	197,62 ^a	199,77 ^a	0,0157
Largura da vilosidade	40,27 ^b	44,44 ^a	42,07 ^{a,b}	0,0183
Altura cripta	47,27 ^b	53,86 ^a	56,30 ^a	0,0001
Relação Vilo/Cripta	3,64	3,67	3,55	0,9048

Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância
n=10 repetições por tratamento/experimento. n= 20 vilosidades por repetição por tratamento
Total= 600 vilosidades por segmento. Total de medições: 5.400 m.

Para as variáveis obtidas no segmento jejuno, a altura de cripta diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Tanto o tratamento vacinação+probiótico *in ovo* quanto o tratamento vacinação *in ovo* apresentaram médias superiores ao tratamento controle ($p \leq 0,05$). O jejuno das aves representa cerca de 80% do intestino delgado (BERTECHINI, 2012). Dessa forma, o jejuno apresenta maior área de digestão e absorção dos nutrientes, por possuir a maior concentração de vilos e microvilos por cm^2 de mucosa intestinal.

Os resultados obtidos no fragmento ileal apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para altura e largura de vilosidade; e altura de cripta. O tratamento vacina + probiótico e o tratamento que recebeu apenas vacina foram semelhantes e apresentaram médias superiores ao tratamento controle ($p < 0,05$), nas variáveis altura de vilosidade e altura de cripta. Para a variável largura de vilosidade, o tratamento vacina + probiótico foi semelhante aos tratamentos controle e vacinados *in ovo*, que diferiram entre si ($p \leq 0,05$). O íleo é a porção final do intestino delgado, onde ainda há atuação de alguns transportadores de mucosa e ocorre reabsorção de sais biliares. A renovação da camada de muco nesse segmento é mais constante, devido a maior quantidade de células caliciformes, pois são secretoras de muco e possuem funções de proteger o epitélio intestinal durante o processo de digestão, funcionando como uma barreira protetora, evitando o contato de microrganismos com as células epiteliais (FURLAN, 2004; OLIVEIRA et al., 2012). Segundo Ranjitkar et al. (2016), as bactérias mais prevalentes nesta região são as produtoras do ácido lático, como por exemplo *Lactobacillus spp.*, bem como *Enterococcus spp.*

Resultados positivos relacionados à histomorfometria intestinal foram encontrados em alguns estudos que avaliaram o período de criação. A administração *in ovo* no saco vitelino, com 200 μl de *Bifidobacterium bifidum* ATTC 29521 (5×10^9 e 1×10^7 cfu) e *Bifidobacterium longum* ATTC 15707 (5×10^9 e 1×10^7 cfu) no 17º dia de incubação foi investigada por El-Moneim et al. (2019). Todos os grupos que receberam as cepas probióticas durante a incubação, obtiveram aumento significativo aos 35 dias de idade, na altura da vilosidade (~800 a 850 μm) e na relação altura da vilosidade/profundidade da cripta ileal (~7 a 7,7%) em comparação ao controle inoculado somente com água (~650 μm e ~5%). Um estudo conduzido por Martins (2015), utilizando o mesmo produto comercial de nossa pesquisa, avaliou as características do probiótico *in ovo* e outras vias de utilização, sobre a morfometria intestinal dos frangos de corte e controle de *Salmonella Enteritidis*. Os

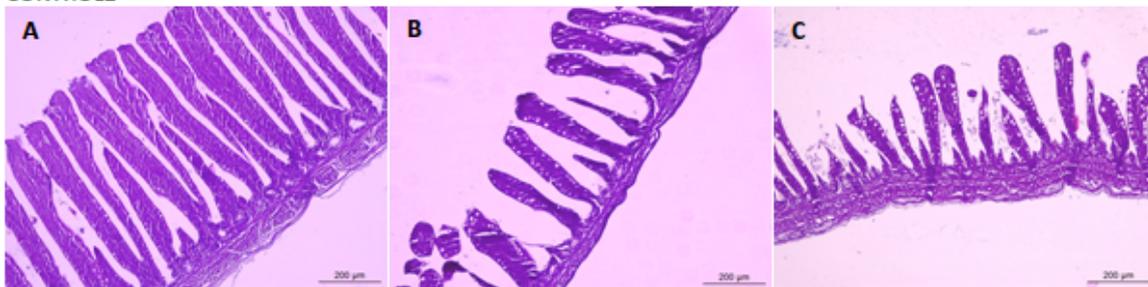
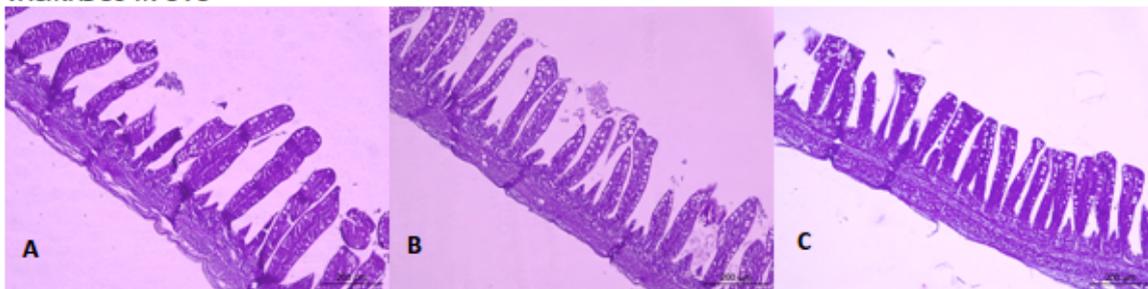
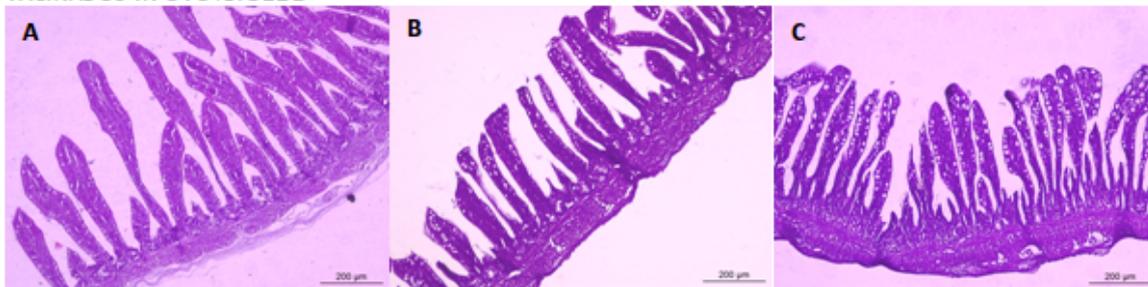
tratamentos utilizados foram: pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* no 18º dia de incubação contra a doença de Marek (T1 - controle); pintos provenientes de ovos inoculados com probiótico utilizando como diluente a vacina de Marek (T2); e pintos provenientes de ovos vacinados *in ovo* e pulverizados ao nascimento com solução contendo o mesmo probiótico (T3). Foi demonstrado que, aos 21 dias de idade, houve diferença no comprimento do segmento jejuno do intestino delgado, sendo o maior comprimento encontrado nos tratamentos onde houve inoculação de probiótico *in ovo*, quando comparados ao tratamento controle. A autora relatou melhoria na integridade da mucosa cecal nas diferentes fases de criação e mostrou maior eficácia em estabelecer microbiota protetora no controle de *S. Enteritidis* aos 7 dias de idade.

De modo geral, os dados da morfometria intestinal de pintos recém-eclodidos no presente experimento demonstraram que quando o processo de inoculação *in ovo* é realizado, tanto somente com a vacina, quanto com a associação vacina e probiótico, ocorrem aumentos significativos na altura de vilosidade e cripta em alguns segmentos do intestino. Em ambos os tratamentos, ocorreu a preparação das substâncias a serem inoculadas com o uso de diluente especial. Este diluente é uma solução formulada estéril composta de sais minerais e açúcares utilizados na reconstrução e estabilização das vacinas. Considerando que o local da inoculação *in ovo* é o âmnio e que ocorre o consumo oral da substância durante o desenvolvimento embrionário, uma hipótese é que pode ter ocorrido maior estímulo para o desenvolvimento intestinal nos tratamentos devido ao diluente adicionado.

Entretanto, segundo Castañeda et al. (2020), as primeiras bactérias que chegam ao intestino tendem a colonizá-lo e a recomendação do uso precoce de probióticos na avicultura tem sido justificada principalmente para o controle de bactérias patogênicas de interesse em saúde pública em razão da capacidade de exclusão competitiva dos probióticos, diminuindo a colonização intestinal de bactérias indesejáveis.

O foco principal do nosso estudo foi avaliar as alterações que soluções aplicadas *in ovo* poderiam provocar sobre o equilíbrio ácido base, metabolismo e a bioquímica sanguínea de pintos recém-eclodidos, assim como suas consequências sobre o rendimento de incubação. Estas análises foram realizadas com o intuito de verificar a segurança de um produto comercial de múltiplas cepas probióticas para ser usado em escala comercial. Sendo assim, é importante a realização de mais

experimentos e análises que avaliem o uso de probióticos *in ovo* de múltiplas cepas e seus resultados durante o período de criação das aves, para caracterizar as vantagens relacionadas ao desempenho zootécnico e respostas aos desafios de campo.

CONTROLE**VACINADOS IN OVO****VACINADOS IN OVO+BIO21®**

Legenda: A: DUODENO, B: JEJUNO, C: ÍLEO

Figura 13 - Histomorfologia intestinal de pintos de um dia. Arquivo pessoal

5. CONCLUSÃO

A técnica de associação da vacinação *in ovo* ao probiótico de múltiplas cepas utilizado nesta pesquisa, é segura para ser realizada em escala industrial, pois preserva a homeostase dos pintos e não interfere no rendimento de incubação e na qualidade dos pintos. É recomendado o aprofundamento de estudos associando probióticos *in ovo* de múltiplas cepas e seus efeitos ao longo do período de criação das aves, para constatar benefícios relacionados ao desempenho zootécnico e respostas aos desafios de campo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HACK, M. E.; MAHGOUB, S. A.; ALAGAWANY, M.; ASHOUR, E. A. Improving productive performance and mitigating harmful emissions from laying hen excreta via feeding on graded levels of corn DDGS with or without *Bacillus subtilis* probiotic. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 904–913, 2017.

ABD EL-HACK, M. E.; EL-SAADONY, M. T.; SHAFI, M. E.; QATTAN, S.; BATIHA, G. E.; KHAFAGA, A. F.; ABDEL-MONEIM, A. E.; ALAGAWANY, M. Probiotics in Poultry Feed: A comprehensive review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, p.1835–1850. 2020.

ABD EL-MONEIM, A. E.; ELBAZ, A. M.; KHIDR, R. E.; BADRI, F. B. Effect of in Ovo Inoculation of Bifidobacterium spp. on Growth Performance, Thyroid Activity, Ileum Histomorphometry, and Microbial Enumeration of Broilers. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, p. 1-10, 2019.

AGYARE, C.; BOAMAH, V. E.; ZUMBI, C. N.; OSEI, F.B. Antibiotic use in poultry production and its effects on bacterial resistance. **Antimicrobial Resistance - A Global Threat**. IntechOpen, 2018.

AHMED, S. T.; MUN, H.-S.; ISLAM, M. M.; KIM, S.-S.; HWANG, J.-A.; KIMA, Y.-J.; YANG, & C.-J. Effects of Citrus junos by-products fermented with multistrain probiotics on growth performance, immunity, caecal microbiology and meat oxidative stability in broilers. **British Poultry Science**, v. 55, n. 4, p. 540-547, 2014.

AKINYEMI, F. T.; DING, J.; ZHOU, H.; XU, K.; HE, C.; HAN, C.; ZHENG, Y.; LUO, H.; YANG, K.; GU, C.; HUANG, Q.; MENG, H. Dynamic distribution of gut microbiota during embryonic development in chicken. **Poultry Science**, v. 99, p. 5079-5090, 2020.

AL-KHALAIFAH, H. S. Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. **Poultry Science**, v. 97, n. 11, p. 3807–3815, 2018.

ALIZADEH, M.; SHOJADOOST, B.; ASTILL, J.; TAHA-ABDELAZIZ, K.; KARIMI, S. H.; BAVANANTHASIVAM, J.; KULKARNI, R. R.; SHARIF, S. Effects of in ovo Inoculation of Multi-Strain *Lactobacilli* on Cytokine Gene Expression and Antibody-Mediated Immune Responses in Chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. February, 2020.

ALIZADEH, M.; BAVANANTHASIVAM, J.; SHOJADOOST, B.; ASTILL, J.; TAHA-ABDELAZIZ, K.; ALQAZLAN, N.; BOODHOO, N.; SHOJA DOOST, J.; SHARIF, S. In Ovo and Oral Administration of Probiotic *Lactobacilli* Modulate Cell- and Antibody-Mediated Immune Responses in Newly Hatched Chicks. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. April, p. 1–13, 2021.

ALIZADEH, M.; ASTILL, J.; ALQAZLAN, N.; SHOJADOOST, B.; TAHA-ABDELAZIZ, K.; BAVANANTHASIVAM, J.; DOOST, J. S.; SEDEGHIISFAHANI, N.; SHARIF, S. In ovo co-administration of vitamins (A and D) and probiotic *Lactobacilli* modulates immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, p. 101717, 2022.

ANEE, I. J.; ALAM, S.; BEGUM, R. A.; SHAHJAHAN, R. M.; KHANDAKER, A. M. The role of probiotics on animal health and nutrition. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 82, n. 1, 2021.

ANGWECH, H.; TAVANIELLO, S.; ONGWECH, A.; KAAYA, A. N.; MAIORANO, G. Efficacy of In ovo delivered prebiotics on growth performance, meat quality and gut health of kuroiler chickens in the face of a natural coccidiosis challenge. **Animals**, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2019.

ARAÚJO, I. C. S.; CAFÉ, M. B.; NOLETO, R. A.; MARTINS, J. M. S.; ULHOA, C. J.; GUARESHI, G. C.; REIS, M. M.; LEANDRO, N. S. M. Effect of vitamin E in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 3652–3661, 2019.

ARREGUIN-NAVA, M. A.; GRAHAM, B. D.; ADHIKARI, B.; AGNELLO, M.; SELBY, C. M.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; VUONG, C. N.; SOLIS-CRUZ, B.; HERNANDEZ-PATLAN, D.; LATORRE, J. D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. M.;

- TELLEZ-ISAIAS, G. Evaluation of in ovo *Bacillus spp.* based probiotic administration on horizontal transmission of virulent *Escherichia coli* in neonatal broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 12, p. 6483–6491, 2019.
- ARREGUIN-NAVA, M. A.; GRAHAM, B. D.; ADHIKARI, B.; AGNELLO, M.; SELBY, C. M.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; VUONG, C. N.; SOLIS-CRUZ, B.; HERNANDEZ-PATLAN, D.; LATORRE, J. D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. M.; TELLEZ-ISAIAS, G. In ovo Administration of Defined Lactic Acid Bacteria Previously Isolated From Adult Hens Induced Variations in the Cecae Microbiota Structure and Enterobacteriaceae Colonization on a Virulent *Escherichia coli* Horizontal Infection Model in Broiler Chicken. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. August, p. 1–9, 2020.
- AZHAR, M.; RAHARDJA, D. P.; PAKIDING, W. Embryo development and post-hatch performances of kampung chicken by in ovo feeding of L-Arginine. **Media Peternakan**, v. 39 (3), p. 168-172, 2016.
- BAI, S. P.; WU, A. M.; DING, X. M.; LEI, Y.; BAI, J.; ZHANG, K. Y.; CHIO, J. S. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 663–670, 2013.
- BAKYARAJ, S.; BHANJA, S. K.; MAJUMDAR, S.; DASH, B. Modulation of post-hatch growth and immunity through in ovo supplemented nutrients in broiler chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 313–320, 2012.
- BARBOSA, V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2011. 124p.
- BARBOSA, V. M.; BAIÃO, N. C.; ROCHA, J. S. R.; MENDES, P. M. M.; LARA, L. J. C.; POMPEU, M. A.; LEME, F. O. P.; CARDEAL, P. C.; MARTINS, N. R. S.; LEITE, R. C. Equilíbrio ácido-básico de embriões e pintos de corte em momentos críticos da incubação e submetidos a diferentes períodos de transferência para o nascedouro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1225-1233, 2014.

- BARBOSA, T. S.; MORI, C. K.; POLÔNIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; CIARLINI, P. C. Perfil bioquímico sérico de galinhas poedeiras na região de Araçatuba, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1583-1588, 2011.
- BECK, C. N.; MCDANIEL, C. D.; WAMSLEY, K. G. S.; KIESS, A. S. The potential for inoculating *Lactobacillus animalis* and *Enterococcus faecium* alone or in combination using commercial in ovo technology without negatively impacting hatch and post-hatch performance. **Poultry Science**, v. 98, n. 12, p. 7050–7062, 2019.
- BEDNARCZYK, M.; STADNICKA, K.; KOZŁOWSKA, I.; ABIUSO, C.; TAVANIELLO, S.; DANKOWIAKOWSKA, A.; STAWINSKA, A.; MAIORANO, G. Influence of different prebiotics and mode of their administration on broiler chicken performance. **Animal**, v. 10, n.8, p. 1271–1279, 2016.
- BELLO, A.; BLACKER H.A.; ORGEIG S.; DANIELS C. B. Hypoxic control of the development of the surfactant system in the chicken: evidence for physiological heterokairy. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 2, p. 403-10, 2004.
- BELLO, A.; ZHAI, W.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. **Poultry Science**, v. 92, n. 10, p. 2551–2559, 2013.
- BELLO, A.; HESTER, P. Y.; GERARD, P. D.; ZHAI, W.; PEEBLES, E. D. Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on bone development and mineralization in male and female broilers 1 , 2. **Poultry Science**, v. 93, n. 11, p. 2734–2739, 2014.
- BELLO, A.; NASCIMENTO, M.; PELICI, N.; WOMACK, S. K.; ZHAI, W.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of the in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the yolk and serum characteristics of male and female broiler embryos. **Poultry Science**, v. 94, n. 4, p. 734–739, 2014.
- BELLO, A.; ZHAI, W.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler posthatch performance and carcass characteristics. **Poultry Science**, v. 93, n. 1, p. 155–162, 2014.

BELLO, A.; NASCIMENTO, M.; PELICI, N.; WOMACK, S. K.; ZHAI W.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of the in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the yolk and serum characteristics of male and female broiler embryos. **Poultry Science**. v. 94, p. 734–739. 2015.

BERROCOSO, J. D.; KIDA, R.; SINGH, A. K.; KIM, Y. S.; JHA, R. Effect of in ovo injection of raffinose on growth performance and gut health parameters of broiler chicken. **Poultry Science**, v. 96, n. 6, p. 1573–1580, 2017.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogástricos**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2012. 373p.

BRITO, J. A. G. de.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES, P. B.; LIMA, E. M. C.; MENEGHETTI. Efeito da vitamina d3 e 25-hidroxi-colecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 12, p. 2656-2663, 2010.

BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. **Boletim técnico CEPTA**. 10: p.53-60, 1998.

BILONI, A.; QUINTANA, C. F.; MENCONI, A.; KALLAPURA, G.; LATORRE, J.; PIXLEY, C.; LAYTON, S.; DALMAGRO, M.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; WOLFENDEN, A.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Evaluation of effects of EarlyBird associated with FloraMax-B11 on Salmonella Enteritidis, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 2337-2346, 2013.

BIRIA, A.; NAVIDSHAD, B.; MIRZAEI AGHJEHGESHLAG, F.; NIKBIN, S. The effect of in ovo supplementation of nano zinc oxide particles on hatchability and post-hatch immune system of broiler chicken. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 10, n. 3, p. 547–553, 2020.

BOGUCKA, J.; DANKOWIAKOWSKA, A.; ELMINOWSKA-WENDA, G.; SOBOLEWSKA, A.; SZCZERBA, A.; BEDNARCZYK, M. Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered In Ovo on Broiler Small Intestine Histomorphology During the First Days After Hatching. **Folia Biologica**, v. 64, n. 3, p. 131–143, 2016.

BOHORQUEZ, D. V. **Nutritional Influences on the Ultra-structural Development of the Small Intestinal Epithelium of the Perinatal Turkey Embryo and Poult**. 2010. Phd Thesis North Carolina State University, Raleigh, [s. l.], 2010.

BOUTILIER, R. G.; GIBSON, M. A.; TOEWS, D. P.; ANDERSON, W. Gas exchange and acid-base regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo. **Respiration Physiology**, v. 31, n. 1, p. 81–89, 1977.

BHANJA, S. K.; GOEL, A.; PANDEY, N.; MEHRA, M.; MAJUMDAR, S.; MANDAL, A. B. In ovo carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99(1), p. 163–173, 2014.

BRICKA, R. M.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler bone development and mineralization on days 0 and 21 posthatch. **Poultry Science**, v. 93, n. 5, p. 1053–1058, 2014.

BUZZO, M. L.; CARVALHO, M. F. H.; ARAKAKI, E. E. K.; MATSUZAKI, R.; GRANATO, D.; KIRA, C. S. Elevados teores de sódio em alimentos industrializados consumidos pela população brasileira. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 32-39, 2015.

CALIK, A.; CEYLAN, A.; EKIM, B.; ADABI, S. G.; DILBER, F.; BAYRAKTAROGLU, A. G.; TEKINAY, T.; ÖZEN, D.; SACAkli, P. The effect of intra-amniotic and posthatch dietary synbiotic administration on the performance, intestinal histomorphology, cecal microbial population, and short-chain fatty acid composition of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 1, p. 169–183, 2017.

CAMPOS, A. M. A.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; DA SILVA, E. A.; ALBINO, L. F. T.; NOGUEIRA, E. T. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1712–1717, 2011.

CASTAÑEDA, C. D.; DITTOE, D. K.; WAMSLEY, K. G. S.; MCDANIEL, C. D.; BLANCH, A.; SANDVANG, D.; KIESS, A. S. In ovo inoculation of an *Enterococcus faecium*-based product to enhance broiler hatchability, live

performance, and intestinal morphology. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6163–6172, 2020.

CASTAÑEDA, C. D.; GAMBLE, J. N.; WAMSLEY, K. G. S.; MCDANIEL, C. D.; KIESS, A. S. In ovo administration of *Bacillus subtilis* serotypes effect hatchability, 21-day performance, and intestinal microflora. **Poultry Science**, v. 100, n. 6, 2021.

CASTRO, L. C. G; O sistema endocrinológico vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* [online]. 2011, v. 55, n. 8 , pp. 566-575.

CATALAN, A. A. S.; AVILA, V. S.; LOPES, L. L.; MONTAGNER, P.; VARGAS, G. D.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B. Perfil metabólico, hematológico e comportamental de poedeiras suplementadas com *Panax ginseng*. **Archives de Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 62, n. 237, p. 89-100, 2013.

CEBRIÁN, R.; BAÑOS, A.; VALDIVIA, E.; PÉREZ-PULIDO, R.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. **Food Microbiology**, v. 30, p. 59-67, 2011.

CHEN, C.; LI, J.; ZHANG, H.; XIE, Y.; XIONG, L.; LIU, H.; WANG, F. Effects of a probiotic on the growth performance, intestinal flora, and immune function of chicks infected with *Salmonella pullorum*. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 5316–5323, 2020.

CHEN, W.; WANG, R.; WAN, H. F.; XIONG, X. L.; PENG, P.; PENG, J. Influence of in ovo injection of glutamine and carbohydrates on digestive organs and pectoralis muscle mass in the duck. **British Poultry Science**, v. 50, n. 4, p. 436–442, 2009.

CHEN, W.; WANG, R.; XIONG, X. L.; WAN, H. F.; XU, J.; PENG, J. Influence of in ovo injection of disaccharides, glutamine and β -hydroxy- β -methylbutyrate on the development of small intestine in duck embryos and neonates. **British Poultry Science**, v. 51, n. 5, p. 592–601, 2010.

CHEN, W.; XU, J.; TANGARA, M.; PENG, J. Effects of in ovo injecting disaccharides and alanyl-glutamine dipeptide on the energy status in duck embryos and neonates. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 29–35, 2010.

CHRISTENSEN, V. L.; WINELAND, M. J.; FASENKO, G. M.; DONALDSON, W. E. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen Concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80 p. 1729-1735, 2001.

COILLIE, E. V; GORIS, J.; CLEENWERCK, I; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN IMMERSEEL, F.; HEYNDRICKX, M. Identification of Lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control Salmonella Enteritidis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, 2007.

DA SILVA, A. V. F.; MAIORKA, A.; BORGES, S. A.; SANTIN, E.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Surface Area of the Tip of the Enterocytes in Small Intestine Mucosa of Broilers Submitted to Early Feed Restriction and Supplemented with Glutamine. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 1, p. 31–35, 2006.

DAI, D.; WU, S. G.; ZHANG, H. J.; Q.I, G. H.; WANG, J. Dynamic alterations in early intestinal development, microbiota and metabolome induced by in ovo feeding of L-arginine in a layer chick model. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2020.

DAL PONT, G. C.; GOES, E. C.; DA SILVA, K. F.; DE OLIVEIRA, S. G.; DA ROCHA, C.; MIORKA, A. Glycerol in ovo feeding as an energy substrate improves performance of broilers from young breeders. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, n. 5, p. 1453–1461, 2019.

DAMASCENO, J. L.; CRUZ, F. G. G.; MELO, R. D.; FEIJÓ, J. C.; RUFINO, J. P. F.; VALENTIM, F. M.; OLIVEIRA, J. P. C. Inoculação de proteína isolada de soja em ovos embrionados oriundos de matrizes semipesadas com diferentes idades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1259–1266, 2017.

DECUYPERE, E.; MICHELS, H. Incubation temperature as a management tool: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.48, p.28-38, 1992.

DEMBOW, D. M. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: SCANES, C. G. **Sturkie's Physiology**. 6. ed. London: Elsevier inc, 2015. p. 337-66.

DANKOWIAKOWSKA, A.; BOGUCKA, J.; SOBOLEWSKA, A.; TAVANIELLO, S.; MAIORANO, G.; BEDNARCZYK, M. Effects of in ovo injection of prebiotics

and synbiotics on the productive performance and microstructural features of the superficial pectoral muscle in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 5157–5165, 2019.

DAS, R.; MISHRA, P.; JHA, R. In ovo Feeding as a Tool for Improving Performance and Gut Health of Poultry: A Review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. November, 2021.

DAWES, C.; SIMKISS, K. The acid-base status of the blood of development chicken embryo. **The Journal of Experimental Biology**, v. 50, n. 1, p. 79-86, 1969.

DE JONG, I. C.; VAN RIEL, J. W.; BRACKE, J. M. B. M.; VAN DEN BRAND, H. A 'meta-analysis' of effects of post-hatch food and water deprivation on development, performance and welfare of chickens. *PLoS One* 12:e0189350, 2017.

DE OLIVEIRA, J. E.; VAN DER HOEVEN-HANGOOR, E.; VAN DE LINDE, I. B.; MONTIJN, R. C.; VAN DER VOSSEN, J. M. B. M. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 818–829, 2014.

DE OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, p. 488-499, 2008.

DE SOUSA BARBOSA, T.; MORI, C. K.; POLÔNIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; CIARLINI, P. C. Perfil bioquímico sérico de galinhas poedeiras na região de Araçatuba, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1583–1588, 2011.

DEC, M.; PUCHALSKI, A.; URBAN-CHMIEL, R.; WERNICKI, A. Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. **Poultry Science**, v. 93, p. 2464-2472, 2014.

DING, J.; DAI, R.; YANG, L.; HE, C.; XU, K.; LIU, S.; ZHAO, W.; XIAO, L.; LUO, L.; ZHANG, Y.; MENG, H. Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–11, 2017.

DIBARTOLA, S. P. **Fluid therapy in small animal practice**. 2 ed. Saunders Company: Philadelphia, 2000. 720p.

- DUNISLAWSKA, A.; HEROSIMCZYK, A.; OZGO, M.; LEPCZYNSKI, A.; CIECHANOWICZ, A. K.; BEDNARCZYK, M.; SIWEK, M. Proteome changes upon in ovo stimulation with Lactobacillus synbiotic in chicken liver. **Poultry Science**, v. 100, n. 11, p. 101449, 2021.
- EBRAHIMI, M.; JANMOHAMMADI, H.; KIA, H. D.; MOGHADDAM, G.; RAJABI, Z.; RAFAT, S. A.; JAVANMAARD, A. The effect of L-lysine in ovo feeding on body weight characteristics and small intestine morphology in a day-old Ross broiler chicks. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 168, n. 4–6, p. 116–124, 2017.
- EL-MONEIM, A. E. M. E. A.; EL-WARDANY, I.; ABU-TALEB, A. M.; WAKWAK, M. M.; EBEID, T. A.; SALEH, A. A. Assessment of In Ovo Administration of Bifidobacterium bifidum and Bifidobacterium longum on Performance, Ileal Histomorphometry, Blood Hematological, and Biochemical Parameters of Broilers. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 2, p. 439–450, 2019.
- EL-SENOUSEY, H. K.; CHEN, B.; WANG, J. Y.; ATTA, A. M.; MOHAMED, F. R.; NIE, Q. H. In ovo injection of ascorbic acid modulates antioxidant defense system and immune gene expression in newly hatched local Chinese yellow broiler chicks. **Poultry Science**, v. 97, n. 2, p. 425–429, 2018.
- EVERAERT, N.; DE SMIT, L.; DEBONNE, M.; WITTERS, A.; KAMERS, B.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Changes in acid-base balance and related physiological responses as a result of external hypercapnia during the second half of incubation in the chicken embryo. **Poultry Science**, v. 87, n. 2, p. 362–367, 2008.
- EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NAAS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed., Jaboticabal: FACTA. cap.1.2, 2013, p.31-45.
- EVERAERT, N.; KAMERS, B.; WITTERS, A.; SMIT, L.; DEBONNE, M.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Effect of four percent carbon dioxide during the second half of incubation on embryonic development, hatching parameters, and posthatch growth. **Poultry Science**, v.86, p.1372-1379, 2007.

- FALLAH, R.; KIANI, A.; AZARFAR, A. A review of the role of five kinds of alternatives to in-feed antibiotics in broiler production. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 5, n. 11, p. 317–321, 2013.
- FATEMI, S. A.; ELLIOTT, K. E. C.; BELLO, A.; DUROJAYE, O. A.; ZHANG, H. J.; PEEBLES, E. D. The effects of in ovo injected vitamin D3 sources on the eggshell temperature and early posthatch performance of Ross 708 broilers. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1357–1362, 2020.
- FATEMI, S. A.; ELLIOTT, K. E. C.; BELLO, A.; ZHANG, H.; ALQHTANI, A.; PEEBLES, E. D. Effects of the in ovo injection of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in Ross 708 broilers subsequently fed commercial or calcium and phosphorus-restricted diets. II. Immunity and small intestine morphology^{1,2,3}. **Poultry Science**, v. 100, n. 8, p. 101240, 2021.
- FATHI, M. M., EBEID, T. A., AL-HOMIDAN, I., SOLIMAN, N. K., ABOU-EMERA, O. K. Influência da suplementação de probióticos na resposta imune em frangos criados em clima quente. **British Poultry Science**, n. 58:5, p. 512-516, 2017.
- FERKET, P.; OLIVEIRA, J.; GHANE, A.; UNI, Z. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. In: **INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM**. Abstracts of papers. Atlanta: Poultry Science Association, 2005. p.118.
- FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. SUPPL. 2, 2013.
- FOYE, O. T.; FERKET, P. R.; UNI, Z. The effects of in ovo feeding arginine, β -hydroxy- β -methyl- butyrate, and protein on jejunal digestive and absorptive activity in embryonic and neonatal turkey poults. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2343–2349, 2007.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of applied bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; GONZALES, E. Termorregulação. In: FURLAN, R. L.; MACARI, M. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 2ºed., Jaboticabal: FUNEP, cap. 17, 2002. p. 209-230.

FURLAN, R. L. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos , probióticos e flora de exclusão competitiva. **5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição**, n. March, p. 6–28, 2004.

FURLAN, R. L.; SILVA, A. V. F.; BORGES, S. A.; MACARI, M. Equilíbrio Ácido-básico. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP. cap. 4, 2002. p. 51-73.

FURLAN, R. L.; TUCCI, F.M.; NAKAGHI, L. O.; SECATO, E. R.; GUERREIRO, J.R.; MACARI, M. Effect of age and strain on haematological and gasometric parameters in selected and non-selected broiler chickens. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 141-4,1993.

GAO, T.; ZHAO, M.; ZHANG, L.; LI, J.; YU, L.; LV, P.; GAO, F.; ZHOU, G. Effect of in ovo feeding of l-arginine on the hatchability, growth performance, gastrointestinal hormones, and jejunal digestive and absorptive capacity of posthatch broilers. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 7, p. 3079–3092, 2017.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 776–782, 2001.

GETACHEW, T. A Review on Effects of Probiotic Supplementation in Poultry Performance and Cholesterol Levels of Egg and Meat. **Journal of World's Poultry Research**, v. 6, n. 61, p. 31–36, 2016.

GIVISIEZ, P. E. N.; MOREIRA FILHO, A. L. B.; SANTOS, M. R. B.; OLIVEIRA, H. B.; FERKET, P. R.; OLIVEIRA, C. J. B.; MALHEIROS, R. D. Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. **Poultry Science**, v. 99, n. 12, p. 6774–6782, 2020.

GOEL, A.; BHANJA, S. K.; PANDE, V.; MEHRA, M.; MANDAL, A. Effects of in ovo administration of vitamins on post hatch-growth, immunocompetence and blood biochemical profiles of broiler chickens. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 83, n. 9, p. 916–921, 2013.

GRODZIK, M.; SAWOSZ, F.; SAWOSZ, E.; HOTOWY, A.; WIERZBICKI, M.; KUTWIN, M.; JAWORSKI, S.; CHWALIBOG, A. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and L-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles.

International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 11, p. 23033–23044, 2013.

HAN, G.; OUCHI, Y.; HIROTA, T.; HARAGUCHI, S.; MIYAZAKI, T.; ARAKAWA, T.; MASUHARA, N.; MIZUNOYA, W.; TATSUMI, R.; TASHIRO, K.; BUNGO, T.; FURUSE, M.; CHOWDHURY, V. S. Effects of l-leucine in ovo feeding on thermotolerance, growth and amino acid metabolism under heat stress in broilers. **Animal**, v. 14, n. 8, p. 1701–1709, 2020.

HAMIDU, J. A.; FASENKO, G. M.; FEDDES, J. J. R.; O'DEA, E. E.; OUELLETTE, C. A.; WINELAND, M. J.; CHRISTENSEN, V. L. The Effect of Broiler Breeder Genetic Strain and Parent Flock Age on Eggshell Conductance and Embryonic Metabolism. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2420–2432, 2007.

HU, Q.; AGARWAL, U.; BEQUETTE, B. J. Gluconeogenesis, non-essential amino acid synthesis and substrate partitioning in chicken embryos during later development. **Poultry Science**, v. 96, n. 2, p. 414–424, 2017.

HUANG, Q.; WEI, Y.; LV, Y.; WANG, Y.; HU, T. Effect of dietary inulin supplements on growth performance and intestinal immunological parameters of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 180, p. 172–176, 2015.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182–188, 2011.

JANG, I. S.; KO, Y. H.; MOON, Y. S.; SOHN, S. H. Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, heat shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.27, n.5, p.749-756, 2014.

JAVANSHIR, N.; HOSSEINI, G.; SADEGHI, M.; ESMAEILI, R.; SATARIKIA, F.; AHMADIAN, G.; ALLAHYARI, N. Evaluation of the Function of Probiotics, Emphasizing the Role of their Binding to the Intestinal Epithelium in the Stability

and their Effects on the Immune System. *Biological procedures online*, v. 23(1), p. 23. 2021.

JHA, R.; DAS, R.; O. A. K. S.; MISHRA, P. Probiotics (Direct-Fed Microbials) in Poultry Nutrition and Their Effects on Nutrient Utilization, Growth and Laying Performance, and Gut Health: A Systematic Review. *Animals*, v. 10, n. 10, p. 1863, 2020.

JHA, R.; SINGH, A. K.; YADAV, S.; BERROCOSO, J. F. D.; MISHRA, B. Early Nutrition Programming (in ovo and Post-hatch Feeding) as a Strategy to Modulate Gut Health of Poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6, n. March, p. 1–10, 2019.

JIA, Y.; LIN, J.; MI, Y.; ZHANG, C. Quercetin attenuates cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles. *Reproductive Toxicology*, v. 31, n. 4, p. 477–485, 2011.

JENA, B. P.; PANDA, N.; PATRA, R. C.; MISHRA, P. K.; BEHURA, N. C.; PANIGRAHI, B. Supplementation of Vitamin E and C Reduces Oxidative Stress in Broiler Breeder Hens during Summer. *Food and Nutrition Sciences*, n. 8, v. 4, p. 33-37, 2013.

JOCHEMSEN, P.; JEURISSEN, S. The localization and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. *Poultry Science*, v. 81, n. 12, p. 1811–1817, 2002.

JOSHUA, P.; VALLI, C.; BALAKRISHNAN, V. Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. *Veterinary World*, v. 9, n. 3, p. 287-294, 2016.

KABIR, S. M. L. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 8, p. 3531–3546, 2009.

KABIR, S. M. L., RAHMAN, M. M., RAHMAN, M. B., RAHMAN, M. M., AHMED, S. U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *International Journal of Poultry Science*. N. 3(5), p. 361-364, 2004

KADAM, M. M.; BAREKATAIN, M. R.; BHANJA, S. K.; PAUL, I. J. I. Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: The science and commercial

applications-a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3654–3661, 2013.

KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n.1, p. 139-144, 2003.

KANASHIRO, A. M. I.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, F.; CASTRO, A. G. M. de; FERREIRA, A. J. P. Influência da administração contínua de probiótico a frangos de corte sobre atividades enzimáticas séricas e concentração de colesterol sérico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 11-17, 2001.

KANEKO J. J.; HARVEY J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KERMANSHAHI, H.; GOLIANA, A.; EMAMIA, N.K. Effects of in ovo injection of threonine on hatchability, intestinal morphology, and somatic attributes in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Journal of Applied animal Research**, v.45, p.437-444, 2016.

KHALIGH, F.; HASSANABADI A.; NASSIRI-MOGHADDAM H.; GOLIAN A.; KALIDARI, G.A. Effect of probiotic administration route and dietary nutrient density on growth performance, gut health, and some hematological variables in healthy or *Eimeria* infected broiler chickens. **Iranian Journal Applied Animal Science**. v. 9, p. 473–485, 2019.

KHAN, R. U., RAHMAN, Z., JAVED, I., MUHAMMAD, F. Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Animal Reproduction Science*, 135(1), 85–90, 2012.

KANAGARAJU, P.; RATHNAPRABA, S. Effect of in-ovo injection of glucose and egg white protein on the production performance and gut histomorphometry of broiler chicken. **Indian Journal Of Animal Research**, v. 53, n. 5, p. 675-679, 2019.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; BADSTUBNER, D.; WERNER, G.; WITTE, W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal Of Food Microbiology**, p. 269-290, 2003.

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

LAKE, J. A.; BRANNICK, E. M.; PAPAHA, M. B.; LOUSENBERG, C.; VELLEMAN, S. G.; ABASHT, B. Blood Gas Disturbances and Disproportionate Body Weight Distribution in Broilers With Wooden Breast. **Frontiers In Physiology**, v. 11, n. 304, p. 1-9, 2020.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S. C. De; CAFÉ, M. B.; GONZALES, E.; STRINGHINI, J. H.; ANDRADE, M. A. Efeito do prebiótico e do ácido butírico in ovo sobre o desempenho, digestibilidade dos nutrientes da ração e biometria do trato gastrintestinal de pintos submetidos ao jejum. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 1–5, 2010.

LEÃO, A. P. A.; ALVARENGA, R. R.; ZANGERONIMO, M. G. In ovo inoculation of probiotics for broiler chickens: Systematic review and meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 280, n. August, 2021.

LEE, S.; LA, T-M.; LEE, H-J.; CHOI, I-S.; SONG, C-S.; PARK, S-Y.; LEE, J-B.; LEE, S-W. Characterization of microbial communities in the chicken oviduct and the origin of chicken embryo gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019.

LIU, Y.; ZHI, L.; SHEN, J.; LI, S.; YAO, J.; YANG, X. Effect of in ovo folic acid injection on hepatic IGF2 expression and embryo growth of broilers. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 3–11, 2016.

LOURENS A.; MOLENAAR, R.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M. J.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. **Poultry Science**, v.85, n.4, p.770-776, 2006.

LUMEIJ, J. T.; DE BRUIJNE, J. J. Evaluation Of The Refractometric Method For The Determination Of Total Protein In Avian Plasma Or Serum. **Avian Pathology**, v. 14, n. 3, p. 441–444, 1985.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: **V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais ...** Chapecó, p. 26-41, 2004.

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

MAIR, J. O.; HERNANDEZ, L. A. **Anatomia patológica general**. Barcelona :Univers, 2006.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; FISCHER DA SILVA, A. V.; BRUNO, L. D. G.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento do trato gastrintestinal de embriões oriundos de matrizes pesadas de 30 e 60 semanas de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 2000.

MAJIDI-MOSLEH, A.; SADEGHI, A. A.; MOUSAVI, S. N.; CHAMANI, M.; ZAREI, A. Kuluçkadan çıkış öncesi ve Sonrası civcivlerde probiyotik suşlarının in ovo inokulasyonunun jejunal goblet hücre sayısı ve morfometrisi üzerine etkisi. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 23, n. 1, p. 169–172, 2017.

MARTINS, B. B. **Efeito da inoculação de probiótico in ovo sobre a morfometria intestinal e controle de *Salmonella enteritidis***. 2015. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 2015.

MARTINS, L. K. S. A. **Características fisiológicas e zootécnicas de pintos vacinados in ovo**. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia Salvador, 2017.

MESSAOUDI, S.; MANAI, M.; KERGOURLAY, G.; PRÉVOST, H.; CONNIL, N.; CHOBERT, J.-M.; DOUSSET, X.. Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v. 36, p. 296-304, 2013.

MEIJERHOF, R. Chick size matters. **World's Poultry Science Journal**, v. 22, p. 30-31, 2006.

- MEIJERHOF, R. Incubation principles: What does the embryo expect from us? **Proceedings of the 20th. Australian Poultry Science Symposium, Australia**, p. 106-110, 2009..
- MIRI, B.; GHASEMI, H. A.; HAJKHODADADI, I.; KHALTABADI FARAHANI, A. H. Effects of low eggshell temperatures during incubation, in ovo feeding of L-arginine, and post-hatch dietary guanidinoacetic acid on hatching traits, performance, and physiological responses of broilers reared at low ambient temperature. **Poultry Science**, v. 101, n. 1, p. 101548, 2022.
- MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN BRAND, H. Relationship between hatchling length and weight on later productive performance in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 4, p. 599–604, 2008.
- MOLENAAR, R.; DE VRIES, S.; VAN DEN ANKER, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Effect of eggshell temperature and a hole in the air cell on perinatal development and physiology of layer hatchlings. **Poultry Science**, v. 89, p. 1716-1723, 2010.
- MOLENAAR, R.; VAN DEN BORNE, J. J. G. C.; HAZEJAGER, E.; KRISTENSEN, N. B.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. High environmental temperature increases glucose requirements in the developing chicken embryo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-12, 2013.
- MORAN JR, E. T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1043–1049, 2007.
- MOUNTZOURIS, K. C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 309-317, 2007.
- NANGSUAY, A.; RUANGPANIT, Y.; MEIJERHOF, R.; ATTAMANGKUNE, S. Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens. **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2648–2655, 2011.
- NANGSUAY, A.; MOLENAAR, R.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN ANKER, I.; HEETKAMP, M. J. W.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND. Differences in egg nutrient

availability, development, and nutrient metabolism of broiler and layer embryos.

Poultry Science, v. 94, p. 415-423, 2015.

NANGSUAY, A. Are all eggs equal? Embryonic development and nutrient metabolism in chicken eggs of different origins. **Wageningen University**, 2016.

NEVES, D. G.; RETES, P. L.; ROCHA, R. R.; FERREIRA, L. G.; NAVES, L.; ALVARENGA, R. R.; FASSANI, É. J.; PEREIRA, L. J.; SOUSA, R. V.; ZANGERONIMO, M. G. Effects of in ovo feeding with glycerol for broilers. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**, v. 101, n. 3, p. 434-440, 2016.

NEVES, D. G.; RETES, P. L.; ALVES, V. V.; PEREIRA, R. S. G.; BUENO, Y. D. C.; ALVARENGA, R. R.; ZANGERONIMO, M. G. In ovo injection with glycerol and insulin-like growth factor (IGF-I): hatchability, intestinal morphometry, performance, and carcass characteristics of broilers. **Archives of Animal Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 325–342, 2020.

NEVES, D. G.; RETES, P. L.; ALVES, V. V.; PEREIRA, R. S. G.; BUENO, Y. C.; ALVARENGA, R. R.; ZANGERONIMO, M. G. In ovo injection with glycerol and insulin-like growth factor (IGF-I): hatchability, intestinal morphometry, performance, and carcass characteristics of broilers. **Archives Of Animal Nutrition**, p. 1-18, 2020.

NOWACZEWSKI, S.; KONTECKA, H.; KRYSZTIANIAK, S. Effect of in Ovo Injection of Vitamin C during Incubation on Hatchability of Chickens and Ducks. **Folia Biologica**, v. 60, n. 1–2, p. 93–97, 2012.

ODUTAYO, O. J.; SOGUNLE, O. M.; ADEYEMI, O. A.; SONIBARE, A. O. Influence of in ovo arginine feeding on hatching traits and post-hatch performance of FUNAAB-Alpha chickens in two housing types. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2349–2357, 2020.

OH, J. K.; PAJARILLO, E. A. B.; CHAE, J. P.; KIM, I. H.; YANG, D. S.; KANG, D. K. Effects of *Bacillus subtilis* CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with *Salmonella gallinarum*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2017.

- OHTA, Y.; KIDD, M. T. Optimum site for in ovo amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p. 1425–1429, 2001.
- OLADOKUN, S.; ADEWOLE, D. I. In ovo delivery of bioactive substances: an alternative to the use of antibiotic growth promoters in poultry production—a review. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 3, p. 744-763, 2020.
- OLADOKUN, S.; KOEHLER, A.; MACISAAC, J.; IBEAGHA-AWEMU, E. M.; ADEWOLE, D. I. Bacillus subtilis delivery route: effect on growth performance, intestinal morphology, cecal short-chain fatty acid concentration, and cecal microbiota in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100809, 2021.
- OLIVEIRA, M.D.; ZAVARIZE, K.C.; GOMES, N.A.; ROCHA, F.R.T.; MARTINS, J.M.S.; LITZ, F.H.; CASTILHANO, H. Aditivos alternativos na alimentação de aves. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 27, Ed. 214, Art. 1425, 2012.
- OLIVEIRA, J. E.; DRUYAN S.; UNI, Z.; ASHWELL, C. M.; FERKET, P. R. Metabolic profiling of late-term turkey embryos by microarrays. **Poultry Science**, v. 92, p. 1011-1028, 2013.
- OLIVEIRA, T. F. B.; BERTECHINI, A. G.; BRICKA, R. M.; HESTER, P. Y.; KIM, E. J.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of in ovo injection of organic trace minerals and post-hatch holding time on broiler performance and bone characteristics. **Poultry Science**, v. 94, n. 11, p. 2677–2685, 2015.
- OLIVEIRA, T. F. B.; BERTECHINI, A. G.; BRICKA, R. M.; KIM, E. J.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. **Poultry Science**, v. 94, n. 10, p. 2488–2494, 2015.
- OLNOOD, C. G.; BESKI, S. S. M.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Delivery routes for probiotics: Effects on broiler performance, intestinal morphology and gut microflora. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 192–202, 2015.
- OMIDI, S.; EBRAHIMI, M.; JANMOHAMMADI, H.; MOGHADDAM, G.; RAJABI, Z.; HOSSEINTABAR-GHASEMABAD, B. The impact of in ovo injection of l-arginine on hatchability, immune system and caecum microflora of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 1, p. 178–185, 2019.

- OTUTUMI, L.K.; GOIS, M.B.; GARCIA, E. R. M. Lodzi M. M. Variations on the Efficacy of Probiotics in Poultry. **In Probiotic in Animals**, ed Rigobelo E. C. (Rijeka: InTech;), p. 203–230, 2012.
- PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 108–119, 2014.
- PARK, J. H.; KIM, I. H. The effects of the supplementation of *Bacillus subtilis* RX7 and B2A strains on the performance, blood profiles, intestinal *Salmonella* concentration, noxious gas emission, organ weight and breast meat quality of broiler challenged with *Salmonella typhimuri*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 2, p. 326–334, 2015.
- PATTEN, B. M. **Early embryology of the chick**. 4^a ed. London: Lews, 1951. 244p.
- PEDROSO, A. A.; BATAL, A. B.; LEE, M. D. Effect of in ovo administration of an adult-derived microbiota on establishment of the intestinal microbiome in chickens. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 77, n. 5, p. 514-526, 2016.
- PEEBLES, E. D. In ovo applications in poultry: A review. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2322–2338, 2018.
- PEEBLES, E. D.; OLIVEIRA, T. F. B.; KIM, E. J.; OLOJEDE, O. C.; ELLIOTT, K. E. C.; LINDSEY, L. L.; GERARD, P. D. Research Note: Effects of the in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper and posthatch holding time before placement on broiler body temperature during grow out. **Poultry Science**, v. 100, n. 2, p. 755–759, 2021.
- PENDER, C. M.; KIM, S.; POTTER, T. D.; RITZI, M. M.; YOUNG, M.; DALLOUL, R. A. In ovo supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 96, n. 5, p. 1052–1062, 2017.
- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J. AND WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, 51, 215-236, 1997.
- PRUSZYNSKA-OSZMALEK, E.; KOŁODZIEJSKI, P. A.; STADNICKA, K.; SASSEK, M.; CHALUPKA, D.; KUSTON, B.; NOGOWSKI, L.; MACKOWIAK,

P.; MAIORANO, G.; JANKOWSKI, J.; BEDNARCZYK, M. In ovo injection of prebiotics and synbiotics affects the digestive potency of the pancreas in growing chickens. **Poultry Science**, v. 94, n. 8, p. 1909–1916, 2015.

RASHTI G. M.; MOTTAGHITALAB, M.; AHMADI, H. In ovo feeding of nutrients and its impact on post-hatching water and feed deprivation up to 48 hr, energy status and jejunal morphology of chicks using response surface models. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 806–e817, 2018.

RANJITKAR, S.; LAWLEY, B.; TANNOCK, G.; ENGBERG, R. M. Sucessão bacteriana no trato gastrointestinal de frangos de corte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 2399-2410, 2016.

REICHER, N.; MELKMAN-ZEHAVI, T.; DAYAN, J.; WONG, E. A.; UNI, Z. Nutritional stimulation by in-ovo feeding modulates cellular proliferation and differentiation in the small intestinal epithelium of chicks. **Animal Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 91–101, 2021.

REICHER, N.; MELKMAN-ZEHAVI, T.; DAYAN, J.; UNI, Z. Intra-amniotic administration of l-glutamine promotes intestinal maturation and enteroendocrine stimulation in chick embryos. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.

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**, v. 102, n. 2, p. 361–369, 2018.

RICKE, S. C.; LEE, S. I.; KIM, S. A.; PARK, S. H.; SHI, Z. Prebiotics and the poultry gastrointestinal tract microbiome. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 670–677, 2020.

ROBINSON, E. N. Homeostase Acidobásica. In: KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5º ed., Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 52, p. 549-558, 2014.

ROCHA, C.; MAIORKA, A. Nutrição “in ovo”. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I.S.; NAAS, I.A. e MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed., Jaboticabal: FACTA, 2013. cap. 2.9, p. 223-243.

ROQUE, L.; SOARES, M. C. Effects of eggshell quality and broiler breeder age on hatchability. **Poultry Science**, v.73, p.1838-1845, 1994.

ROWLETT, K.; SIMKISS, K. Respiratory gases and acid-base balance in shell-less avian embryos. **The Journal of Experimental Biology**, v.143, p.529-536, 1989.

SALMANZADEH, M.; EBRAHIMNEZHAD, Y.; AGHDAM SHAHRYAR, H.; BEHESHTI, R. The effects of in ovo injection of glucose and magnesium in broiler breeder eggs on hatching traits, performance, carcass characteristics and blood parameters of broiler chickens. **Archiv fur Geflugelkunde**, v. 76, n. 4, p. 277–284, 2012.

SALIM, H. M.; KANG, H. K.; AKTER, N.; KIM, D. W.; KIM, J. H.; KIM, M. J., NA, J. C.; JONG, H. B.; CHOI, H. C.; SUH, O. S.; KIM, W. K. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2084-2090, 2013.

SALVETTI E, TORRIANI S, FELIS GE. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 4:217-226, 2012

SAMLI, H. E.; SENKOYLU, N.; KOC, F.; KANTER, M.; AGMA, A. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 42–49, 2007.

SAMLI, H. E.; DEZCAN, S.; KOC, F.; OZDUVEN, M. L.; OKUR, A. A.; SENKOYLU, N. Effects of *Enterococcus faecium* supplementation and floor type on performance, morphology of erythrocytes and intestinal microbiota in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 51, n. 4, p. 564–568, 2010.

SAS-institute inc. User's guide: statistics, version. 9.1 edition. Cary: sas institut, 2009.

SATO, M.; TACHIBANA, T.; FURUSE, M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A**, v. 143, p. 382-388, 2006.

SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C. Patologia clínica em aves de produção - Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola - Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9–20, 2007.

SGAVIOLI, S.; DE ALMEIDA, V. R.; MATOS JÚNIOR, J. B.; ZANIRATO, G. L.; BORGES, L. L.; BOLELI, I. C. In ovo injection of ascorbic acid and higher incubation temperature modulate blood parameters in response to heat exposure in broilers. **British Poultry Science**, v. 60, n. 3, p. 279–287, 2019.

SHAFEY, T. M.; ALODAN, M. A.; AL-RUQAIE, I. M.; ABOUHEIF, M. A. *In ovo* feeding of carbohydrates and incubated at a high incubation temperature on hatchability and glycogen status of chicks. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 42, n. 3, p. 210–220, 2012.

SHEHATA, A. M.; PASWAN, V. K.; ATTIA, Y. A.; ABDEL-MONEIM, A. M. E.; ABOUGABAL, M. S.; SHARAF, M.; ELMAZOU DY, R.; ALGHAFARI, W. T.; OSMAN, M. A.; FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Managing gut microbiota through *in ovo* nutrition influences early-life programming in broiler chickens. **Animals**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2021.

SHIVARAMAIAH, S.; PUMFORD, N. R.; MORGAN, M. J.; WOLFENDEN, R. E.; WOLFENDEN, A. D.; TORRES-RODRÍGUEZ, A.; HARGIS, B. M.; TÉLLEZ, G.. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. **Poultry Science**, v. 90, p. 1574-1580, 2011.

SŁAWIŃSKA, A.; SIWEK, M.; ZYLIŃSKA, J.; BARDOWSKI, J.; BRZEZIŃSKA, J.; GULEWICZ, K. A. NOWAK, M.; MURBANOWSKI, M.; BEDNARCZYK, A. P. M. Influência de simbióticos entregues *in ovo* no desenvolvimento e estrutura de órgãos imunes. **Folia Biológica**, v. 62, p. 277 - 285, 2014.

SŁAWIŃSKA, A.; MENDES, S.; DUNISLAWSKA, A.; SIWEK, M.; ZAMPIGA, M.; SIRRI, F.; MELUZZI, A.; TAVANIELLO, S.; MAIORANO, G. Avian model to mitigate gut-derived immune response and oxidative stress during heat. **Biosystems**, v. 178, p. 10-15, 2019.

SKJØT-RASMUSSEN, L.; SANDVANG, D.; BLANCH, A.; NIELSEN, J. M.; STYRISHAVE, T.; SCHNABL, J.; BROCKMANN, E.; BECK, C. N.; KIESS, A. S. Post hatch recovery of a probiotic *Enterococcus faecium* strain in the yolk sac and

intestinal tract of broiler chickens after in ovo injection. **Fems Microbiology Letters**, 2019.

SLAWINSKA, A.; SIWEK, M.; ZYLIŃSKA, J.; BARDOWSKI, J.; BRZEZIŃSKA, J.; GULEWICZ, K. A. NOWAK, M.; MURBANOWSKI, M. BEDNARCZYL, A. P. M. Influência de simbióticos entregues *in ovo* no desenvolvimento e estrutura de órgãos imunes. **Folia Biológica**, v. 62, p. 277 - 285, 2014.

SOLTANI, M.; GHOSH, K.; HOSEINIFAR, S. H.; KUMAR, V.; LYMBERY, A. J.; ROY, S.; RINGØ, E. *Genus bacillus* , promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 27, n. 3, p. 331–379, 2019.

ST-ONGE, M.; FARNWORTH, E. R.; JONES, P. JH. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 674-681, 2000.

SPEAKE, B. K.; DEANS, E. A. Biosynthesis of oleic, arachidonic and docosahexaenoic acids from their C18 precursors in the yolk sac membrane of the avian embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, n. 4, p. 407–414, 2004.

SUNNY, N. E.; BEQUETE, B. J. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. **Journal Animal Science**, v. 89, p. 3945–3953, 2011.

SWANN, J. R.; WANT, E. J.; GEIER, F. M. SPAGOU, K.; WILSON, I. D.; SIDAWAY, J. E.; NICHOLSON, J. K. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. **PNAS**, v. 108, n. 1, p. 4523–4530, 2011.

TAZAWA, H.; PIIPER, J. Carbon dioxide dissociation and buffering in chicken blood during development. **Respiration Physiology**, v. 57, n. 1, p. 123–134, 1984.

TEAGUE, K. D.; GRAHAM, L. E.; DUNN, J. R.; CHENG, H. H.; ANTHONY, N.; LATORRE, J. D.; MENCONI, A.; WOLFENDEN, R. E.; WOLFENDEN, A. D.;

- MAHAFFEY, B. D.; BAXTER, M.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; MERINO-GUZMAN, R.; BIELKE, L. R.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. In ovo evaluation of FloraMax[®]-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 7, p. 2074–2082, 2017.
- TOGHYANI, M.; TAHMASEBI, S.; MODARESI, M.; ALE SAHEB FOSOUL, S. S. Effect of arginine and threonine in ovo supplementation on immune responses and some serum biochemical attributes in broiler chickens. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 342–349, 2019.
- TORRES, C. A.; KORVER, D. R. Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. **Poultry Science**, v. 97, n. 8, p. 2996–3003, 2018.
- THRALL, M.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2015. 688 p.
- TRIPLETT, M. D.; ZHAI, W.; PEEBLES, E. D.; MCDANIEL, C. D.; KIESS, A. S. Investigating commercial in ovo technology as a strategy for introducing probiotic bacteria to broiler embryos. **Poultry Science**, v. 97, n. 2, p. 658–666, 2018.
- UNI, Z.; FERKET, P. R. Alimentação in ovo – Impacto sobre o desenvolvimento intestinal, teor corporal de energia e desempenho. In: **Conferência FACTA 2010 de Ciência e Tecnologia Avícolas**; Santos, São Paulo. Brasil. p. 109-119, 2010.
- UNI, Z.; FERKET, P. R.. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. U.S. Patent No. 6,592,878. Washington, DC: **U.S. Patent and Trademark Office**, 2003.
- UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, n. 11, p. 1747–1754, 2003.
- UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **Worlds Poultry Science**, v. 60, p. 101–11, 2004.
- URSO, U. R. A.; DAHLKE, F.; MAIORKA, A.; BUENO, J. M.; SCHNEIDER, A. F.; SUREK, D.; ROCHA, C. Vitamin E and selenium in broiler breeder diets: Effect on live

performance, hatching process, and chick quality. **Poultry Science**, v. 94, n. 5, p. 976-983, 2015.

WANG, Y.; SUN, J.; ZHONG, H.; LI, N.; XU, H.; ZHU, Q.; LIU, Y. Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

WEN, C.; LI, Q.; LAN, F.; LI, X.; LI, G.; YAN, Y.; WU, G.; YANG, N.; SUN, C. Microbiota continuum along the chicken oviduct and its association with host genetics and egg formation. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101-104, 2021.

VAZ, C. S. L., STRECK A. F.; MICHAEL, G. B. ; MARKS, F. S. , RODRIGUES, D. P., DOS REIS, E. M. F.; CARDOS M.; Canal, C. W. Antimicrobial resistance and subtyping of *S. enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**. v. 89:1530–1536, 2010.

VIECO-SAIZ, N.; BELGUESMIA, Y.; RASPOET, R.; AUCLAIR, E.; GANCEL, F.; KEMPF, I.; DRIDER, D. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, n.57, 2019.

VIEITES, F. M.; FRAGA, A. L.; MORAES, G. H. K.; VARGAS JÚNIOR, J. G.; NALON, R. P.; CORRÊA, G. S. S.; NUNES, R. V. Cálcio, fósforo e proteína total no sangue de frangos de corte em função de níveis de balanço eletrolítico da ração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.887-894, 2011.

YAIR, R.; UNI, Z. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1523–1531, 2011.

YAIR, R.; SHAHAR, R.; UNI, Z. Prenatal nutritional manipulation by in ovo enrichment influences bone structure, composition, and mechanical properties. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2784–2793, 2013.

YAIR, R.; SHAHAR, R.; UNI, Z. In ovo feeding with minerals and vitamin D3 improves bone properties in hatchlings and mature broilers. **Poultry Science**, v. 94, n. 11, p. 2695–2707, 2015.

- YALCIN, S.; ÇABUK, M.; BRUGGEMAN, V.; BABACANOGLU, E.;BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; SIEGEL, P. B. Acclimation to heat during incubation. 1. Embryonic morphological traits, blood biochemistry, and hatching performance. **Poultry Science**, v.87, p.1219-1228, 2008.
- YOUNG, J. I.; ZÜCHNER, S.; WANG, G. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. **Annual Review of Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 545–564, 2015.
- YU, L. L.; GAO, T.; ZHAO, M. M.; LV, P. A.; ZHANG, L.; LI, J. L.; JIANG, Y.; GAO, F.; ZHOU, G. H. In ovo feeding of L-arginine alters energy metabolism in post-hatch broilers. **Poultry Science**, v. 97, n. 1, p. 140–148, 2018a.
- YU, L. L.; GAO, T.; ZHAO, M. M.; LV, P. A.; ZHANG, L.; LI, J. L.; JIANG, Y.; GAO, F.; ZHOU, G. H. Effects of in ovo feeding of l-arginine on breast muscle growth and protein deposition in post-hatch broilers. **Animal**, v. 12, n. 11, p. 2256–2263, 2018b.
- ZHAI, W.; BENNETT, L. W.; GERARD, P. D.; PULIKANTI, R.; PEEBLES, E. D. Effects of in ovo injection of carbohydrates on somatic characteristics and liver nutrient profiles of broiler embryos and hatchlings. **Poultry Science**, v. 90, n. 12, p. 2681–2688, 2011a.
- ZHAI, W.; ROWE, D. E.; PEEBLES, E. D. Effects of commercial in ovo injection of carbohydrates on broiler embryogenesis. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1295–1301, 2011b.
- ZHAI, W.; GERARD, P. D.; PULIKANTI, R.; PEEBLES, E. D. Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings. **Poultry Science**, v. 90, p. 2134–2143, 2011.
- ZHANG, Z. F.; KIM, I. H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry Science**, v.93, n.2, p.364-370, 2014.
- ZHANG, L.; ZHU, X. D.; WANG, X. F.; LI, J. L.; GAO, F.; ZHOU, G. H. Individual and combined effects of in-ovo injection of creatine monohydrate and glucose on somatic characteristics, energy status, and posthatch performance of broiler embryos and hatchlings. **Poultry Science**, v. 95, n. 10, p. 2352–2359, 2016.

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. **Poultry Science**, v. 98, n. 9, p. 3617–3625, 2019.

ZHAO, X.; GUO, Y.; GUO, S.; TAN, J. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6477-6488, 2013.

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**, v. 13, n. 9, p. 1927–1933, 2019.

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 gene expression in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 124(9), p. 903-911, 2020.

ZHU, Y.; ZHAO, J.; WANG, C. ZHANG, F; HUANG, X.; REN, Z.; YANG, X.; LIU, Y.; YANG, X. *Exploring the effectiveness of in ovo feeding of vitamin C based on the embryonic vitamin C synthesis and absorption in broiler chickens*. **Journal Animal Science and Biotechnology** v. 12, p. 86, 2021.