

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS
COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COLINA NA DIETA**

GIOVANI FARINA

Zootecnista – UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos
para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia
Área de Concentração em Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Farina, Giovani

Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de colina na dieta / Giovani Farina. -- 2014.

82 f.

Orientador: Andréa Machado Leal Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Colina. 2. Exigência nutricional. 3. Bioequivalência. 4. Fígado gorduroso. 5. Frangos de corte. I. Ribeiro, Andréa Machado Leal, orient. II. Título.

GIOVANI FARINA
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

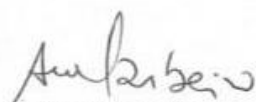
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

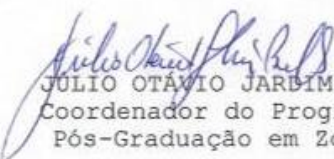
MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

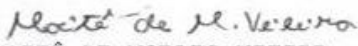
Aprovada em: 31.03.2014
Pela Banca Examinadora

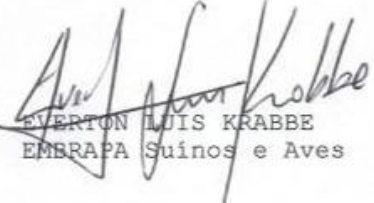
Homologado em: 25.07.2014
Por

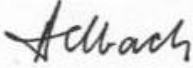

ANDREA MACHADO LEAL RIBEIRO
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientadora


JULIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


ALEXANDRE DE MELLO KESSLER
PPG Zootecnia/UFRGS


MAITÉ DE MORAES VIEIRA
PPG Zootecnia/UFRGS


EVERTON LUIS KRABBE
EMBRAPA Suínos e Aves


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, Teodoro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida e tantas outras coisas, como a fé, o amor, a motivação e a vontade de atingir meus objetivos.

Aos familiares, que são nossos pilares, especialmente aos meus pais Arduino Antonio Farina e Maria Lourdes Carpenedo Farina, que sempre serviram de exemplo para mim. Pela educação que deles recebi, pelo amor e apoio incondicional. Enfim, por TUDO. Amo vocês!

A minha companheira Geruza e ao meu filho Teodoro, pelo amor, companheirismo, carinho, paciência e compreensão nas horas que precisei me afastar em função do trabalho. Amo vocês!

Aos professores que me educaram ao longo da vida, especialmente àqueles da graduação e pós-graduação, pela contribuição direta na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Luciano Trevizan pelo convívio, pela vontade e capacidade de transmitir o conhecimento nas horas que precisei.

A Prof. Dr. Maitê de Moraes Vieira, por toda ajuda prestada e disposição com relação às análises realizadas no Laboratório de Nutrição Animal.

Ao Prof. Dr. Alexandre de Mello Kessler, pela paciência, convívio e pelos valiosos ensinamentos ao longo desse período.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Prof^a Dr. Andréa Machado Leal Ribeiro. Para mim, ela é um exemplo de educadora, dentro e fora da sala de aula. Por ter imediatamente depositado sua confiança em mim, e ter me aceito como orientado, mesmo fora de hora. Devo grande parte deste trabalho a ela.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões para a melhoria deste trabalho.

A todos os estagiários e alunos de pós-graduação do LEZO, pelo convívio, companheirismo, amizade e ajuda nas horas que precisei. Fiz grandes amigos nesse lugar.

Ao pessoal da Empresa Technofeed, pelo financiamento de parte do meu projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos que abriram meus olhos e me mostraram o caminho!

DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COLINA NA DIETA⁽¹⁾

Autor: Giovani Farina

Orientadora: Dr^a. Andréa Machado Leal Ribeiro

RESUMO

A colina é um nutriente essencial às aves, por isso normalmente é suplementada na dieta, mesmo apresentando ampla distribuição nos ingredientes utilizados na alimentação animal. Este trabalho foi conduzido com os objetivos de avaliar o desempenho zootécnico e a bioequivalência de uma fonte comercial de fosfatidilcolina à base de extrato de *Trachyspermum amni*, *Citrullus colocynthis*, *Achyranthus aspera* e *Azadirachta indica* (Biocholine[®]), como alternativa ao cloreto de colina entre 4 e 28 dias (Experimento 1), e avaliar as exigências de colina em frangos de corte entre 1 e 42 dias de idade (Experimento 2). Em ambos os experimentos foi avaliada a incidência de perose e fígado gorduroso, sintomas típicos de deficiência de colina. A análise de fígado gorduroso foi realizada através da determinação de extrato etéreo. Para isso, foram abatidas 56 (Experimento 1) e 15 (Experimento 2) aves ao final dos experimentos. No Experimento 1, 672 machos receberam os seguintes tratamentos: quatro níveis do produto Biocholine[®] (0, 100, 200 e 300 mg/kg) e três níveis de colina suprida pelo cloreto de colina (200, 400 e 600 mg/kg), com 8 repetições por tratamento. No Experimento 2, 462 machos foram suplementados com 0, 200, 400, 600 e 800 mg/kg de colina suprida pelo cloreto de colina, com 8 repetições por tratamento e 10 repetições no nível 0 mg/kg. As dietas foram à base de arroz branco, farelo de soja e glúten de milho. No Experimento 1, as análises de regressão demonstraram resposta quadrática com a utilização do produto Biocholine[®] sobre o ganho de peso (GP) no período total. Ambos os suplementos melhoraram linearmente a conversão alimentar (CA) de 15 a 28 dias, mas a relação das inclinações das linhas de regressão apresentou diferença, indicando que 1 unidade do produto Biocholine[®] equivale a 2,52 unidades de colina suprida pelo cloreto de colina. O consumo de ração (CR) apresentou diferença na fase de 15 a 28 dias e no período total, quando as aves suplementadas com cloreto de colina consumiram mais ração em relação àquelas recebendo Biocholine[®]. No Experimento 2, os níveis de 200 e 400 mg/kg de colina melhoraram o GP em relação às aves sem colina suplementar nos períodos de 8 a 28 e 1 a 42 dias, proporcionando efeito quadrático. A CA e o CR não sofreram influência dos tratamentos em nenhum período. Em ambos os experimentos não foram observados sinais de perose nem fígado gorduroso nas aves. As exigências de colina utilizando os valores calculados foram 1074 e 987 mg/kg para as fases de 1 a 7 e 8 a 28 dias, respectivamente, com base no GP. Nível de colina igual a 510 mg/kg de 29 a 42 dias foi suficiente para atender a exigência nutricional das aves nesse período.

⁽¹⁾ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (76 p.), março de 2014.

PERFORMANCE OF BROILER SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT SOURCES AND LEVELS OF CHOLINE IN THE DIET ⁽¹⁾

Author: Giovani Farina

Advisor: Dr^a. Andréa Machado Leal Ribeiro

ABSTRACT

Choline is an essential nutrient for birds, so it is usually supplemented in the diet, even widely distributed in the ingredients used in animal feed. This study was conducted to evaluate the performance and the bioequivalence of a commercial source of phosphatidylcholine based on *Trachyspermum amni*, *Citrullus colocynthis*, *Achyranthus aspera* and *Azadirachta indica* extract (Biocholine[®]), as an alternative to choline chloride between 4 and 28 days (Experiment 1), and assess the choline requirements in broilers, between 1 and 42 days old (Experiment 2). In both experiments, the incidence of fatty liver and perosis, typical symptoms of choline deficiency, was assessed. The fatty liver analysis was performed by ether extract determination. For that, 56 (Experiment 1) and 15 (Experiment 2) birds were slaughtered at the end of the experiments. In Experiment 1, 672 males received the following treatments: four levels of Biocholine[®] (0, 100, 200 and 300 mg/kg) and three levels of choline (200, 400 and 600 mg/kg) supplied by choline chloride, 8 replicates per treatment. In Experiment 2, 462 males were supplemented with 0, 200, 400, 600 and 800 mg/kg choline supplied by choline chloride, 8 replicates per treatment, and 10 replicates for the level 0 mg/kg. The diets were based on white rice, soybean meal and corn gluten. In Experiment 1, regression analyzes demonstrated a quadratic response using of Biocholine[®] on the total period weight gain (WG). Both supplements improved feed conversion rate (FCR) linearly from 15 to 28 days, but the slope ratio of the regression lines were different, indicating that 1 unit of Biocholine[®] is equivalent to 2.52 units of choline supplied by choline chloride. Feed intake (FI) showed difference from 15 to 28 days and in the total period, when the birds supplemented with choline chloride consumed more feed compared to those receiving Biocholine[®]. In Experiment 2, the levels of 200 and 400 mg/kg choline improved WG related to the birds without supplemental choline between 8-28 and 1-42 days, providing a quadratic effect. FCR was not influenced by the treatments in any period. The FI was affected by the levels of choline between 1 and 28 days, similarly to WG. In both experiments no signs of perosis or fatty liver were observed in birds. Choline requirements based on the calculated values were 1074 and 987 mg/kg for 1 to 7 and 8 to 28, respectively, based on WG. Choline level equal to 510 mg/kg from 29 to 42 was sufficient to meet the nutritional requirement of the birds at this stage.

⁽¹⁾ Masters Dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, (76 p.), march, 2014.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. A colina nos alimentos	13
2.2. História da colina e fosfatidilcolina	15
2.3 Síntese e metabolismo de colina e fosfatidilcolina	16
2.4 Acetilcolina: formação e funções	17
2.5 Função da colina nas membranas celulares	18
2.6 Função lipotrófica da colina	18
2.7 Metabolismo de grupos metil e interações entre colina, betaína e metionina	19
2.8 Relação da colina com o ácido fólico e vitamina B ₁₂	22
2.9 Níveis de colina em dietas práticas	23
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	25
CAPÍTULO II	
Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de colina na dieta	27
Resumo	27
Abstract.....	28
Descrição do problema	28
Materiais e métodos	30
Resultados e discussão	33
Conclusões e aplicações	37
Referências e notas	38
CAPÍTULO III	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICES	60
VITA.....	82

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
TABELA 01: Concentração de colina em alguns ingredientes utilizados na alimentação de aves de acordo com diferentes referências.....	14
CAPÍTULO II	
TABELA 01: Ingredientes e valor nutricional das dietas experimentais, com base na matéria natural.....	42
TABELA 02: Concentração de colina e betaína nos ingredientes e dietas experimentais.....	43
TABELA 03: Desempenho de frangos de corte machos suplementados com diferentes níveis e fontes de colina na dieta (Experimento 1 e 2).....	44
TABELA 04: Análise de contraste entre suplementos para consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) (Experimento 1).....	45
TABELA 05: Equações de regressão utilizando os valores calculados de colina.....	45

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
FIGURA 01: Estrutura química das diferentes formas de colina.....	13
FIGURA 02: Metabolismo da colina.....	16
FIGURA 03: Metabolismo de grupos metil no organismo.....	20
CAPÍTULO II	
FIGURA 01: Comparação entre as retas de regressão do Biocholine® e cloreto de colina para conversão alimentar de 14 a 28 dias.....	46

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A colina, quimicamente denominada 2-hidroxiethyltrimetilamônio, é um sal quaternário de amônio incolor altamente solúvel em água e álcool (Sigma-Aldrich, 2001), embora boa parte esteja ligada aos lipídios na forma de fosfatidilcolina, tanto nos vegetais quanto nos animais. Mesmo que alguns pesquisadores classifiquem a colina como uma vitamina do complexo B, ela não possui as características clássicas deste grupo, pois possui uma função estrutural e a maioria dos animais é capaz de sintetizá-la em quantidade suficiente para atender a demanda (National Research Council, 1987). Porém, aves são incapazes de sintetizar colina até a décima terceira semana de idade (McDowell, 2000), sendo necessário que a mesma esteja presente na dieta. Além disso, sua deficiência em aves causa um sintoma típico, chamado perose, que é caracterizado pelo curvamento do metatarso e da tíbia, fazendo com que a ave permaneça a maior parte do tempo agachada (Titus, 1932), tendo dificuldade para se locomover até o comedouro e bebedouro.

Em 1998, a colina passou a ser considerada um nutriente essencial para humanos pelo Instituto Norte-Americano de Medicina, que também estabeleceu recomendações diárias de consumo (Institute of Medicine, 1998). A colina em si cumpre duas funções no organismo: ser precursora do neurotransmissor acetilcolina (Dale e Dudley, 1929) e doar grupos metil (CH_3) (du Vigneaud et al., 1939), embora a segunda não seja privativa da colina, pois a doação de grupos metil também pode ser realizada pela betaína ou pela metionina.

A colina na forma de fosfatidilcolina é essencial entre os fosfolipídios de membrana (Bataglia e Schimmel, 1997) e atua como agente lipotrófico no fígado, onde é fundamental para a formação de VLDL (Yao & Vance, 1988). É uma das formas mais abundantes de colina nos ingredientes (United States Department of Agriculture, 2011).

O National Research Council de aves (1994) recomenda 1300 mg/kg de colina para frangos até a terceira semana de idade e 1000 mg/kg na fase de quatro a seis semanas. Embora essa tabela seja bastante antiga se levarmos em consideração a constante evolução dos parâmetros produtivos das linhagens, ela ainda serve de referência para diversos nutricionistas, já que a maioria dos trabalhos que determinaram a exigência de colina para frangos de corte com dietas práticas é anterior à tabela citada (Pesti et al., 1980; Baker et al., 1982; Tillman & Pesti, 1986). O constante melhoramento genético a que esses animais têm sido submetidos traz a dúvida quanto à modificação das exigências desse nutriente para as linhagens atuais de frango de corte.

Mesmo que no Brasil milho e soja sejam os ingredientes mais utilizados nas dietas e que os mesmos atinjam valores de colina próximos ou superem as recomendações do NRC, normalmente é feita suplementação via cloreto de colina, que é sintetizado quimicamente e apresenta concentração entre 50 e 75%. O cloreto apresenta problemas operacionais devido à elevada higroscopicidade e pode levar a perdas de vitaminas hidrossolúveis quando adicionado ao premix (Albers et al., 2002), que podem chegar a 38 e 17% ao mês para as vitaminas K_3 e B_1 , respectivamente (Whitehead, 2002). Além do

mais, consumidores buscando alimentos naturais têm criticado o uso de substâncias sintéticas.

Com base nesse cenário, os objetivos deste estudo foram avaliar o desempenho zootécnico e a bioequivalência de um produto comercial, fonte de fosfatidilcolina (Biocholine[®]), de origem vegetal e que não apresenta problemas com higroscopicidade, como alternativa ao cloreto de colina, e avaliar as exigências de colina em frangos de corte de rápido desempenho.

Este documento é estruturado, de forma seqüencial, em três capítulos constituídos por: (1) Introdução geral e revisão bibliográfica; (2) Artigo científico intitulado “Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de colina na dieta, a ser publicado na Revista The Journal of Applied Poultry Research”; (3) Considerações finais, referências bibliográficas e apêndices.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A colina nos alimentos

A colina, quimicamente denominada 2-hidroxi-etiltrimetilamônio, é um sal quaternário de amônio incolor altamente solúvel em água e álcool (Sigma-Aldrich, 2001). Mesmo que alguns pesquisadores classifiquem a colina como uma vitamina do complexo B, ela não possui as características clássicas deste grupo, pois possui uma função estrutural e a maioria dos animais é capaz de sintetizá-la em quantidade suficiente para atender a demanda (National Research Council, 1987), o que não acontece em aves jovens. Para esses animais é necessário que a colina esteja presente na dieta.

Nos alimentos, a colina pode estar presente na forma livre ou como glicerofosfocolina, fosfocolina, fosfatidilcolina e esfingomielina (Zeisel et al., 2003) (Figura 1). Isso faz com que sua quantificação se torne complicada, pois alguns métodos analíticos não extraem todas as formas de colina. Além disso, o grau de aproveitamento de cada fração em um mesmo alimento é diferente. Cheng et al. (1996) aplicaram doses idênticas de colina, glicerofosfocolina, fosfocolina ou fosfatidilcolina radioativa em ratos e observaram que a concentração desses componentes em tecidos como o trato gastrointestinal e o fígado variou, sugerindo variação na biodisponibilidade e utilização entre os diferentes ésteres de colina.

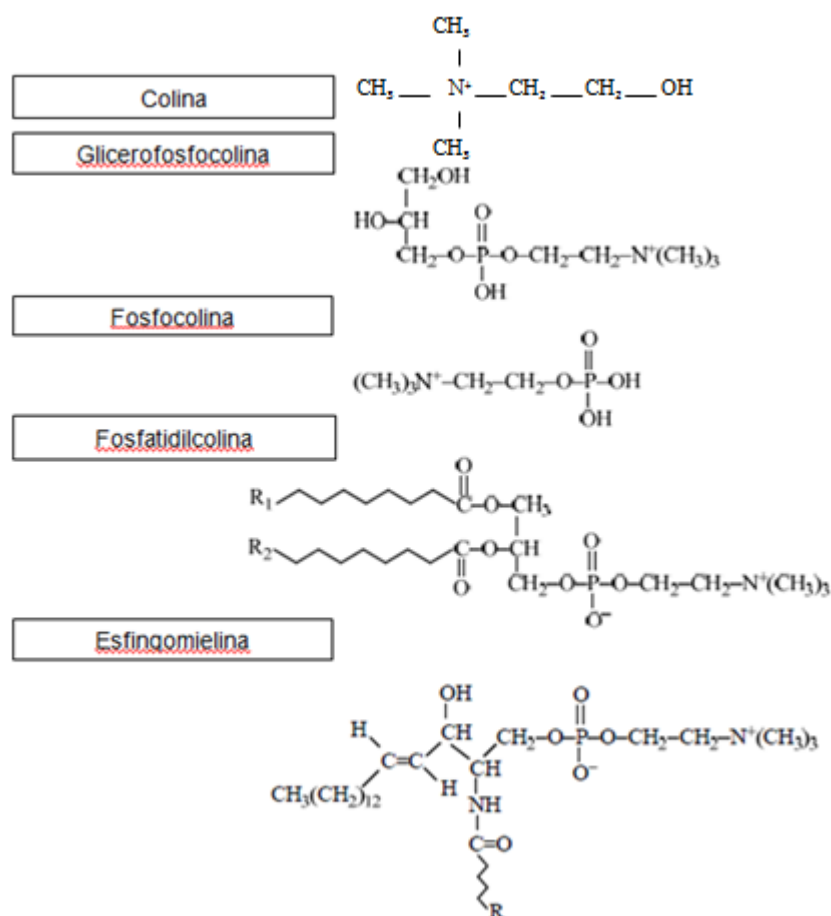


Figura 1: Estrutura química das diferentes formas de colina (Adaptado de Koc et al., 2002).

Na tabela 1 é possível verificar a concentração de colina nos principais ingredientes utilizados na alimentação de aves, assim como a discrepância dos valores para determinados ingredientes. De maneira geral, alimentos de origem animal são fontes ricas em colina, e sua concentração tem relação com o conteúdo de fosfolípidios (Engel,1943). Kettunen et al. (2001) demonstraram que a maior parte da colina está associada ao tecido adiposo na carne de frango, ou seja, associada à fosfatidilcolina. As vísceras são melhores fontes de colina em relação ao músculo, que entre as espécies de mamíferos apresenta pouca variação (Engel,1943). Isso é importante, pois diversas farinhas de origem animal são ingredientes comumente utilizados na alimentação de aves.

Tabela 1: Concentração de colina em alguns ingredientes utilizados na alimentação de aves de acordo com diferentes referências:

Ingrediente	Concentração de colina (mg/kg)	Referência
Milho	1100	Batal et al. (2012)
	620	NRC aves (1994)
	210	Rhian et al. (1943)
Arroz branco	1076	McDowell (2000)
	58	USDA (2008)
Trigo	1053	McDowell (2000)
	320	Rhian et al. (1943)
Cevada	1390	Engel (1943)
	937	Almquist & Maurer (1951)
Farelo de soja	2916	McDowell (2000)
	1160	Rhian et al. (1943)
Glúten de milho 60%	2200	Batal et al. (2012)
	330	NRC aves (1994)
Farinha de carne e ossos 50%	2000	Batal et al.(2012)
Farinha de vísceras de frango	5952	NRC aves (1994)

Cereais geralmente são pobres em colina (Rhian et al., 1943), a maior parte do nutriente está concentrada no gérmen. O milho degerminado perde em torno de 75% da colina e o processamento do trigo para produção da farinha faz com que apenas a metade deste nutriente permaneça no produto final (Engel, 1943). Farelos apresentam valores intermediários, e existe uma certa correlação positiva entre proteína bruta e colina nos ingredientes proteicos (Almquist & Maurer, 1951). O farelo de soja pode apresentar variação dependendo da forma como o grão é industrializado, pois a goma ou lecitina, que é produto do refino do óleo e possui em torno de 20% de fosfatidilcolina (Scholfield, 1981), pode ou não retornar ao farelo na linha de produção. Óleos refinados e gorduras de origem animal possuem quantidade insignificante de

colina (Engel, 1943).

Estudos mostram que a disponibilidade de colina apresenta grande variação de acordo com o ingrediente. Enquanto os farelos de canola e de amendoim apresentam respectivamente 24 e 76% da colina disponível para frangos (Emmert & Baker, 1997), a disponibilidade da colina presente no farelo e grão tostado de soja é de 60-70% e 75%, respectivamente (Molitoris & Baker, 1976). Já trabalhos da década de 90 apontaram que a colina presente no farelo de soja tem disponibilidade que varia de 83 (Emmert e Baker, 1997) a 100% (Menten et al., 1997), assim como a lecitina de soja que é totalmente disponível para frangos (Emmert et al., 1996). É importante lembrar que esses trabalhos consideram a colina do cloreto de colina totalmente disponível, e a disponibilidade calculada dos ingredientes é relativa a este suplemento.

Comparando farelo de colza e de soja na dieta de frangos, March & MacMillan (1980) observaram maior produção de trimetilamina e maior concentração de colina no conteúdo intestinal com o primeiro ingrediente, mostrando que a colina do farelo de soja é melhor aproveitada, com menor degradação no trato gastrointestinal. Além disso, segundo Emmert & Baker (1997), a tostagem excessiva do farelo de soja não altera a disponibilidade da colina, assim como a concentração de colina nos alimentos em geral não sofre influência do cozimento (Zeisel et al., 2003).

2.2. História da colina e fosfatidilcolina

De acordo com McDowell (2000), a colina foi descrita pela primeira vez na forma de fosfatidilcolina por Gobley em 1847 como componente da gema do ovo, dando origem ao termo “lecitina”. Isso porque *lekithos* quer dizer gema em grego. Porém, a colina foi isolada por Strecker a partir da bile de suínos somente em 1849 e por Von Balb & Hirschbrunn em uma semente de mostarda branca (*Sinapis alba*) em 1852. Na década de 1860, Diakonow & Strecker demonstraram que a lecitina contém dois ácidos graxos ligados ao glicerol e uma colina ligada ao terceiro grupo hidroxil, por uma ligação fosfodiéster (Vance & Vance, 2008).

O reconhecimento da colina como nutriente essencial se deve ao estudo realizado por Dale & Dudley (1929), o qual isolou a acetilcolina do pulmão equino, demonstrando ser um constituinte natural do corpo com ação fisiológica sobre o sistema parassimpático (efeito vasodilatador) e estimulando as células ganglionares. Conforme descrito por Zeisel (2012), no ano de 1922 Banting & Best descobriram a insulina estudando cães pancreatectomizados, os quais passaram a desenvolver degeneração gordurosa no fígado. Pesquisas com esses animais continuaram e Hershey & Soskin (1931) chegaram à conclusão que essa síndrome poderia ser corrigida administrando pâncreas cru ou lecitina na dieta.

Em 1932, Best et al. utilizaram dois grupos de ratos, um controle e outro suplementado com lecitina, ambos alimentados com alto teor de gordura (40%), e descobriram que a lecitina era essencial também aos animais saudáveis, com a finalidade de evitar o acúmulo de ácidos graxos no fígado. Dois anos depois, Best & Huntsman (1932) chegaram à conclusão que apenas a colina previnha a síndrome do fígado gorduroso, não acontecendo o mesmo ao ser administrado ácido oleico ou glicerofosfato a ratos.

Em 1940, Jukes demonstrou que a deficiência de colina provoca retardo no crescimento e perose em aves, ocasionando inchaço na articulação metatarso-tibial, com posterior hemorragia no local, tornando a pele verde azulada. Por último, o metatarso e a tíbia tornam-se curvados, fazendo com que a ave permaneça a maior parte do tempo agachada (Titus, 1932). De acordo com McDowell (2000), na metade do século passado foram publicados trabalhos demonstrando a deficiência de colina em hamsters, bezerros, coelhos e porcos-da-índia. Nas décadas de 1950 e 1960, descobriu-se que a colina previne a síndrome “spraddled-leg” em suínos.

2.3 Síntese e metabolismo de colina e fosfatidilcolina

O organismo não apresenta rota bioquímica para a formação direta de colina livre. Porém, indiretamente a síntese é possível através de três metilações sequenciais da fosfatidiletanolamina dando origem à fosfatidilcolina (Figura 2), reação catalisada pela fosfatidiletanolamina N-metiltransferase (Blusztajn et al., 1979). Para isso, os grupos metil são provenientes da metionina, via S-adenosilmetionina. A fosfatidilcolina também pode ser originada a partir da colina preexistente no organismo.

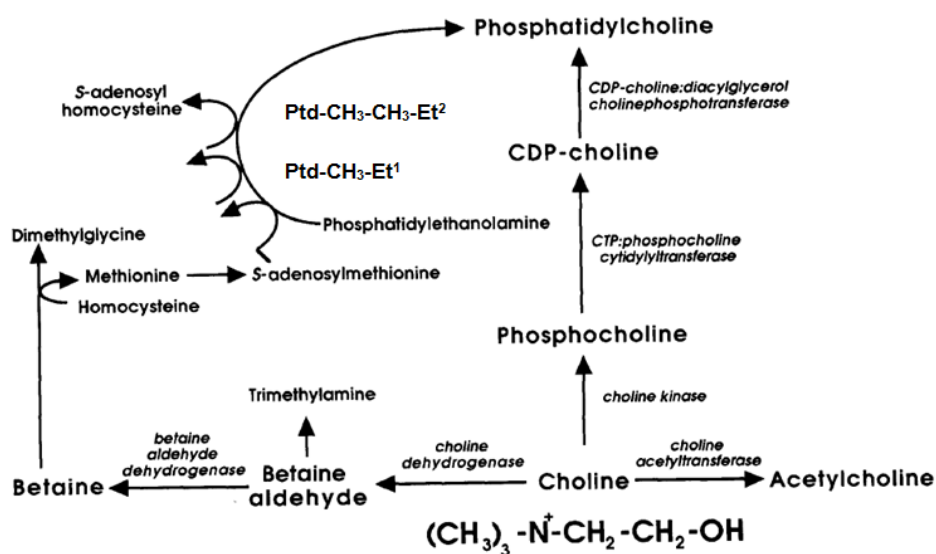


Figura 2: Metabolismo da colina (adaptado de Zeisel, 1990).

¹Fosfatidilmetiletanolamina.

²Fosfatidildimetiletanolamina.

A síntese de colina em aves ocorre da mesma forma que em mamíferos (Kushwaha & Jensen, 1974). Porém, aves não são capazes de metilar a fosfatidiletanolamina (Jukes, 1941), sendo eficazes apenas na utilização de fosfatidilmetiletanolamina e fosfatidildimetiletanolamina como precursoras da colina, o que foi demonstrado através de respostas de desempenho em estudo de Jukes et al. (1945). A literatura empírica aponta que aves jovens são incapazes de sintetizar colina, sendo esta habilidade crescente com o decorrer da idade. Segundo McDowell (2000), frangos são incapazes de sintetizar colina até a décima terceira semana de idade. Porém, Burke et al. (1951) administraram C₁₄-metionina a frangos de um mês de idade e

verificaram que aproximadamente 6,4% desse Carbono marcado foi incorporado à colina da carcaça. Mackenzie et al. (1949) verificaram 11,4% de incorporação do Carbono em mamíferos sem deficiência de colina na dieta, demonstrando a capacidade superior dessa classe em sintetizar colina.

Em aves, verificou-se secreção de colina no duodeno em quantidade de aproximadamente duas vezes o consumo, provavelmente devido à fosfatidilcolina presente na bile. Porém, no próprio duodeno e jejuno proximal ocorre a reabsorção da maior parte dessa colina, assim como da colina dietética (Budowski et al., 1977). A captação de colina pelos enterócitos pode ser mediada por transportadores, que saturam mesmo em baixa concentração, ou por difusão simples (Herzberg & Lerner, 1973). Após absorvida a colina livre entra na circulação portal, por se tratar de uma substância hidrossolúvel (Zeisel, 1981).

Estudo realizado em humanos por De La Hueriga & Popper (1952) mostrou que apenas uma parcela da colina ingerida é absorvida intacta, pois o restante (aproximadamente dois terços) é transformado em trimetilamina, responsável por conferir odor de peixe à carne e ovos (Combs Junior, 2008) e excretada na urina entre 6 e 12 horas após o consumo. A colina ingerida na forma de fosfatidilcolina não está sujeita a tal degradação (Zeisel et al., 1989). Tem sido demonstrado que a produção de trimetilamina aumenta com a maior ingestão de colina (De La Hueriga & Popper, 1951). Microorganismos intestinais são os principais responsáveis por sua formação, sendo que ela foi diminuída abruptamente em animais tratados com antibióticos ou que receberam colina intraperitonealmente, sem passar pelo trato gastrointestinal (Asatoor & Simenhoff, 1965).

A maior parte da colina presente nos ingredientes da dieta está na forma de fosfatidilcolina. Tanto o suco pancreático, quanto as células da mucosa intestinal contém enzimas capazes de hidrolizar essa molécula. A fosfolipase A₂, a qual cliva β -ácidos graxos, é encontrada no suco pancreático (De Haas et al., 1968) e nas células da borda em escova (Subbaiah & Ganguly, 1970). Dentro das células da mucosa, fosfolipase A₁ cliva α -ácidos graxos e fosfolipase B cliva ambos os tipos de ácidos graxos (Subbaiah & Ganguly, 1970). No entanto, estas enzimas atuam muito menos do que a fosfolipase pancreática. O resultado é que a maior parte da fosfatidilcolina ingerida é absorvida como lisolecitina (deacilada na posição β). Dentro da célula intestinal, a lisofosfatidilcolina pode ser deacilada para formar glicerofosforilcolina ou ser acilada para reconstituir a fosfatidilcolina (McDowell, 2000). A fosfolipase B, presente em muitos tecidos, age sobre a fosfatidilcolina formando glicerilfosforilcolina (Zeisel, 1981), a qual pode ser clivada pela enzima glicerilfosforilcolina diesterase, liberando colina livre (Dawson, 1956).

2.4 Acetilcolina: formação e funções

A acetilcolina é um neurotransmissor liberado na terminação dos nervos parassimpáticos (Wauben & Wainwright, 1999). É formada na reação da acetil coenzima A com a colina, sendo catalizada pela enzima colina acetiltransferase (Nachmansohn & Machado, 1943), que é altamente concentrada nas terminações nervosas colinérgicas (Fonnum, 1973). A reação inversa é realizada pela enzima colinesterase (Jukes, 1947).

Foi observado que a administração intraperitoneal de cloreto de colina aumentou as concentrações de colina do soro, colina e acetilcolina no cérebro de ratos (Haubrich et al., 1975; Cohen & Wurtman, 1975). O conteúdo de acetilcolina dos neurônios periféricos colinérgicos e dos tecidos também aumentou em porcos da Índia submetidos ao mesmo procedimento (Haubrich et al., 1975; Haubrich et al., 1974). Já a suplementação de colina na dieta aumentou os níveis de colina e acetilcolina cerebrais em ratos (Cohen & Wurtman, 1976). Em aves, verificou-se que o aumento nos níveis de acetilcolina causaram leve aumento, porém significativo, no fluxo de suco pancreático, sem alterar a atividade da amilase (Salido et al., 1985).

2.5 Função da colina nas membranas celulares

Na membrana celular, os fosfolípidos estão organizados em dupla camada, sendo que as porções hidrofóbicas, constituídas pelos ácidos graxos, se voltam para o interior da membrana, deixando os grupos fosfato, que são hidrofílicos, voltados para os meios aquosos intra e extracelular. A passagem de nutrientes hidrossolúveis para o interior da célula acontece via canais de proteína ou proteínas carreadoras na membrana (Guyton, 2006).

A fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol são os fosfolípidos constitutivos que formam um quadro estrutural e o ambiente que define as funções associadas com cada tipo de célula. Fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol proporcionam membranas de superfície hidratadas ou carregadas, permitindo que tanto a água quanto os íons se liguem aos seus grupos polares. Em contraste, as superfícies ricas em fosfatidiletanolamina são hidrofóbicas, pouco hidratadas e promovem interações superfície-superfície, sem ligação direta de proteína (Bataglia & Schimmel, 1997). Os fosfolípidos são distribuídos assimetricamente entre a camada interna e externa das membranas celulares; enquanto a fosfatidilcolina e esfingomiélica encontram-se preferencialmente na camada exterior, a fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina estão localizadas na camada interna (Op den Kamp, 1979).

A fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina são os componentes mais abundantes da membrana, cada um representando cerca de 35% da massa dos fosfolípidos. A fosfatidilserina e o fosfatidilinositol são menos abundantes, representando cerca de 13% e menos de 5%, respectivamente. A esfingomiélica contribui com aproximadamente 20% dos lípidos de membrana (Bataglia & Schimmel, 1997). Pesquisas demonstram que o perfil de ácidos graxos dos fosfolípidos da membrana plasmática hepática de ratos é influenciado pelo nível de inclusão e o tipo de gordura na dieta (Neelands & Clandinin, 1983). Foi encontrado efeito similar na deposição de fosfatidilcolina da membrana cerebral de acordo com a fonte de gordura dietética (Foot et al., 1982). Esses mesmos autores observaram que o fornecimento de lecitina ocasionou as maiores concentrações de fosfatidilcolina esfingomiélica quando comparado ao fornecimento de óleo de soja, girassol e colza. Também no tecido adiposo de ratos a mesma modulação dietética foi encontrada (Awad & Zepp, 1979).

2.6 Função lipotrófica da colina

A forma de absorção lipídica em aves acontece de maneira muito semelhante aos mamíferos, embora pelo sistema porta-hepático, com a formação de lipoproteínas estruturalmente similares às quilomícrons para o transporte de mono, di e triglicerídeos, contendo aproximadamente 1% de fosfolípidios (Bensadoun & Rothfeld, 1972). Yao & Vance (1988) comprovaram que a fosfatidilcolina é responsável por remover os lipídios do fígado, pois ela é fundamental para a formação da VLDL, que por sua vez transporta a gordura até os tecidos. Tidwell (1956) demonstrou que a fosfatidilcolina melhorou a absorção lipídica em ratos. Trabalhando com a mesma espécie, Rioux et al. (1994) e LeBlanc et al. (1998) observaram que a administração de fosfatidilcolina na dieta causou aumento no fluxo de suco biliar, na concentração da mesma no suco e no aumento de colesterol biliar (Rioux et al., 1994), fazendo com que a fosfatidilcolina cumpra indiretamente papel emulsificante na digestão das gorduras.

A colina pode ser transformada em fosfatidilcolina no organismo (Kennedy e Weiss, 1956). Nesse sentido, o aumento no nível de colina na dieta também provocou maior secreção de lecitina biliar (Robins & Armstrong, 1976) e síntese de suco biliar (LeBlanc et al., 1998) em ratos, o que significa melhor emulsificação da gordura dietética na luz intestinal. Kummerow et al. (1949) observaram aumento na exigência de colina em aves com o aumento do nível de inclusão de gordura na dieta, o que pode estar relacionado com a maior demanda de secreção biliar para manter o processo digestivo da gordura, para o qual a colina é fundamental. Quillin et al. (1961) e Pesti et al. (1979) utilizaram dietas com elevado teor de gordura (aproximadamente 9%) e também encontraram resposta para a suplementação de colina sobre dietas em que normalmente não seria observada deficiência (1500 mg/kg de colina).

Embora Best et al. (1932) tenha descoberto que a deficiência de colina provoca acúmulo de gordura no fígado, posteriormente verificou-se que essa síndrome é ocasionada pela carência de grupos metil na dieta, e não apenas pela deficiência de colina (Cook et al., 1989). Nesse sentido, Treadwell (1948) e Beveridge et al. (1945) demonstraram que a metionina é capaz de reduzir a gordura do fígado de ratos alimentados com dietas deficientes em colina. Ryu et al. (1995) e Pompeu et al. (2011) não observaram diferença no percentual de gordura dos fígados com a suplementação de colina em dietas à base de milho e soja, o que pode ser explicado pelos níveis normais de metionina utilizados. Lipstein et al. (1977) verificaram deposição semelhante de lipídios no fígado de aves alimentadas com dietas práticas (1942 mg/kg de colina) e semi-purificadas (268 mg/kg de colina).

2.7 Metabolismo de grupos metil e interações entre colina, betaína e metionina

A S-adenosilmetionina, formada pela adenilação da metionina via S-adenosilmetionina sintetase, é a molécula doadora de grupos metil (CH₃) em praticamente todas as metilações biológicas conhecidas (Mudd & Poole, 1975). Mais de 100 reações de metilação envolvendo a metionina são conhecidas, incluindo a regulação do DNA e a síntese de importantes metabólitos como a creatina e carnitina, além da própria fosfatidilcolina. Mudd & Poole (1975) realizando um levantamento na literatura verificaram a presença de 35

diferentes compostos metilados excretados na urina de humanos, excluindo metionina, colina e betaína. No entanto essa pesquisa não fez distinção entre os componentes dietéticos e sintetizados pelo organismo. Segundo estudos com humanos feitos por Mudd et al. (1980), a síntese de creatina no fígado é a maior consumidora de grupos metil no organismo, consumindo aproximadamente 75% da S-adenosilmetionina (SAM) disponível. Do restante, foi estimado que a formação de fosfatidilcolina via fosfatidiletanolamina N-metiltransferase consome 15% da SAM e os outros 10% são utilizados para outras transmetilações e síntese de poliaminas.

A figura 3 demonstra as rotas de doação de grupos metil no organismo e regeneração da metionina. A colina participa desse processo, já que ela é capaz de regenerar a metionina com a doação de grupos metil à homocisteína (du Vigneaud et al., 1939), embora aves não realizem essa rota de maneira eficiente (Harter & Baker, 1978). De acordo com Zeisel (1990), a doação de grupos metil é a maior consumidora de colina no organismo humano. Posteriormente se verificou que a colina não está diretamente envolvida nas reações de metilação, devendo primeiro ser oxidada à betaína (du Vigneaud et al., 1946), reação de duas etapas, sendo primeiro formada betaína aldeído pela enzima colina desidrogenase e então convertida à betaína pela ação da betaína aldeído desidrogenase (Zeisel, 1981).

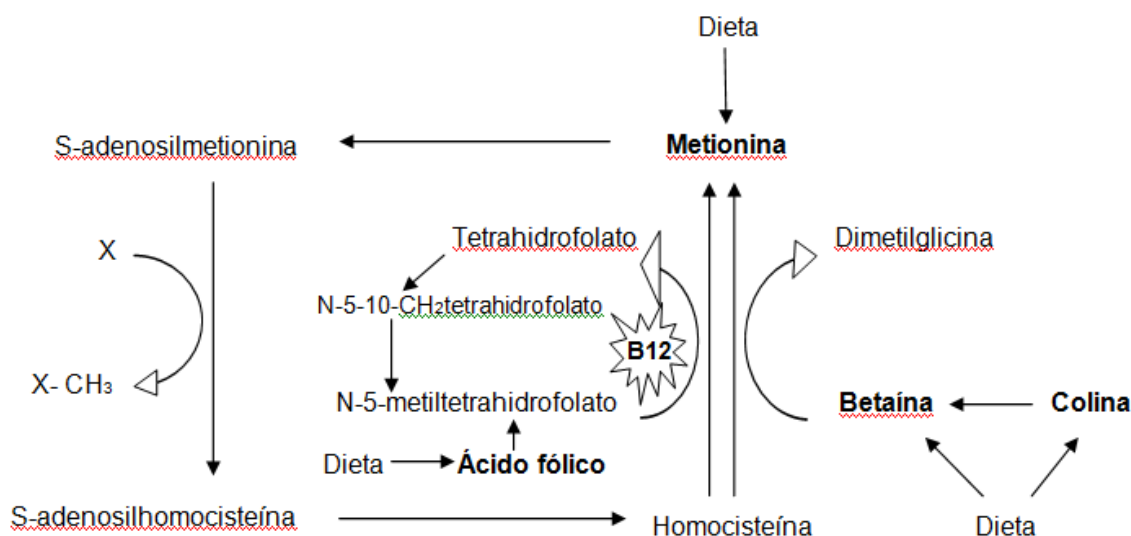


Figura 3: Metabolismo de grupos metil no organismo (adaptado de Brosnan et al., 2004)

Pomfret et al. (1990) observaram queda na concentração de metionina e S-adenosilmetionina no fígado de ratos alimentados com dietas deficientes em colina. Por outro lado, a suplementação de colina em dietas sem metionina suplementar proporcionou aumento na remetilação da homocisteína em frangos, embora não tenha sido verificado melhora no desempenho (Pillai et al., 2006).

Trabalhando com dietas purificadas, Dilger et al. (2007) observaram efeito poupador de colina com o uso de betaína, encontrando exigências de colina para frangos do 8º ao 19º dia de 20,8 e 10,5 mg/dia, sem betaína

suplementar e com adição de 1000 mg/kg betaína, respectivamente. Quando esses valores foram transformados para concentração de colina na dieta a exigência ficou próxima a 722 e 412 mg/kg. Nesse trabalho, a betaína proporcionou melhora nos parâmetros produtivos apenas quando as dietas continham uma dose mínima de colina (aproximadamente 150 mg/kg), demonstrando claramente que a betaína não é capaz de atender a necessidade por acetilcolina e fosfatidilcolina. Em um experimento conduzido com frangos de crescimento lento alimentados com ração à base de milho, soja e glúten de milho do 1º ao 56º dia, Hassan et al. (2005) verificaram que a adição de 720 ou 1440 mg/kg de betaína à dieta basal contendo 872 mg/kg de colina melhorou o GP e a CA independentemente do nível suplementar de colina das dietas (0, 300 e 600 mg/kg). Além disso, a inclusão de betaína provocou diminuição linear no percentual de gordura abdominal, e a colina interferiu diminuindo esse efeito. Esse trabalho concluiu que a suplementação com 720 mg/kg de betaína substituiu até 600 mg/kg de colina suplementar. Jahanian & Rahmani (2008) testaram a substituição de 0, 50 ou 100% da colina suplementar (1000 mg/kg) por betaína em frangos de 1 a 49 dias. As dietas foram à base de milho e soja. Os resultados desse trabalho mostram melhores respostas para a betaína em relação à colina, pois a inclusão do primeiro nutriente melhorou o desempenho nas fases iniciais, se traduzindo em aumento no GP de 1 a 21 dias e diminuição na CA entre 21 e 35 dias. Além disso, a betaína proporcionou melhor rendimento de carcaça e peito, além de haver menor deposição de gordura abdominal.

Existem diversos estudos na literatura sobre a relação entre metionina e colina na dieta de frangos de corte. Segundo Almquist & Grau (1945), a colina pode poupar metionina apenas quando há deficiência de grupos metil na dieta. Baker et al. (1982) utilizaram dietas milho-soja e encontraram melhora no índice de CA de 8 a 25 dias com a suplementação de 217 mg/kg de colina apenas nas rações com baixo nível de metionina suplementar (sem suplementação ou 0,05%). Já a exigência de metionina não foi afetada pela colina. Dessa forma, os autores concluíram que a colina não possui capacidade de poupar metionina, sendo que a metionina pode reduzir a necessidade de colina, embora isso não seja economicamente viável. Resultados semelhantes foram observados por Blair et al. (1986), que não encontraram diferenças no GP, CR e eficiência alimentar de perus (3-8 semanas) com a suplementação de 2000 mg/kg de cloreto de colina em dietas contendo metionina suplementar, obtendo melhora apenas na eficiência alimentar quando as dietas não foram suplementadas com metionina. As dietas foram à base de milho e soja, contendo 1250 mg/kg de colina. Com base nesse resultado, os autores afirmaram que a colina possui pouco ou nenhum efeito poupador de metionina em dietas práticas.

Resultados contrários foram obtidos por Pesti et al. (1979), que encontraram melhora no GP e CA de frangos entre 1 e 21 dias com a suplementação de 0,43% de DL-metionina, 0,46% de betaína HCl ou 0,23% de colina em relação à dieta basal. Esse trabalho conclui que tanto a betaína quanto a colina poupam metionina. A dieta basal foi à base de milho e soja com 0,75% de aminoácidos sulfurados totais e 1499 mg/kg de colina. De maneira semelhante, Quillin et al. (1961) encontraram exigência interdependente entre

metionina e colina, sendo que a colina provocou maior aumento no GP com os menores níveis de metionina e vice-versa. A dieta basal continha 0,38% de metionina e 1540 mg/kg de colina, sendo que a metionina suplementar foi até 0,11% e a colina até 440 mg/kg.

Gallinger (1997) avaliou a relação entre betaína, metionina e colina em dietas semi-purificadas em frangos de corte de 1 a 21 dias e encontrou exigência interdependente de metionina e colina. Ainda assim, a inclusão de betaína diminuiu as exigências de metionina e colina. A exigência do último nutriente variou de 1399 a 1423 mg/kg com e sem betaína suplementar, respectivamente. Uma resposta interessante nesse trabalho foi o aumento no percentual de gordura da carcaça ocasionado pelo maior nível de colina (1710 mg/kg) nas dietas em relação aos tratamentos com 560 mg/kg de colina.

2.8 Relação da colina com o ácido fólico e vitamina B₁₂

A interrelação da colina com o ácido fólico e a vitamina B₁₂ acontece devido ao processo de remetilação da homocisteína (Figura 3). A metionina, através da S-adenosilmetionina, é a doadora primária de grupos metil no organismo, sendo que ao doar o grupo metil ocorre a formação de homocisteína. Porém, a homocisteína pode ser remetilada para formar metionina *de novo* (Finkelstein & Martin, 1984). Isso acontece com a doação de grupos metil pelo N-5-metiltetrahidrofolato, proveniente do ácido fólico, ou betaína, proveniente da colina.

No fígado de ratos, as reações de metilação realizadas tanto pelo ácido fólico quanto pela betaína são igualmente importantes (Finkelstein & Martin, 1984). A reação com N-5-metiltetrahidrofolato é catalisada pela enzima metionina sintetase, a qual é dependente da vitamina B₁₂ (Kerwar et al., 1966). Já a reação com betaína não depende da B₁₂ e é catalizada pela enzima betaína:homocisteína metiltransferase (Finkelstein & Martin, 1984). Miller et al. (1994) administraram dietas deficientes em ácido fólico a ratos e encontraram diminuição no nível de S-adenosilmetionina hepática. Nesses trabalhos percebeu-se correlação negativa entre os níveis de S-adenosilmetionina e S-adenosilhomocisteína ou homocisteína, mostrando que o ácido fólico é importante no processo de remetilação e que sua deficiência ocasiona incapacidade de regenerar a metionina. Como resultado ocorre acúmulo de S-adenosilhomocisteína e homocisteína, aliado à queda nos níveis de metionina e consequentemente, S-adenosilmetionina, devido à interrupção do ciclo.

Horne et al. (1989) forneceram dietas sem metionina e colina durante 5 semanas e observaram diminuição de 40-50% na concentração de ácido fólico no fígado de ratos em relação ao grupo controle. No mesmo sentido, Kim et al. (1994) observaram que a concentração de colina hepática foi reduzida em 65% em ratos submetidos à deficiência severa de ácido fólico, e a redução de fosfocolina foi de 80%. Essa redução pode ser explicada pela maior oxidação de colina à betaína, para compensar a menor atividade do ácido fólico na doação de grupos metil para regenerar metionina a partir da homocisteína. A segunda explicação é a menor síntese de fosfatidilcolina a partir da fosfatidiletanolamina, que depende da doação de grupos metil oriundos da S-adenosilmetionina (Zeisel, 1990), já que os autores encontraram menor concentração de S-adenosilmetionina no fígado dos animais com deficiência de

ácido fólico.

2.9 Níveis de colina em dietas práticas

A maioria dos trabalhos que determinaram a exigência de colina para frangos de corte com dietas práticas são bastante antigos. Baker et al. (1982) encontraram exigência de 1200 mg/kg de colina entre 8 e 25 dias utilizando uma dieta com 0,38% de metionina e 0,39% de cistina. Valores superiores foram observados por Pesti et al. (1980), entre 1910 e 4100 mg/kg de colina para a fase de 1 a 21 dias de acordo com o modelo matemático utilizado, e atribuíram esses elevados valores à deficiência de metionina das dietas experimentais (0,32% de metionina e 0,42% de cistina). Tillman & Pesti (1986) também observaram melhora no GP aos 21 dias com a suplementação de 900 mg/kg de colina em uma dieta com níveis elevados do nutriente (1320 mg/kg) e níveis normais de metionina e cistina (0,45 e 0,47%, respectivamente). Nesses trabalhos foram utilizadas linhagens de rápido desempenho. Ryu et al. (1995) testaram a suplementação de ácido fólico e três níveis de colina: 0,500 e 1000 mg/kg sobre uma dieta milho e soja com níveis normais de metionina e cistina (0,82%), mas deficiente em colina (754 mg/kg), obtida através da extração da colina do farelo de soja com metanol. Com níveis normais de ácido fólico suplementar (0,5 mg/kg), a adição de 500 mg/kg de colina (total de 1254 mg/kg) foi suficiente para maximizar os índices de GP e CA de 1 a 18 dias. Waldroup et al. (2006) observaram melhora na CA e no rendimento de peito aos 42, 49 e 56 dias com suplementação de 1000 mg/kg de colina em dieta contendo entre 1193 (1 a 14 dias) e 925 mg/kg de colina (42 a 56 dias), sem alteração no GP e no rendimento de carcaça. Resultados semelhantes foram obtidos por Pompeu et al. (2011), que observaram diferença apenas para a CA de frangos aos 21 dias, com resposta linear para esta variável com a suplementação de até 400 mg/kg de colina em dieta basal contendo 1367 mg/kg do nutriente, 0,47% de metionina e 0,29% de cistina. Swain & Johri (2000) utilizaram uma dieta contendo 1300 mg/kg de colina e não observaram efeito da suplementação sobre o desempenho aos 42 dias. Porém, a suplementação de 2000 mg/kg de colina melhorou a resposta imune celular, aumentando a inibição da migração de leucócitos e o título de anticorpos para a Doença de Newcastle. Os autores concluíram que a quantidade de colina para uma boa saúde é superior do que a necessária para bom desempenho. Todos os trabalhos citados anteriormente utilizaram dietas à base de milho e soja.

As tabelas do National Research Council de aves (1994) são uma das poucas que indicam a exigência de colina, levando em consideração sua concentração nos ingredientes, e não apenas o nível suplementar, que é um valor genérico. Por esse motivo, elas ainda servem como referência para diversos profissionais da nutrição animal, mesmo que sejam baseadas em trabalhos bastante antigos. Suas recomendações de colina são 1300 mg/kg até a terceira semana de idade e 1000 mg/kg na fase de quatro a seis semanas, porém a recomendação para a fase inicial é baseada no National Research Council de 1984. É importante salientar que esses níveis são relativos a uma dieta com 3200 kcal/kg de Energia Metabolizável, devendo ser corrigidos de acordo com o nível energético da dieta. Os trabalhos citados a seguir indicam

apenas o nível de colina suplementar para frangos de corte: Rostagno et al. (2011) recomendam 375 mg/kg de colina na primeira semana, decrescendo para 225 mg/kg de 34 a 42 dias. Albers et al. (2002) recomendam 400 a 700 mg/kg na fase inicial e 300 a 600 mg/kg nas demais fases, se aproximando das recomendações da indústria (DSM, 2011), que são de 400 a 700 mg/kg entre 1 e 24 dias e 400 a 600 mg/kg de 25 dias até o abate.

A suplementação de colina nas dietas para frangos de corte é normalmente realizada através do cloreto de colina. Porém, este produto apresenta o inconveniente de ser altamente higroscópico, podendo levar a perdas de vitaminas hidrossolúveis quando adicionado ao premix devido ao aumento no teor de água livre na mistura, resultando em maior potencial reativo. Além disso, essa característica causa problemas operacionais na fábrica de ração, devido ao empedramento do produto (Albers et al., 2002).

Um aspecto que sempre deve ser considerado nas pesquisas com colina é o seu peso molecular, pois na literatura são encontrados erros com relação a esse critério. O peso molecular da colina é 104,11 g, já a molécula de cloreto de colina, suplemento mais comum na alimentação animal, pesa 139,63 g. Portanto, o Cloro representa 25,4% dessa molécula, e esse valor deve ser descontado, pois as funções biológicas são realizadas apenas pela colina em si. Embora na maioria dos trabalhos não seja possível conhecer a base utilizada, pois eles não trazem os níveis de cloreto de colina nos diferentes tratamentos, em alguns casos fica evidente que o percentual de Cloro não foi descontado (Pompeu et al., 2011) ou foi feito de forma equivocada (Reis et al., 2012). Erros também podem ser verificados em trabalhos metodológicos. Menten e Pesti (1998) desenvolveram uma técnica de análise de colina em ingredientes, e utilizaram o peso molecular da hidroxí-colina (121,2 g), superestimando os valores em aproximadamente 16%.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

As hipóteses sustentadas no presente estudo são: (1) A fosfatidilcolina é uma fonte viável de colina para frangos; (2) O produto comercial Biocholine® pode substituir o cloreto de colina em dietas para frangos; (3) A exigência de colina têm sofrido mudanças devido às constantes alterações nas características produtivas desses animais.

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar o desempenho zootécnico e a bioequivalência de uma fonte de fosfatidilcolina (Biocholine®), de origem vegetal e que não apresenta problemas com higroscopicidade, em relação ao cloreto de colina na dieta de frangos.

2. Avaliar as exigências de colina em frangos de corte de rápido desempenho entre 1 e 42 dias de idade.

3. Avaliar a incidência de perose e fígado gorduroso em frangos suplementados com diferentes níveis de Biocholine® e cloreto de colina na dieta.

CAPÍTULO II⁽¹⁾

⁽¹⁾Artigo submetido para a Revista The Journal of Applied Poultry Research

Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de colina na dieta

Fontes e níveis de colina em frangos

G. F. Farina, A. M. L. Ribeiro¹, A. M. Kessler, P. D. Ebling, F. R. Marx

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS, Brazil

Autor para correspondência: aribeiro@ufrgs.br

Resumo

Dois experimentos foram conduzidos para avaliar a bioequivalência de um produto comercial fonte de fosfatidilcolina (Biocholine[®]) como alternativa ao cloreto de colina e as exigências de colina em frangos de corte de linhagem de rápido desempenho. No Experimento I, 672 frangos receberam quatro níveis de Biocholine[®] (0, 100, 200 e 300 mg/kg) e três níveis de colina (200, 400 e 600 mg/kg) suprida pelo cloreto de colina entre 4 e 28 dias. No Experimento II, 462 frangos foram suplementados com 0, 200, 400, 600 e 800 mg/kg de colina suprida pelo cloreto de colina de 1 a 42 dias. Em ambos os experimentos, as dietas foram à base de arroz branco, farelo de soja e glúten de milho. No Experimento I, aves suplementadas com cloreto de colina consumiram mais ração em relação àquelas recebendo Biocholine[®]. Ambos os suplementos melhoraram linearmente a CA de 15 a 28 dias, mas as inclinações das retas foram diferentes para essa resposta ($P < 0,05$), mostrando que 1 unidade (U) de Biocholine[®] equivaleu a 2,52 U de colina, suprida pelo cloreto de colina. No Experimento II, a suplementação de colina causou efeito quadrático sobre o GP, sem afetar a CA. As exigências de colina foram 778, 632 e 645 mg/kg para as fases de 1 a 7, 1 a 35 e 1 a 42 dias, respectivamente, com base no GP.

Palavras chave: Fosfatidilcolina, bioequivalência, exigência nutricional, perose, fígado

gorduroso.

Audiência primária: Nutricionistas, pesquisadores, produtores de frango de corte.

Abstract

Two experiments were conducted to evaluate the bioequivalence of a commercial product, source of phosphatidylcholine (Biocholine[®]), as an alternative to choline chloride and choline requirements in fast-growing broilers. In Experiment I, 672 broiler chickens received four levels of Biocholine[®] (0, 100, 200 and 300 mg / kg) and three levels of choline (200, 400 and 600 mg/kg) supplied by choline chloride between 4 and 28 days. In Experiment II, 462 broilers were supplemented with 0, 200, 400, 600 and 800 mg/kg of choline supplied by choline chloride from 1 to 42 days. In both experiments, diets were based on white rice, soybean meal and corn gluten. In Experiment I, birds supplemented with choline chloride consumed more feed compared to those receiving Biocholine[®]. Both supplements improved FCR linearly from 15 to 28 days, but regression lines were different for this response ($P < 0.05$), indicating that 1 unit (U) of Biocholine[®] was equivalent to 2.52 U of choline supplied by choline chloride. In Experiment II, choline supplementation caused quadratic effect on WG without affecting FCR. The choline requirements were 778, 632 and 645 mg/kg to phases 1 to 7, 1 to 35 and 1 to 42 days, respectively, based on WG.

Key words: Phosphatidylcholine, bioequivalence, nutritional requirement, perosis, fatty liver.

Descrição do problema

A colina é um nutriente que apresenta três funções metabólicas essenciais: é constituinte dos fosfolipídios de membrana [1], participa do metabolismo hepático dos lipídios prevenindo o acúmulo de gordura no fígado [2] e é precursora do neurotransmissor acetilcolina [3], além de prevenir a perose em aves [4].

Adicionalmente, a colina pode ser oxidada à betaína para doar grupos metil [5], função que reparte com a metionina. Segundo Zeisel (1990) [6], essa função é a maior consumidora de colina no organismo. Trabalhos demonstram que a exigência nutricional de colina e metionina é interdependente, ou seja, o aumento no nível de um desses nutrientes provoca a diminuição na exigência do outro [7]. De maneira semelhante, maior nível de betaína na dieta causa diminuição na exigência de colina [8]. Por conta de sua importância, a colina é normalmente suplementada nas dietas para frangos de corte na forma cloreto de colina. Porém, este produto pode levar a perdas de vitaminas hidrossolúveis quando adicionado ao premix devido ao aumento no teor de água livre na mistura, resultando em maior potencial reativo, o que se deve à elevada higroscopicidade do cloreto de colina, que também causa problemas operacionais na fábrica de ração [9]. As exigências nutricionais de colina estão baseadas em estudos realizados décadas atrás [10, 11], sendo que ao longo do tempo significantes mudanças ocorreram na formulação das dietas e principalmente no desempenho das aves.

A colina pode estar presente nos alimentos na forma livre ou complexada na forma de fosfocolina, glicerofosfocolina, esfingomielina ou fosfatidilcolina [12]. Esta última constitui uma importante forma de colina presente nos ingredientes de origem vegetal [13]. No organismo, a fosfatidilcolina é responsável por remover os lipídios do fígado, pois ela é fundamental para a formação das Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade (VLDL) [14], que por sua vez transportam a gordura até os tecidos. A fosfatidilcolina também é um importante fosfolípido de membrana, constituindo 35% dos fosfolípidos presentes nesse local [1].

Os objetivos deste estudo foram avaliar a bioequivalência de um produto comercial fonte de fosfatidilcolina (Biocholine[®]) como alternativa ao cloreto de colina, com base no desempenho zootécnico e avaliar as exigências de colina em uma linhagem

de frango de corte, de rápido desempenho. A incidência de perose e fígado gorduroso também foi investigada.

Materiais e métodos

Todos os procedimentos utilizados nesse experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob protocolo nº 24156. Dois experimentos foram conduzidos: o primeiro para avaliar a bioequivalência do produto Biocholine® [15] (extrato vegetal de baixa higroscopicidade, fonte de fosfatidilcolina, à base de *Trachyspermum amni*, *Citrullus colocynthis*, *Achyranthus aspera* e *Azadirachta indica*) como alternativa ao cloreto de colina. O segundo experimento foi realizado para determinar as exigências de colina para frangos de corte de rápido desempenho, visto que no Experimento I as aves não mostraram nenhum sintoma de deficiência com os níveis empregados. Em ambos os experimentos as aves foram alojadas em local climatizado, sobre cama de maravalha em boxes de 1m² com bebedouros *nipple* e comedouros tubulares. Água e alimento foram oferecidos *ad libitum*, com programa de iluminação artificial, com 24 h de luz.

No Experimento I, 672 machos de um dia de idade foram alojados em 56 boxes, com 12 aves/box. No Experimento II, 462 machos de um dia de idade foram alojados em 42 boxes, 11 aves/box. Em ambos os experimentos, foram utilizadas aves da linhagem Cobb 500, vacinadas no incubatório contra a doença de Marek, bronquite infecciosa, boubá aviária e gumboro. No início do período experimental, todas as aves foram distribuídas de maneira uniforme com peso semelhante dentro de cada box ($\pm 5\%$ do peso médio do lote). Os programas de alimentação foram de 4 a 21 e 22 a 28 dias de idade (Experimento I), e 1 a 21, 22 a 35 e 36 a 42 dias de idade (Experimento II).

Em ambos os experimentos foram selecionados ingredientes com baixos níveis de colina para o estudo do efeito da suplementação. As dietas foram à base de arroz

branco, glúten de milho (60% PB) e farelo de soja com e sem goma, respectivamente para o Experimento I e II (Tabela 1). O valor de colina do arroz branco foi obtido das tabelas do USDA (2008) [13], e o da proteína isolada de soja foi fornecido pelo fabricante [16]; para os demais ingredientes foi utilizado o valor de colina das tabelas do NRC de suínos (1998) [17]. Com o intuito de evitar sinais acentuados de deficiência de colina no Experimento I, as aves foram criadas até o quarto dia de idade com uma dieta à base de milho e farelo de soja formulada para atender os níveis nutricionais propostos por Rostagno et al. (2011) [18] para esta fase, com 1300 mg/kg de colina. Devido à falta de sinais de deficiência no Experimento I, no Experimento II os valores de colina das dietas basais foram reduzidos, pela utilização de proteína isolada de soja e farelo de soja sem goma. Todas as dietas experimentais foram fareladas, isonutritivas e isoenergéticas, formuladas para atender os níveis nutricionais propostos por Rostagno et al. (2011) [18], exceto para colina.

No Experimento I foram comparados quatro níveis de Biocholine[®] (0, 100, 200 e 300 mg/kg) e três níveis de colina (200, 400 e 600 mg/kg), formando 7 tratamentos, distribuídos em 8 repetições. No Experimento II, foram suplementados 0, 200, 400, 600 e 800 mg/kg de colina, formando 5 tratamentos distribuídos em 8 repetições, com exceção do nível 0 mg/kg, com 10 repetições. Os níveis utilizados no Experimento II foram selecionados para abranger tanto a porção linear e platô das curvas de resposta de desempenho. As exigências foram determinadas calculando o ponto de máxima das equações de ganho de peso (GP), considerando os períodos acumulados para evitar a interferência do tratamento prévio. A suplementação de colina foi feita através da adição de cloreto de colina 60% [19] descontando a participação do Cloro, que representa 25,18% da molécula. A inclusão dos suplementos foi realizada em substituição ao amido de milho. Para cada fase, foi feita uma única dieta basal que foi

utilizada para a mistura dos diferentes tratamentos.

O produto Biocholine[®], arroz branco, farelo de soja com e sem goma, glúten de milho e proteína isolada de soja foram enviados para análise de colina no Departamento de Nutrição da Universidade da Carolina do Norte realizada conforme metodologia descrita por Koc et al. (2002) [20]. O cloreto de colina foi analisado através de cromatografia iônica [21]. A proteína bruta das dietas basais foi determinada de acordo com o método nº 984.13 da AOAC [22] adaptado por Prates (2007) [23].

Embora a análise do produto Biocholine[®] tenha apresentado 0,29% de fosfatidilcolina, o laudo emitido pelo fabricante atesta 1,67%. Para as dietas de ambos os experimentos, os valores obtidos, considerando o conteúdo de colina dos ingredientes nas tabelas, também foram superiores àqueles analisados (Tabela 2). O conteúdo de betaína das dietas também está demonstrado devido ao seu efeito poupador de colina [24]. No entanto, como os valores encontrados foram baixos, supõe-se que não tenham influenciado a exigência de colina no presente estudo.

Em ambos os experimentos foram avaliados peso corporal (PC), consumo de ração (CR) e ocorrência de perose, semanalmente. Ganho de peso e conversão alimentar (CA) corrigida para as aves mortas foram calculados. A mortalidade e temperatura ambiental foram medidas diariamente. Ao final de cada experimento, foi realizado abate mediante insensibilização por eletronarcole e excisão da veia jugular, e posterior coleta de fígados, os quais foram imediatamente congelados em -86°C para posterior liofilização e extração de EE pelo método nº 920.39 da AOAC [22]. No Experimento I foi sacrificada uma ave/repetição, num total de 56 aves e no Experimento II, cinco aves nos níveis 0, 400 e 800 mg/kg de colina, totalizando 15 animais.

Cada experimento foi analisado separadamente utilizando o programa Statgraphics Plus[®]. Foram realizadas ANOVA e análises de regressão para cada fonte

de colina. No Experimento I foram feitas análises de contraste (0 suplementação x Biocholine[®]; 0 suplementação x cloreto de colina e Biocholine[®] x cloreto de colina). Na presença de F significativo, as médias foram comparadas pelo teste LSD.

Resultados e discussão

As várias formas de colina presentes nos alimentos (livre, glicerofosfocolina, fosfocolina, fosfatidilcolina ou esfingomiéline) [12] podem ser um fator que dificulta a quantificação da colina, podendo ser a causa de diferenças entre resultados de análises realizadas em diferentes laboratórios e a justificativa para as divergências encontradas entre os valores calculados e analisados no presente estudo. Como exemplo, tem-se que os valores de colina do arroz branco variam entre 58 mg/kg e 1003 mg/kg dependendo da tabela utilizada [13, 17]. Por isso, optou-se por utilizar os valores analisados de colina, devido às variações na composição nutricional que podem existir dentro de cada ingrediente.

No Experimento I, GP e CA não foram influenciados pelos tratamentos em nenhuma fase quando os dados foram comparados pela ANOVA (Tabela 3). Embora diversos pesquisadores não tenham encontrado efeito da suplementação de colina sobre a CA [24, 25, 26], alguns trabalhos mostraram que a colina favorece esta resposta [27, 28, 29]. Diferentes níveis de aminoácidos sulfurados podem ser a causa dos resultados distintos, pois apenas nos trabalhos em que os níveis desses aminoácidos foram elevados é que a colina não alterou a CA, como é o caso do presente estudo. Pela análise de contraste, no período de 15 a 28 dias e no período total, as aves suplementadas com Biocholine[®] consumiram menos (Tabela 4). Na análise de regressão, somente com a utilização do Biocholine[®] foi observada resposta quadrática sobre o GP no período total, com maior GP nas dietas suplementadas com 156 mg/kg do produto. Também pela análise de regressão, ambos os suplementos melhoraram

linearmente a CA de 15 a 28 dias (Tabela 5). No entanto, a relação das inclinações das equações foram diferentes ($P < 0,04$, Figura 1) e a relação entre os coeficientes angulares mostrou que 1 unidade do produto Biocholine[®] equivaleu a 2,52 unidades de colina pura suprida pelo cloreto de colina. Com o advento dos alimentos orgânicos, o Biocholine[®] aparece como um suplemento alternativo, já que a Instrução Normativa 46 do MAPA [30], que trata da produção de alimentos orgânicos, banuiu a partir de 2013 as vitaminas obtidas através de síntese química, como é o caso do cloreto de colina. Nesses sistemas de produção, conhecer a bioequivalência do Biocholine[®] permite seu uso mais eficiente.

No presente estudo, melhores respostas de desempenho foram obtidas utilizando o produto Biocholine[®], fonte de fosfatidilcolina, em relação ao cloreto de colina. De acordo com Cheng et al. (1996) [31], existe variação na biodisponibilidade e utilização entre os diferentes ésteres de colina, o que justifica a maior eficiência da fosfatidilcolina. Além disso, a colina presente no cloreto está sujeita à degradação pela flora intestinal, podendo ser transformada em trimetilamina [32]. Já a fosfatidilcolina não sofre degradação no trato gastrointestinal [33] ou sofre pouca degradação [34]. A melhora na CA pode estar relacionada com a melhor absorção da gordura dietética, visto que Rioux et al. (1994) [35] e LeBlanc et al. (1998) [36] observaram que a administração de fosfatidilcolina na dieta causou aumento no fluxo de suco biliar, na concentração de fosfatidilcolina no suco e no aumento de colesterol biliar [35] em ratos. Esses fatores fazem com que a fosfatidilcolina cumpra indiretamente papel emulsificante na digestão das gorduras. Huang et al. (2007) [37] observaram que a substituição de 25% do óleo de soja por lecitina de soja melhorou a digestibilidade da gordura na fase inicial e o GP e CA de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade. Raber et al. (2009) [38] observaram que a inclusão de 0,5% de lecitina de soja na dieta de

frangos de corte proporcionou maior percentual de gordura metabolizável da dieta. Também Zhang et al. (2011) [39] demonstraram que a administração de lisofosfatidilcolina melhorou o GP em frangos de corte na fase inicial, a digestibilidade de ácidos graxos e aumentou a EMA entre 35 e 38 dias.

No Experimento II, a CA e o CR não foram afetados pelos níveis de colina em nenhuma fase. Já o GP melhorou, nos períodos de 1 a 35 e 1 a 42 dias, com a suplementação de 200 e 400 mg/kg de colina em relação à dieta sem suplementação ($P < 0,05$, Tabela 3). Observa-se, na primeira semana, a falta de resposta em GP, que pode ser atribuída à reserva de colina presente na gema. A gema contém aproximadamente 6800 mg/kg desse nutriente [13].

As exigências de colina corresponderam a 778, 632 e 645 mg/kg para as fases de 1 a 7, 1 a 35 e 1 a 42 dias, respectivamente (Tabela 5). Esses valores se aproximam daqueles obtidos com dietas purificadas, entre 600 [40, 11] e 720 mg/kg [8], porém são bem inferiores aos demais trabalhos que utilizaram dietas práticas. Para a fase de 1 a 21 dias, a equação de regressão para GP não apresentou significância, sendo portanto, possível afirmar que nesse período o nível de colina da dieta basal foi suficiente para atender a exigência das aves. Porém, a significância da equação no período de 1 a 35 dias mostra que a exigência de colina aumenta a partir da terceira semana. Viola et al. (2008) [41] também observaram elevada exigência nutricional de frangos na fase de 21 a 28 dias e atribuíram esse fato à alta taxa de crescimento de tecido magro nesta idade. Pesti et al. (1981) [42] defendem a ideia que respostas de desempenho não são bons parâmetros para avaliar a exigência de colina em aves, pois em dietas deficientes em colina pode haver resposta com a suplementação de outros nutrientes, tais como metionina, betaína e cistina. Trabalhos indicam que aumentando o nível de colina na dieta, diminui-se a exigência de metionina e vice-versa, o que é chamado de efeito

poupador [29, 7]. Trabalhos utilizando dietas com baixo nível de metionina (0,38 e 0,32%) encontraram exigência de colina de 1200 [11] e 1910 mg/kg [10] na fase inicial. Mudanças no potencial genético também devem ser levadas em consideração ao comparar exigências nutricionais dos frangos ao longo dos anos. Índícios apontam que a necessidade de colina em frangos de diferentes tamanhos seja semelhante devido à função que ela cumpre nas membranas celulares [1] e como acetilcolina [43], já que em aves de crescimento rápido, a hiperplasia parece ser mais importante que o aumento no número de células [44]. Como a evolução das linhagens se deu com base no aumento do consumo de ração e da taxa de crescimento corporal, as aves modernas estão consumindo muito mais alimento e conseqüentemente mais colina, logo sua exigência por kg de ganho de peso pode ter diminuído. Em recente estudo que utilizou dietas à base de milho e concentrado proteico de soja para animais da linhagem Cobb 500, a exigência de colina com níveis normais de metionina (0,59%) foi de 1013 mg/kg entre 1 e 21 dias [7], valor intermediário entre aqueles obtidos nos demais trabalhos citados e o presente estudo. De acordo com Briz e Pérez (2012) [45], dietas à base de milho e soja apresentam aproximadamente 1350 mg/kg de colina e não precisariam ser suplementadas [25, 46], mesmo com baixo nível de metionina [47].

Nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada no percentual de gordura dos fígados em ambos os experimentos. Os valores médios de gordura, determinados na MS, foram 17,68% (Experimento I) e 17,77% (Experimento II), estando de acordo com a literatura [48]. O fígado gorduroso é ocasionado pela carência de grupos metil na dieta, e não apenas pela deficiência de colina [49]. Como a dieta conteve níveis adequados de metionina, associada à presença de farelo de soja e o glúten, ingredientes que contêm a molécula S-Metilmetionina (SMM), análoga à S-Adenosilmetionina [50], o fornecimento de grupos metil foi adequado. Lipstein et al. (1977) [51] verificaram que

aves alimentadas com dietas práticas (1942 mg/kg de colina) e semi-purificadas (268 mg/kg de colina) tiveram deposição semelhante de lipídios no fígado.

Não foram observados sinais de perose em ambos os experimentos. Os trabalhos publicados que avaliaram o efeito da colina sobre a perose são contraditórios. Pesti et al. (1981) [42], utilizando dieta basal sem colina e 0,43% de metionina, encontraram alta incidência de perose em animais suplementados com 150 a 600 mg/kg de colina. Porém Ryu et al. (1995) [52], utilizando dieta com 750 mg/kg de colina, não observaram perose até os 18 dias de idade. A deficiência de Manganês também causa perose em frangos [53], porém em todos os trabalhos citados os níveis de Mn foram adequados. Outros fatores, além das deficiências nesses nutrientes, podem influenciar a incidência de perose. Rizk et al. (1980) [54] demonstraram que aves criadas sobre cama apresentam menor incidência de perose em relação àquelas criadas em sistema de baterias.

Conclusões e aplicações

1. A conversão alimentar das aves melhorou com a utilização do produto Biocholine[®] em relação ao cloreto de colina. Com base nesta resposta, a equivalência entre os dois produtos foi de uma unidade de Biocholine[®] para 2,52 unidades de colina suprida pelo cloreto (Experimento I).
2. A suplementação de cloreto de colina teve efeito quadrático no ganho de peso sem alterar a conversão alimentar das aves (Experimento II).
3. As exigências de colina com base nos valores analisados dos ingredientes foram 778, 632 e 645 mg/kg para as fases de 1 a 7, 1 a 35 e 1 a 42 dias, respectivamente. Nível de colina igual a 304 mg/kg entre 29 e 42 dias foi suficiente para atender a exigência nutricional das aves nesse período (Experimento II).
4. Níveis de colina iguais a 304 mg/kg na fase inicial, 249 mg/kg na fase de

crescimento e 243 mg/kg na fase final não causaram perose e fígado gorduroso nas aves (Experimento II).

Referências e notas

1. Battaglia, K. B., and R. J. Schimmel. 1997. Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J. Exp. Biol.* 200:2927–2936.
2. Best, C. H., J. M. Hershey, and M. Huntsman. 1932. The effect of lecithine on fat deposition in the liver of the normal rat. *J. Physiol.* 75:56-66.
3. Dale, H. H., and H. W. Dudley. 1929. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J. Physiol.* 68:97-123.
4. Jukes, T. H. 1940. Prevention of perosis by choline. *J. Biol. Chem.* 134:789-790.
5. du Vigneaud, V., J. P. Chandler, A. W. Moyer, and D. M. Keppel. 1939. The effect of choline on the ability of homocystine to replace methionine in the diet. *J. Biol. Chem.* 131:57-76.
6. Zeisel, S. H. 1990. Choline deficiency. *J. Nutr. Biochem.* 1:332-349.
7. Lima, M. B. 2012. Modelos matemáticos para predição das exigências da colina para frangos de corte. Msc Diss. Univ. São Paulo, Piracicaba.
8. Dilger, R. N., T. A. Garrow, and D. H. Baker. 2007. Betaine Can Partially Spare Choline in Chicks but Only When Added to Diets Containing a Minimal Level of Choline. *J. Nutr.* 137:2224–2228.
9. Albers, N., G. Gotterbarm, W. Heimbeck, T. Keller, J. Seehawer, and T. D. Tran. 2002. *Vitamins In Animal Nutrition*. Agrimedia, Clenze, LS, Germany.
10. Pesti, G. M., A. E. Harper, and M. L. Sunde. 1980. Choline/Methionine Nutrition of Starting Broiler Chicks. Three Models for Estimating the Choline Requirement with Economic Considerations. *Poultry Science*, 59:1073-1081.
11. Baker, D. H., K. M. Halpin, G. L. Czarnecki, and C. M. Parsons. 1982. The Choline-Methionine Interrelationship for Growth of the Chick. *Poult. Sci.* 62:133-137.
12. Zeisel, S. H., M. Mar, J. C. Howe, and J. M. Holden. 2003. Concentrations of Choline-Containing Compounds and Betaine in Common Foods. *J. Nutr.* 133:1302-1307.
13. USDA. 2008. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 26. Accessed Nov. 2011. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.
14. Yao, Z., and D. E. Vance. 1988. The Active Synthesis of Phosphatidylcholine Is Required for Very Low Density Lipoprotein Secretion from Rat Hepatocy. *J. Biol. Chem.* 263:2998-3004.
15. Indian Herbs Research & Supply Company Ltd., Saharanpur, Uttar Pradesh, India.
16. Solae Indústria e Comércio de Alimentos, Esteio, Rio Grande do Sul, Brasil.
17. NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
18. Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. de Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. de T. Barreto, and R. F. Euclides. 2011. Tabelas

- brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais. 3rd ed. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil.
19. Be-Long Corporation, Nanjing, Jiangsu, China.
 20. Koc, H., M. H. Mar, A. Ranasinghe, J. A. Swenberg, and S. H. Zeisel. 2002. Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry. *Analyt. Chem.* 74:4734-4740.
 21. Wollard, D. C., and Indyk, H. E. 2000. Determination of Choline in Milk and Infant Formulas by Enzymatic Analysis: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 83:131-138.
 22. AOAC International. 1995. Official methods of analysis of AOAC international. 16th. ed. AOAC int., Washington, DC.
 23. Prates, E. R. 2007. Técnicas de pesquisa em nutrição animal. ed. UFRGS. Porto Alegre, RS, Brazil.
 24. Hassan, R. A., Y. A. Attia, and E. H. EL-Ganzory. 2005. Growth, Carcass Quality and Serum Constituents of Slow Growing Chicks as Affected by Betaine Addition to Diets Containing 1. Different Levels of Choline. *Int. J. Poult. Sci.* 4:840-850.
 25. Waldroup, P. W., and C. A. Fritts, 2005. Evaluation of Separate and Combined Effects of Choline and Betaine in Diets for Male Broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 4:442-448, 2005.
 26. Pesti, G. M., A. E. Harper, and M. L. Sunde. 1979. Sulfur Amino Acid and Methyl Donor Status of Corn-Soy Diets Fed to Starting Broiler Chicks and Turkey Poults. *Poult. Sci.* 58:1541-1547.
 27. Waldroup, P. W., M. A. Motl, F. Yan, and C. A. Fritts. 2006. Effects of Betaine and Choline on Response to Methionine Supplementation to Broiler Diets Formulated to Industry Standards. *J. Appl. Poult. Res.* 15:58-71.
 28. Blair, M. E., L. M. Potter, B. A. Bliss, and J. R. Shelton. 1986. Methionine, Choline, and Sulfate Supplementation of Practical-Type Diets for Young Turkeys. *Poult. Sci.* 65:130-137.
 29. Derilo, Y. L., and Balnave D. 1980. The choline and sulphur amino acid requirements of broiler chickens fed on semi-purified diets. *Br. Poult. Sci.* 21:479-487.
 30. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46, de 6 de outubro de 2011. Accessed Mar. 2013. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional.
 31. Cheng, W., M. Q. Holmes-McNary, M. Mar, E. L. Lien, and S. H. Zeisel. 1996. Bioavailability of choline and choline esters from milk in rat pups. *J. Nutr. Biochem.* 7:457-464.
 32. de la Huerga, J., and Pooper, H. 1952. Factors influencing choline absorption in the intestinal tract. *J. Clin. Invest.* 31:598-603.
 33. Zeisel, S. H., K. A. Dacosta, M. Youssef, and S. Hensey. 1989. Conversion of Dietary Choline to Trimethylamine and Dimethylamine in Rats: Dose-Response Relationship. *J. Nutr.* 119:800-804.
 34. McDowell, L. R. 2000. Vitamins in animal and human nutrition. 2. ed. Iowa State

University Press, Ames, IA, United States of America.

35. Rioux, F., A. Perea, I. M. Yousef, É. Lévy, L. Malli, M. C. Carrillo, and B. Tuchweber. 1994. Short-term feeding of a diet enriched in phospholipids increases bile formation and the bile acid transport maximum in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214:193-202.
36. LeBlanc, M., V. Gavino, A. Peréa, I. M. Yousef, É. Lévy, and B. Tuchweber. 1998. The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1393:223-234.
37. Huang, J., D. Yang, and T. Wang. 2007. Effects of Replacing Soy-oil with Soy-lecithin on Growth Performance, Nutrient Utilization and Serum Parameters of Broilers Fed Corn-based Diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20:1880-1886.
38. Raber, M. R., A. M. L. Ribeiro, A. M. Kessler, and V. Arnaiz. 2009. Suplementação de glicerol ou de lecitina em diferentes níveis de ácidos graxos livres em dietas para frangos de corte. *Cienc. Anim. Bras.* 10:745-753.
39. Zhang, B., L. Haitao, D. Zhao, Y. Guo, and A. Barri. 2011. Effect of fat type and lysophosphatidylcholine addition to broiler diets on performance, apparent digestibility of fatty acids, and apparent metabolizable energy content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 163:177-184.
40. Molitoris, B. A., and D. H. Baker. 1976. Assessment of the Quantity of Biologically Available Choline in Soybean Meal. *J. Anim. Sci.* 42:481-489.
41. Viola, T. H., A. M. L. Ribeiro, C. B. Neto and A. M. Kessler. 2008. Formulação com aminoácidos totais ou digestíveis em rações com níveis decrescentes de proteína bruta para frangos de corte de 21 a 42 dias de idade. *Rev. Bras. Zootec.* 37:303-310.
42. Pesti, G. M., N. J. Benevenga, A. E. Harper, and M. L. Sunde. 1981. Factors Influencing the Assessment of the Availability of Choline in Feedstuffs. *Poult. Sci.* 60:188-196.
43. Wauben, P. M., and P. E. Wainwright. 1999. The influence of neonatal nutrition on behavioral development: a critical appraisal. *Nutr. Rev.* 57:35-44.
44. Smith, J. H. 1963. Relation of Body Size to Muscle Cell Size and Number in the Chicken. *Poult. Sci.* 42:283-290.
45. Briz, R. C., and A. B. Pérez. 2012. Optimum vitamin nutrition in broilers and turkeys. Pages 139-242 in *Optimum vitamin level in the production of quality animal foods*. DSM Nutritional Products Ltd., ed. 5M, Sheffield, SY, United Kingdom.
46. Pompeu, M. A., N. C. Baião, and L. J. C. Lara. 2009. Efeito dos níveis de suplementação de colina em dietas para frangos de corte machos na fase inicial de criação. Pages 1-3 in *FZEA/USP-ABZ, Águas de Lindóia, SP*.
47. Swain, B. K., and T. S. Johri. 2000. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *Br. Poult. Sci.* 41:83-88.
48. Pompeu, M. A., L. J. C. Lara, N. C. Baião, R. Ecco, S. V. Cançado, J. S. R. Rocha, a. L. C. Machado, and R. J. C. Vasconcelos. 2011. Suplementação de colina em dietas para frangos de corte machos na fase inicial de criação. *Arq. Bras. Med. Vet.*

- Zootec. 63:1446-1452.
49. Cook, R. J., D. W. Horne, and A. Wagner. 1989. Effect of Dietary Methyl Group Deficiency on One-Carbon Metabolism in Rats. *J. Nutr.* 119:612-617.
 50. Augspurger, N. R., C. S. Scherer, T. A. Garrow, and D. H. Baker. 2005. Dietary S-Methylmethionine, a Component of Foods, Has Choline-Sparing Activity in Chickens. *J. Nutr.* 135:1712-1717.
 51. Lipstein, B., S. Bornstein, and P. Budowski. 1977. Utilization of Choline From Crude Soybean Lecithin by Chicks. 1. Growth and prevention of perosis. *Poult. Sci.* 56:331-336.
 52. Ryu K. S., K. D. Roberson, and G. M. Pesti. 1995. The Folic Acid Requirements of Starting Broiler Chicks Fed Diets Based on Practical Ingredients. 1. Interrelationships with Dietary Choline. *Poult. Sci.* 74:1447-1455.
 53. Settle, E. A., F. R. Mraz, C. R. Douglas, and J. K. Bletner. 1969. Effect of Diet and Manganese Level on Growth, Perosis and ⁵⁴Mn Uptake in Chicks. *J. Nutr.* 97:141:146.
 54. Rizk, S. W., P. E. Stake, and R. W. Simmons. 1980. Curled toes and perosis-like abnormalities in cage reared broilers. *Poult. Sci.* 59:308-315.

Tabela 1: Ingredientes e valor nutricional das dietas experimentais, com base na matéria natural

Ingredientes (%)	Experimento I		Experimento II		
	Inicial 4 a 21 dias	Crescimento 22 a 28 dias	Inicial 1 a 21 dias	Crescimento 22 a 35 dias	Final 36 a 42 dias
Arroz branco	63,27	63,45	64,43	69,64	72,07
Farelo de soja 45% ¹	22,83	23,03	14,35	10,94	10,75
Glúten de milho 60%	7,70	5,95	11,55	10,00	7,20
PIS ²	-	-	3,00	3,00	3,00
Óleo de soja	1,26	3,04	1,10	1,48	2,36
Calcário	0,82	0,76	1,14	0,94	0,81
Fosfato bicálcico	1,74	1,49	2,06	1,61	1,40
Sal	0,48	0,46	0,10		
L-lisina	0,37	0,35	0,48	0,43	0,41
DL-metionina	0,26	0,23	0,16	0,14	0,17
L-treonina	0,12	0,09	0,08	0,07	0,09
Premix mineral ³	0,10	0,10	0,07	0,07	0,07
Premix vitamínico ⁴	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Bicarbonato de Na	-	-	0,55	0,67	0,67
Cloreto de K	-	-	0,36	0,44	0,45
Monensina 40%	-	-	0,025	0,025	0,025
Amido de milho ⁵	1,00	1,00	0,50	0,50	0,50
Valor nutricional					
EM (kcal/kg)	3050	3150	3082	3150	3200
PB, analisada (%)	20,00	18,91	21,71	20,30	17,69
Ca (%)	0,82	0,73	0,94	0,76	0,66
P disponível (%)	0,39	0,34	0,44	0,35	0,31
Na (%)	0,21	0,20	0,24	0,23	0,23
Lis dig. (%)	1,17	1,08	1,14	1,02	0,97
Met dig. (%)	0,59	0,54	0,54	0,49	0,48
Met+cist dig. (%)	0,85	0,79	0,82	0,74	0,71
Tre dig. (%)	0,76	0,70	0,74	0,66	0,63
Trip dig. (%)	0,21	0,21	0,21	0,19	0,18
Arg dig. (%)	1,27	1,19	1,21	1,10	1,05
BED ⁶ (mEq/kg)	140	140	180	180	180

¹Farelo de soja com e sem goma no Experimento I e II, respectivamente. ²Proteína isolada de soja.

³Composição (por kg): 150000 mg de Mn, 100000 mg de Zn, 80000 mg de Fe, 15000 mg de Cu, 1200 mg de I, 700 mg de Se.

⁴Composição (por kg): 23200000 UI de vitamina A, 5600000 UI de vitamina D, 52000 mg de vitamina K, 6000 mg de vitamina B₁, 18000 mg de vitamina B₂, 9000 mg de vitamina B₆, 132000 mg de niacina, 44000 mg de ácido pantotênico, 2400 mg de ácido fólico, 200000 µg de biotina, 40000 µg de vitamina B₁₂.

⁵No Experimento I: tratamentos com Biocholine® (BC) - 1% de amido; 0,99% de amido e 0,01% de BC; 0,98% de amido e 0,02% de BC; 0,97% de amido e 0,03% de BC para 0, 100, 200 e 300 mg/kg de BC; tratamentos com cloreto de colina (CL) - 0,957% de amido e 0,043% de CL; 0,913% de amido e 0,087% de CL; 0,870% de amido e 0,130% de CL para 200, 400 e 600 mg/kg de colina suprida pelo CL.

No Experimento II: 0,5% de amido; 0,041% de CL e 0,459% de amido; 0,083% de CL e 0,417% de amido; 0,123% de CL e 0,377% de amido; 0,166% de CL e 0,334% de amido para 0, 200, 400, 600 e 800 mg/kg de colina suprida pelo CL.

⁶Balanco eletrolítico da dieta (Na + K - Cl).

Tabela 2: Concentração de colina e betaína nos ingredientes e nas dietas experimentais

Item	Colina, analisada (mg/kg)	Colina, calculada¹ (mg/kg)	Betaína, analisada (mg/kg)
Arroz branco	30	58	1
Glúten de milho	141	330	2
Farelo de soja sem goma	1593	2794	36
Farelo de soja com goma	2267	2794	39
Proteína isolada de soja	1318	1110	1
Dieta inicial, T1, experimento I ²	547	700	10
Dieta crescimento, T1, experimento I ²	549	700	10
Dieta inicial, T1, experimento II ²	304	600	6
Dieta crescimento, T1, experimento II ²	249	510	5
Dieta final, T1, experimento II ²	243	500	5

¹Valores baseados nas tabelas do NRC (1998), USDA (2008) e Solae.

²Valores de formulação com base na análise dos ingredientes para colina e betaína analisada.

Tabela 3: Desempenho de frangos de corte machos suplementados com diferentes níveis e fontes de colina na dieta (Experimento I e II)

Nível de colina suplementar (mg/kg)	Experimento I			Experimento II			
	Período (dias)						
	4-14	15-28	4-28	1-7	1-21	1-35	1-42
	Ganho de peso (g)						
0	409	1106	1517	122	887	2202a	2986a
200	415	1141	1558	132	942	2338c	3105c
400	413	1143	1550	127	929	2295bc	3100bc
600	407	1142	1552	127	898	2193a	3000ab
800				127	912	2233ab	3015abc
100 - Biocholine®	422	1117	1533				
200 - Biocholine®	418	1128	1546				
300- Biocholine®	407	1104	1511				
P	0,21	0,42	0,47	0,23	0,08	0,01	0,03
EPR	13,14	46,69	52,17	8,43	43,83	91,29	91,25
	Conversão alimentar (g:g)						
0	1,351	1,531	1,480	1,256	1,307	1,459	1,523
200	1,366	1,507	1,468	1,246	1,313	1,453	1,520
400	1,370	1,463	1,437	1,253	1,302	1,444	1,510
600	1,377	1,472	1,457	1,258	1,339	1,483	1,532
800				1,301	1,324	1,466	1,523
100 - Biocholine®	1,369	1,466	1,439				
200 - Biocholine®	1,387	1,480	1,454				
300 - Biocholine®	1,385	1,468	1,445				
P	0,95	0,13	0,56	0,85	0,28	0,20	0,64
EPR	0,068	0,054	0,049	0,106	0,036	0,032	0,027
	Consumo de ração (g)						
0	552	1670abc	2245	154	1159a	3209a	4546
200	567	1716c	2286	164	1236b	3396b	4721
400	558	1671abc	2227	163	1210b	3312ab	4637
600	578	1677bc	2259	159	1200ab	3249a	4596
800				165	1207ab	3273ab	4594
100 - Biocholine®	570	1637ab	2206				
200 - Biocholine®	579	1666abc	2245				
300 - Biocholine®	564	1620a	2183				
P	0,62	0,03	0,14	0,24	0,05	0,04	0,19
EPR	32,46	53,28	73,25	11,37	52,49	122,58	151,48

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste LS means a 5% de significância.

Peso médio inicial (4 dias), Experimento I: 117 g. Peso médio inicial (1 dia), Experimento II: 47 g.

Tabela 4: Análise de contraste entre suplementos para consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) (Experimento I)

Contraste	Médias
CA 15 a 28 dias (g:g) – 0 suplementação x Biocholine®	1,531 X 1,471
CR 15 a 28 dias (g:g) - Biocholine® x cloreto de colina	1641 X 1688
CR 4 a 28 dias (g) - Biocholine® x cloreto de colina	2211 X 2258

Médias na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste LS means a 5% de significância.

Tabela 5: Equações de regressão utilizando os valores calculados de colina

Variável			
Experimento I	Equação	Efeito	Valor de P
GP ¹ , 4 a 14 dias	Para o Biocholine®, $Y = 409,698 + 0,1725 \times \text{nível colina}^4 - 0,0006 \times \text{nível colina}^2$, $R^2 = 19,24$.	Quadrático	0,016
GP, 4 a 28 dias	Para o Biocholine®, $Y = 1503,17 + 0,6117 \times \text{nível colina} - 0,002 \times \text{nível colina}^2$, $R^2 = 18,52$.	Quadrático	0,020
CA ² , 15 a 28 dias	Para o cloreto, $Y = 1,6012 - 0,0001 \times \text{nível colina}$, $R^2 = 14,73$.	Linear	0,033
	Para o Biocholine®, $Y = 1,5105 - 0,0002 \times \text{nível colina}$, $R^2 = 15,69$.	Linear	0,027
CR ³ , 4 a 14 dias	Para o Biocholine®, $Y = 551,531 + 0,2878 \times \text{nível colina} - 0,0008 \times \text{nível colina}^2$, $R^2 = 19,88$.	Quadrático	0,028
CR, 15 a 28 dias	Para o Biocholine®, $Y = 1681,16 - 0,184 \times \text{nível colina}$, $R^2 = 12,92$.	Linear	0,043
Experimento II			
GP, 1 a 7 dias	$Y = 106,669 + 0,0611 \times \text{nível colina} - 0,00004 \times \text{nível colina}^2$, $R^2 = 13,26$.	Quadrático	0,055
GP, 1 a 35 dias	$Y = 2100,17 + 0,6018 \times \text{nível colina} - 0,0005 \times \text{nível colina}^2$, $R^2 = 10,00$.	Quadrático	0,053
GP, 1 a 42 dias	$Y = 2858,31 + 0,6969 \times \text{nível colina} - 0,0005 \times \text{nível colina}^2$, $R^2 = 12,82$.	Quadrático	0,026

¹Ganho de peso.

²Conversão alimentar.

³Consumo de ração.

⁴Nível colina: mg/kg.

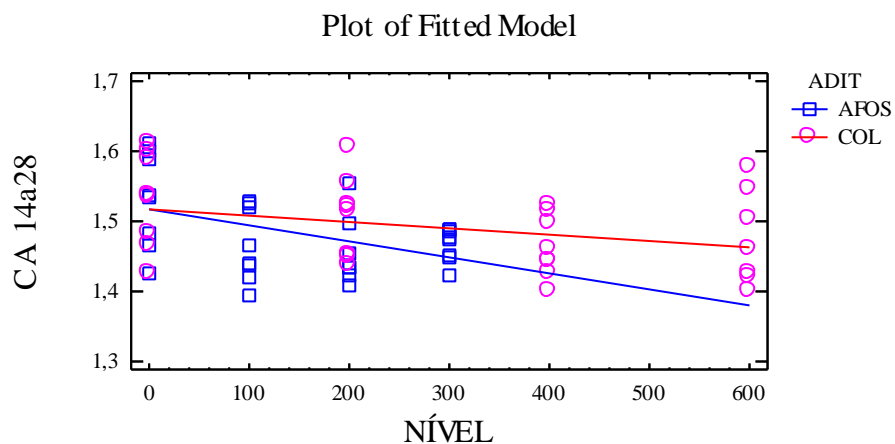


Figura 1: Comparação entre as retas de regressão do Biocholine[®] e cloreto de colina para conversão alimentar (CA) de 14 a 28 dias (Experimento I).

Equação para o cloreto de colina: $CA\ 14\ a\ 28 = 1,51814 - 0,0000908354 \times \text{nível de colina (mg/kg)}$ ($P = 0,02$). Equação para o Biocholine[®]: $CA\ 14\ a\ 28 = 1,51814 - 0,000228921 \times \text{nível de Biocholine}^{\text{®}}$ ($P = 0,003$). $R^2 = 15,6$.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhar com colina é interessante do ponto de vista econômico devido ao baixo custo desse nutriente. Logo, respostas à suplementação, mesmo que pequenas, são capazes de trazer benefícios econômicos. Muitos trabalhos indicam que outros nutrientes com custo elevado, como certos aminoácidos sintéticos, por exemplo, proporcionam respostas, sem fazer nenhuma análise para avaliar a viabilidade econômica com o uso desses nutrientes. Por outro lado, esse trabalho é inédito pois compara a bioequivalência entre duas formas de colina (fosfatidilcolina e cloreto de colina). Além disso, existem poucos trabalhos que testaram fontes comerciais de fosfatidilcolina, com exceção da lecitina de soja. Por se tratar de um produto natural, o Biocholine[®] pode ser utilizado em sistemas de produção de alimentos orgânicos, que estão em franca expansão no mercado.

Uma das maiores dificuldades observadas foi encontrar um laboratório confiável para análise de colina nos ingredientes. As divergências entre os valores de exigência reportados na literatura fazem com que seja necessário levar em consideração a análise ao interpretar esses números. No presente trabalho, as análises foram realizadas primeiramente nas dietas. Tendo em vista que os valores obtidos foram muito abaixo do esperado, os ingredientes foram enviados para análise no mesmo laboratório que é tido como referência para análise de colina (Instituto de Pesquisa em Nutrição, Universidade da Carolina do Norte), e dessa vez o cálculo de colina nas dietas com base na formulação foi superior. Dessa forma foi possível concluir que o ideal é analisar os ingredientes, pois pode ser que nem toda a colina seja extraída das dietas misturadas.

As respostas sutis, e até mesmo falta de respostas para algumas variáveis em relação à suplementação de colina foram um imprevisto. Isso porque esperávamos que os níveis calculados de colina das dietas sem suplementação deveriam ter provocado sintomas de deficiência em grau médio (crescimento retardado) a acentuado (perose), com base nos resultados reportados na literatura. Surpreendentemente, nenhum sinal de perose foi observado. A carência de estudos atuais que avaliem a exigência de colina dificulta comparações entre resultados. O melhoramento genético das linhagens comerciais de frangos de corte é muito intenso, provocando constantes mudanças no potencial produtivo desses animais e conseqüentemente nas suas exigências nutricionais. Daí a importância de reavaliar constantemente as exigências nutricionais nessa categoria.

Futuras pesquisas com colina poderiam incluir medição de atividade enzimática e/ou marcação com elementos radioativos para conhecer melhor o metabolismo desse nutriente em frangos. Além disso, alguns trabalhos demonstraram que doses extras de colina apresentam efeito benéfico sobre a imunidade, mas podem aumentar o acúmulo de gordura na carcaça. Mais trabalhos precisam ser feitos para validar essas informações e avaliar se a sobredose de colina na dieta é economicamente viável ou não no atual sistema de produção de frangos de corte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, N. et al. **Vitamins In Animal Nutrition**. Clenze: Agrimedia, 2002. 78 p.

ALMQUIST, H. J.; GRAU, C. R. Further studies on cystine, methionine and choline in chick diets. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 29, p. 219-222, 1945.

ALMQUIST, H. J.; MAURER, S. Choline content of certain feedstuffs. **Poultry Science**, Champaign, v. 30, n. 5, p. 789-790, 1951.

ASATOOR, A. M.; SIMENHOFF, M. L. The origin of urinary dimethylamine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 384–392, 1965.

AWAD, A. B.; ZEPP, E. A. Alteration of rat adipose tissue lipolytic response to norepinephrine by dietary fatty acid manipulation. **Biochemical and biophysical research communications**, Orlando, v. 86, n. 1, p. 138-144, 1979.

BAKER, D. H. et al. The Choline-Methionine Interrelationship for Growth of the Chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 62, n. 1, p. 133-137, 1982.

BATAL, A.; DALE, N.; PERSIA, M. Ingredient Analyses Table: 2012 Edition. **Feedstuffs Magazine Search**, v. 14, 2011.

BATTAGLIA, K. B.; SCHIMMEL, R. J. Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, p. 2927–2936, 1997.

BENSADOUN, A.; ROTHFELD, A. The Form of Absorption of Lipids in the Chicken, *Gallus domesticus*. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 141, n. 3, p. 814-817, 1972.

BEST, C. H.; HERSHEY, J. M.; HUNTSMAN, M. The effect of lecithine on fat deposition in the liver of the normal rat. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 56-66, 1932.

BEST, C. H.; HUNTSMAN, M. E. The effects of the components of lecithine upon the deposition of fat in the liver. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 75, n. 4, p. 405-412, 1932.

BEVERIDGE, J. M. R.; COLIN, C. C.; O'GRADY, M. K. The effect of dietary proteins, and amino acids on liver fat. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 505-518, 1945.

BLAIR, M. E. et al. Methionine, Choline, and Sulfate Supplementation of Practical-Type Diets for Young Turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 65, p. 130-137, 1986.

BLUSZTAJN, J. K.; ZEISEL, S. H.; WURTMAN, R. J. Synthesis of lecithin (phosphatidylcholine) from phosphatidylethanolamine in bovine brain. **Brain Research**, Amsterdam, v. 179, n. 2, p. 319-327, 1979.

BROSNAN, J. T. et al. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 51, n. 2, p. 405-413, 2004.

BUDOWSKI, P.; KAFRI, I.; SKLAN, D. Utilization of Choline From Crude Soybean Lecithin by Chicks. 2. Absorption Measurements. **Poultry Science**, Champaign, v. 56, n. 3, p. 754-757, 1977.

BURKE, K. A.; NYSTROM, R. F.; JOHNSON, B. C. The role of methionine as a methyl donor for choline synthesis in the chick. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 188, p. 723-728, 1951.

CHENG, W. et al. Bioavailability of choline and choline esters from milk in rat pups. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 7, n. 8, p. 457-464, 1996.

COHEN, E. L.; WURTMAN, R. J. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. **Life Sciences**, New York, v. 16, n. 7, p. 1095-1102, 1975.

COHEN, E. L.; WURTMAN, R. J. Brain Acetylcholine: Control by Dietary Choline. **Science**, Washington DC, v. 191, n. 4227, p. 561-562, 1976.

COMBS JUNIOR, G. F. **The Vitamins: Fundamental Aspects in nutrition and Health**. 3. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2008. 603 p.

COOK, R. J.; HORNE, D. W.; WAGNER, A. Effect of Dietary Methyl Group Deficiency on One-Carbon Metabolism in Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 119, n. 4, p. 612-617, 1989.

DALE, H. H.; DUDLEY, H. W. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 97-123, 1929.

DAWSON, R. M. C. Liver glycerylphosphorylcholine diesterase. **The Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 4, p. 689–693, 1956.

DE HAAS, G. H. et al. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 103-117, 1968.

DE LA HUERGA, J.; POOPER, H. Urinary excretion of choline metabolites following choline administration in normals and patients with hepatobiliary diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 30, n. 5, p. 463-470, 1951.

DE LA HUERGA, J.; POOPER, H. Factors influencing choline absorption in the intestinal tract. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 31, n. 6, p. 598-603, 1952.

DILGER, R. N.; GARROW, T. A.; BAKER, D. H. Betaine Can Partially Spare Choline in Chicks but Only When Added to Diets Containing a Minimal Level of Choline. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. 10, p. 2224–2228, 2007.

DSM. **Vitamin Supplementation Guidelines for Domestic Animals**. 11. ed. [S.l.: s.n.], 2011. 14 p.

DU VIGNEAUD, V. et al. The effect of choline on the ability of homocystine to replace methionine in the diet. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 131, p. 57-76, 1939.

DU VIGNEAUD, V. et al. A further investigation of the role of betaine in transmethylation reactions in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 165, p. 639-648, 1946.

EMMERT, J. L.; GARROW, T. A.; BAKER, D. H. Development of an experimental diet for determining bioavailable choline concentration and its application in studies with soybean lecithin. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 11, p. 2738-2744, 1996.

EMMERT, J. L.; BAKER, D. H. A Chick Bioassay Approach for Determining the Bioavailable Choline Concentration in Normal and Overheated Soybean Meal, Canola Meal and Peanut Meal. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 127, n. 5, p. 745–752, 1997.

ENGEL, R. W. The choline content of animal and plant products. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 25, n. 5, p. 441-446, 1943.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 259, n. 15, p. 9508-9513, 1984.

FONNUM, F. Recent developments in biochemical investigations of cholinergic transmission. **Brain Research**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 497-507, 1973.

FOOT, M.; CRUZ, T. F.; CLANDININ, M. T. Influence of dietary fat on the lipid composition of rat brain synaptosomal and microsomal membranes. **The Biochemical Journal**, London, v. 208, p. 631-640, 1982.

GALLINGER, C. I. **Exigências de colina e metionina na presença de substância doadora de grupo metila em frangos de corte de 1 a 21 dias de idade**. 1997. 150 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Vila Mariana: Guanabara Koogan, 2006. 875 p.

HARTER, J. M.; BAKER, D. H. Sulfur Amino Acid Activity of d- and l-Homocysteine for Chicks. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v.

157, p. 139-143, 1978.

HASSAN, R. A.; ATTIA, Y. A.; EL-GANZORY, E. H. Growth, Carcass Quality and Serum Constituents of Slow Growing Chicks as Affected by Betaine Addition to Diets Containing. 1. Different Levels of Choline. **International Journal of Poultry Science**, Islamabad, v. 4, n. 11, p. 840-850, 2005.

HAUBRICH, D. R.; WEDEKING, P. W.; WANG, P. F. L. Increase in tissue concentration of acetylcholine in guinea pigs *in vivo* induced by administration of choline. **Life sciences**, New York, v. 14, n. 5, p. 921-927, 1974.

HAUBRICH, D. R. et al. Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol. **Life Sciences**, New York, v. 17, n. 6, p. 975-980, 1975.

HERSHEY, J. M.; SOSKIN, S. Substitution of 'lecithin' for raw pancreas in a diet of depancreatized dog. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 93, p. 657-658, 1931.

HERZBERG, G. R.; LERNER, J. Intestinal absorption of choline in the chick. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 307, n. 1, p. 234-242, 1973.

HORNE, D. W.; COOK, R. J.; WAGNER, C. Effect of Dietary Methyl Group Deficiency on Folate Metabolism in Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 119, n. 4, p. 618-621, 1989.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline**. Washington, DC: National Academy Press, 1998. 592 p.

JAHANIAN, R.; RAHMANI, H. R. The Effect of Dietary Fat Level on the Response of Broiler Chicks to Betaine and Choline Supplements. **Journal of Biological Sciences**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 362-367, 2008.

JUKES, T. H. Prevention of perosis by choline. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 134, p. 789-790, 1940.

JUKES, T. H. The Effect of Certain Organic Compounds and Other Dietary Supplements on Perosis. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 22, p. 315-

326, 1941.

JUKES, T. H.; OLESON, J. J.; DORNBUSH, A. C. Observations on monomethylaminoethanol and dimethylaminoethanol in the diet of chicks. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 30, p. 219-223, 1945.

JUKES, T. H. Choline. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 16, p. 193-222, 1947.

KENNEDY, E. P.; WEISS, S. B. The functions of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 222, n. 1, p. 193-214, 1956.

KERWAR, S. S. et al. Interrelationship of Adenosyl Methionine and Methyl-B₁₂ in the Biosynthesis of Methionine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 116, p. 305-318, 1966.

KETTUNEN, H. et al. Intestinal uptake of betaine in vitro and the distribution of methyl groups from betaine, choline, and methionine in the body of broiler chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, Oxford, v. 128, n. 2, p. 269-278, 2001.

KIM, Y. et al. Severe Folate Deficiency Causes Secondary Depletion of Choline and Phosphocholine in Rat Liver. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 11, p. 2197-2203, 1994.

KOC, H. et al. Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 74, n. 18, p. 4734-4740, 2002.

KUMMEROW, F. A.; WEAVER, R.; HONSTEAD, H. The Choline Replacement Value of Ethanolamine in Chickens Kept on a High Fat Ration. **Poultry Science**, Champaign, v. 28, n. 4, p. 475-478, 1949.

KUSHWAHA, R. P. S.; JENSEN, L. S. In vivo and in vitro Utilization of Labeled Precursors for Choline Synthesis in Mature Japanese Quail as Compared to Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 104, p. 901-908, 1974. LEBLANC, M. et al. The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the

secretion of biliary lipids in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1393, n. 2-3, p. 223-234, 1998.

LIPSTEIN, B.; BORNSTEIN, S.; BUDOWSKI, P. Utilization of Choline From Crude Soybean Lecithin by Chicks. 1. Growth and prevention of perosis. **Poultry Science**, Champaign, v. 56, n. 1, p. 331-336, 1977.

MACKENZIE, C. G. et al. The oxidation and distribution of the methyl group administered as methionine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 180, p. 99-111, 1949.

McDOWELL, L. R. **Vitamins in animal and human nutrition**. 2. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2000. 812 p.

MARCH, B. E.; MacMILLAN, C. Choline Concentration and Availability in Rapeseed Meal. **Poultry Science**, Champaign, v. 59, n. 3, p. 611-615, 1980.

MENTEN, J. F. M.; PESTI, G. M.; BAKALLI, R. I. A New Method for Determining the Availability of Choline in Soybean Meal. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 1292-1297, 1997.

MENTEN, J. F. M.; PESTI, G. M. The Determination of the Choline Content of Feed Ingredients using Choline Kinase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 78, n. 3, p. 395-398, 1998.

MILLER, J. W. et al. Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. **The Biochemical Journal**, London, v. 298, p. 415-419, 1994.

MOLITORIS, B. A.; BAKER, D. H. Assessment of the Quantity of Biologically Available Choline in Soybean Meal. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 481-489, 1976.

MUDD, S. H.; POOLE, J. R. Labile Methyl Balances for Normal Humans on Various Dietary Regimens. **Metabolism, Clinical and Experimental**, New York, v. 24, n. 6, p. 721-735, 1975.

MUDD, S. H.; EBERT M. H.; STRIVER, C. R. Labile Methyl Group Balances in

the Human: The Role of Sarcosine. **Metabolism, Clinical and Experimental**, New York, v. 29, n. 8, p. 707-720, 1980.

NACHMANSOHN, D.; MACHADO, A. L. The Formation of Acetylcholine. A New Enzyme: Choline Acetylase. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 6, p. 397-403, 1943.

NEELANDS, P. J.; CLANDININ, M. T. Diet fat influences liver plasma-membrane lipid composition and glucagonstimulated adenylate cyclase activity. **The Biochemical Journal**, London, v. 212, n. 3, p. 573-583, 1983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Vitamin tolerance of animals**. Washington, DC: National Academy Press, 1987. 107 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of poultry**. 9. ed. Washington, DC: National Academy Press, 1994. 176 p.

OP den KAMP, J. A. F. Lipid asymmetry in membranes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 48, p. 47-71, 1979.

PESTI, G. M.; HARPER, A. E.; SUNDE, M. L. Sulfur Amino Acid and Methyl Donor Status of Corn-Soy Diets Fed to Starting Broiler Chicks and Turkey Poults. **Poultry Science**, Champaign, v. 58, n. 6, p. 1541-1547, 1979.

PESTI, G. M.; HARPER, A. E.; SUNDE, M. L. Choline/Methionine Nutrition of Starting Broiler Chicks. Three Models for Estimating the Choline Requirement with Economic Considerations. **Poultry Science**, Champaign, v. 59, n. 5, p. 1073-1081, 1980.

PILLAI, P. B. et al. Homocysteine Remethylation in Young Broilers Fed Varying Levels of Methionine, Choline, and Betaine. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 90-95, 2006.

POMFRET, E. A.; DACOSTA, K.; ZEISEL, S. H. Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon rat liver. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 1, n. 10, p. 533-541, 1990.

POMPEU, M. A. et al. Suplementação de colina em dietas para frangos de

corte machos na fase inicial de criação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1446-1452, 2011.

QUILLIN, E. C. et al. Effect of Choline on the Methionine Requirements of Broiler Chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 40, n. 3, p. 639-645, 1961.

REIS, R. S. et al. Níveis de suplementação de colina na dieta de codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v. 2, n. 1, p. 118-123, 2012.

RHIAN, M.; EVANS, R. J.; JOHN, J. L. S. The choline content of feeds. **The Journal of Nutritional**, Bethesda, v. 25, p. 1-5, 1943.

RIOUX, F. et al. Short-term feeding of a diet enriched in phospholipids increases bile formation and the bile acid transport maximum in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1214, n. 2, p. 193-202, 1994.

ROBINS, S. J.; ARMSTRONG, M. J. Biliary lecithin secretion. II. Effects of dietary choline and biliary lecithin synthesis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 70, n. 3, p. 397-402, 1976.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 3. ed. Viçosa: UFV-Departamento de Zootecnia, 2011. 252 p.

RYU, K. S. et al. The Folic Acid Requirements of Starting Broiler Chicks Fed Diets Based on Practical Ingredients. 1. Interrelationships with Dietary Choline. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, n. 9, p. 1447-1455, 1995.

SALIDO, G. M.; PEDROSA, F.; LÓPEZ, M. A. Nervous system regulation of exocrine pancreatic secretion in the chicken. **Revista española de fisiología**, Pamplona, v. 41, n. 1, p. 7-11, 1985.

SCHOLFIELD, C. R. Composition of soybean lecithin. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 58, n. 10, p. 889-892, 1981.

SIGMA-ALDRICH. **Aldrich handbook of fine chemicals and laboratory equipments**. Milwaukee, WI: Aldrich Chemical, 2001. 2927 p.

SUBBAIAH, P. V.; GANGULY, J. Studies on the Phospholipases of Rat Intestinal Mucosa. **The Biochemical Journal**, London, v. 118, n. 2, p. 233-239, 1970.

SWAIN, B. K.; JOHRI, T. S. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. **British Poultry Science**, London, v. 41, n. 1, p. 83–88, 2000.

TIDWELL, H. C. Effect of choline, methionine and ethionine on fat absorption. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 58, p. 569-578, 1956.

TILLMAN, P. B; PESTI, G. M. The Response of Male Broiler Chicks to a Corn-Soy Diet Supplemented with L-Methionine, L-Cystine, Choline, Sulfate, and Vitamin B12. **Poultry Science**, Champaign, v. 65, n. 9, p. 1741-1748, 1986.

TITUS, H. W. Perosis, or Deforming Leg Weakness, in the Chicken. **Poultry Science**, Champaign, v. 11, p. 117-125, 1932.

TREADWELL, C. R. Growth and lipotropism: III. The effect of supplementary cystine, methionine, and choline in low protein diets. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 176, n. 3, p. 1149-1155, 1948.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 26. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6388?fg=&man=&facet=&count=&max=25&sort=&qlookup=white+rice&offset=&format=Full&new=>>>. Acesso em: 15 nov. 2011.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: VANCE, D. E.; VANCE, J. E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 2. ed. [Sl.]: Elsevier, 2008. p. 213-245.

WALDROUP, P. W. et al. Effects of Betaine and Choline on Response to Methionine Supplementation to Broiler Diets Formulated to Industry Standards. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 15, p. 58–71, 2006.

WAUBEN, P. M.; WAINWRIGHT, P. E. The influence of neonatal nutrition on behavioral development: a critical appraisal. **Nutrition reviews**, New York, v. 57, n. 2, p. 35-44, 1999. WHITEHEAD, C. C. Vitamins in feedstuffs. In: McNAB,

J. M.; BOORMAN, K. M. **Poultry Feedstuffs**. Supply, Composition and Nutritive Value. Nottingham: Cabi, 2002. p. 181-190. v. 26.

YAO, Z.; VANCE, D. E. The Active Synthesis of Phosphatidylcholine Is Required for Very Low Density Lipoprotein Secretion from Rat Hepatocy. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 263, p. 2998-3004, 1988.

ZEISEL, S. H. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 1, n. 1, p. 95-121, 1981.

ZEISEL, S. H. et al. Conversion of Dietary Choline to Trimethylamine and Dimethylamine in Rats: Dose-Response Relationship. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 119, n. 5, p. 800-804, 1989.

ZEISEL, S. H. Choline deficiency. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 1, p. 332-349, 1990.

ZEISEL, S. H. et al. Concentrations of Choline-Containing Compounds and Betaine in Common Foods. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, n. 5, p. 1302-1307, 2003.

ZEISEL, S. H. A brief history of choline. **Annals of nutrition and metabolism**, Basel, v. 61, n. 3, p. 254–258, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Dados brutos referentes ao abate (Experimento 1)

Trat	Bloco	Box	Peso ave (g)	Peso fígado	% fígado	Peso fígado seco	% MS fígado	% GB na MS
1	1	3	1650	33,6	2,04	9,5	28,33	18,64
1	1	8	1660	30,9	1,86	8,3	26,85	19,97
1	1	21	1650	31,6	1,92	7,8	24,58	15,19
1	1	25	1660	51,1	3,08	14,3	27,99	34,18
1	2	34	1620	36,8	2,27	9,7	26,31	13,62
1	2	40	1670	37,3	2,23	9,5	25,49	14,24
1	2	46	1625	35,5	2,18	10,3	29,14	24,63
1	2	54	1505	26,9	1,79	6,8	25,31	13,26
2	1	4	1680	32,2	1,92	8,5	26,28	16,01
2	1	13	1720	30,4	1,77	7,9	25,83	14,4
2	1	17	1700	37,1	2,18	9,8	26,38	15,16
2	1	28	1735	33,1	1,91	8,2	24,72	12,07
2	2	30	1625	39,7	2,44	11,7	29,41	23,09
2	2	36	1715	36,9	2,15	9,8	26,63	16,39
2	2	43	1670	36,2	2,17	9,5	26,19	14,74
2	2	52	1695	41,7	2,46	11,4	27,37	20,54
3	1	6	1665	39,0	2,34	9,5	24,42	16,76
3	1	9	1800	32,7	1,82	8,4	25,82	12,91
3	1	15	1675	34,9	2,08	8,8	25,08	15,09
3	1	24	1740	36,4	2,09	9,0	24,84	18,04
3	2	29	1635	38,2	2,34	13,5	35,42	35,54
3	2	38	1740	39,1	2,25	11,1	28,50	22,4
3	2	48	1710	41,1	2,40	12,4	30,26	23,89
3	2	55	1600	35,2	2,20	10,0	28,53	22,14
4	1	2	1600	41,5	2,59	10,7	25,87	15,4
4	1	12	1720	39,1	2,27	11,3	28,88	27,85
4	1	20	1650	32,3	1,96	8,4	25,88	16,69
4	1	27	1650	32,2	1,95	8,0	24,89	13,69
4	2	33	1590	32,8	2,06	8,8	26,86	18,84
4	2	39	1675	43,6	2,60	12,5	28,74	20,4
4	2	42	1640	34,8	2,12	10,9	31,40	35,63
4	2	50	1690	32,7	1,93	8,4	25,59	13,43
5	1	7	1670	34,1	2,04	9,3	27,41	15,88
5	1	11	1650	32,9	1,99	7,6	23,12	12,64
5	1	16	1665	41,9	2,52	11,7	28,00	23,52
5	1	22	1775	37,6	2,12	9,8	25,95	16,29
5	2	31	1710	43,2	2,53	11,4	26,30	17,16
Trat	Bloco	Box	Peso ave (g)	Peso fígado	% fígado	Peso fígado seco	% MS fígado	% GB na MS

5	2	35	1610	39,6	2,46	10,5	26,60	21,27
5	2	44	1660	31,9	1,92	8,1	25,42	16,31
5	2	51	1710	51,1	2,99	17,1	33,51	34,57
6	1	1	1740	34,4	1,98	9,3	27,06	20,64
6	1	10	1665	38,3	2,30	10,4	27,27	18,52
6	1	19	1745	32,3	1,85	8,8	27,21	21,66
6	1	23	1705	35,1	2,06	8,8	25,15	16,35
6	2	37	1710	31,5	1,84	8,1	25,70	10,93
6	2	45	1650	34,1	2,07	9,9	29,06	31,14
6	2	49	1655	35,4	2,14	9,0	25,44	16,51
6	2	56	1620	32,2	1,99	8,1	25,03	15,15
7	1	5	1765	30,3	1,72	8,0	26,54	13,8
7	1	14	1635	31,3	1,91	8,1	26,00	13,06
7	1	18	1585	34,4	2,17	9,8	28,49	20,56
7	2	32	1695	37,5	2,21	10,2	27,26	17,53
7	2	41	1710	45,4	2,65	14,1	31,13	25,23
7	2	47	1825	41,1	2,25	10,8	26,39	25,21
7	2	53	1585	30,8	1,94	7,8	25,23	13,6

APÊNDICE 2: Dados brutos referentes ao abate (Experimento 2)

Trat	Box	Bloco	Peso ave abatida (g)	Peso fígado natural	Peso relativo fígado	Peso fígado seco	% MS	% EE na MS
1	13	1	2940	56,7	1,93	17,7	31,29	22,49
1	30	2	3080	66,0	2,14	18,9	28,70	19,79
1	32	2	3100	68,5	2,21	20,4	29,81	14,96
1	37	2	3160	58,0	1,84	15,8	27,27	13,43
3	7	1	3080	54,5	1,77	15,0	27,61	13,01
3	12	1	2940	58,5	1,99	17,3	29,62	20,20
3	23	2	3140	75,4	2,40	21,5	28,53	18,62
3	27	2	3360	64,3	1,91	17,4	27,00	18,57
3	33	2	2960	58,0	1,96	15,4	26,60	15,50
5	11	1	3140	64,9	2,07	19,3	29,70	18,23
5	20	1	3080	57,5	1,87	17,8	30,97	20,01
5	24	2	3140	59,5	1,89	17,0	28,57	15,82
5	39	2	3080	56,5	1,83	16,1	28,45	16,75

APÊNDICE 3: Dados brutos de desempenho (Experimento 1)

TRAT	NÍVEL	REP	BLOCO	BOX	PM4	CA4a14	GP4a14	CR4a14	CA4a28	GP4a28	CR4a28	CA15a28	GP15a28	CR15a28
1	0	1	1	3	118	1,390	397	551	1,548	1535	2377	1,611	1138	1834
1	0	2	1	8	118	1,355	428	580	1,408	1620	2280	1,427	1192	1700
1	0	3	1	21	118	1,276	415	530	1,466	1524	2235	1,537	1109	1705
1	0	4	1	25	114	1,315	397	522	1,472	1493	2198	1,535	1078	1655
1	0	5	2	34	117	1,427	402	574	1,549	1487	2304	1,599	1085	1734
1	0	6	2	40	118	1,316	427	562	1,436	1549	2225	1,482	1122	1662
1	0	7	2	46	114	1,370	411	562	1,440	1529	2201	1,465	1118	1639
1	0	8	2	54	115	1,360	396	538	1,525	1401	2137	1,590	1005	1598
2	100	1	1	4	112	1,436	372	534	1,404	1489	2091	1,393	1118	1557
2	100	2	1	13	119	1,322	424	560	1,393	1552	2162	1,419	1128	1602
2	100	3	1	17	119	1,399	427	598	1,429	1535	2194	1,441	1108	1596
2	100	4	1	28	113	1,348	423	570	1,412	1584	2237	1,436	1161	1667
2	100	5	2	30	119	1,396	402	561	1,485	1440	2139	1,519	1039	1578
2	100	6	2	36	118	1,367	416	569	1,485	1531	2275	1,530	1115	1707
2	100	7	2	43	121	1,278	439	562	1,454	1538	2235	1,526	1098	1676
2	100	8	2	52	115	1,407	429	603	1,451	1597	2317	1,467	1168	1714
3	200	1	1	6	119	1,340	420	562	1,401	1568	2197	1,423	1149	1634
3	200	2	1	9	122	1,314	431	566	1,403	1611	2260	1,435	1180	1693
3	200	3	1	15	113	1,368	399	546	1,502	1496	2247	1,553	1097	1704
3	200	4	1	24	114	1,432	397	568	1,414	1561	2208	1,408	1165	1640
3	200	5	2	29	115	1,555	402	624	1,512	1491	2255	1,496	1090	1630
3	200	6	2	38	118	1,348	438	591	1,424	1559	2220	1,454	1120	1629
3	200	7	2	48	115	1,315	438	576	1,403	1616	2267	1,435	1178	1691
3	200	8	2	55	118	1,423	421	599	1,575	1464	2305	1,640	1043	1711
4	300	1	1	2	116	1,397	408	570	1,437	1530	2199	1,452	1122	1629
4	300	2	1	12	118	1,414	408	576	1,440	1563	2251	1,450	1155	1674
4	300	3	1	20	111	1,481	386	571	1,485	1492	2216	1,486	1107	1645
4	300	4	1	27	119	1,336	409	546	1,400	1511	2115	1,423	1103	1569
4	300	5	2	33	112	1,398	401	561	1,454	1463	2127	1,475	1062	1566
TRAT	NÍVEL	REP	BLOCO	BOX	PM4	CA4a14	GP4a14	CR4a14	CA4a28	GP4a28	CR4a28	CA15a28	GP15a28	CR15a28

4	300	6	2	39	120	1,389	411	571	1,452	1504	2184	1,476	1093	1613
4	300	7	2	42	120	1,326	417	552	1,444	1503	2170	1,490	1086	1618
4	300	8	2	50	118	1,338	420	562	1,447	1524	2206	1,489	1104	1644
5	200	1	1	7	113	1,301	415	540	1,413	1575	2225	1,452	1160	1684
5	200	2	1	11	118	1,314	404	531	1,464	1547	2265	1,523	1143	1740
5	200	3	1	16	117	1,379	417	575	1,432	1583	2267	1,450	1167	1692
5	200	4	1	22	121	1,328	426	565	1,410	1652	2329	1,438	1226	1763
5	200	5	2	31	117	1,339	409	548	1,467	1543	2263	1,514	1133	1716
5	200	6	2	35	113	1,475	398	588	1,567	1478	2315	1,605	1063	1706
5	200	7	2	44	115	1,336	435	581	1,492	1534	2288	1,553	1099	1707
5	200	8	2	51	113	1,453	419	609	1,502	1553	2333	1,520	1135	1724
6	400	1	1	1	120	1,479	397	588	1,491	1595	2378	1,496	1198	1791
6	400	2	1	10	117	1,439	394	568	1,442	1497	2158	1,443	1102	1591
6	400	3	1	19	113	1,331	359	478	1,382	1581	2184	1,400	1222	1711
6	400	4	1	23	118	1,335	421	562	1,471	1541	2267	1,523	1120	1706
6	400	5	2	37	114	1,338	422	565	1,416	1620	2294	1,443	1198	1729
6	400	6	2	45	120	1,346	425	572	1,428	1547	2210	1,459	1122	1638
6	400	7	2	49	116	1,422	422	601	1,425	1563	2227	1,426	1140	1626
6	400	8	2	56	119	1,274	414	527	1,445	1455	2102	1,513	1041	1576
7	600	1	1	5	116	1,416	401	568	1,403	1598	2242	1,399	1197	1674
7	600	2	1	14	115	1,274	398	507	1,381	1562	2157	1,420	1164	1653
7	600	3	1	18	112	1,263	401	506	1,437	1483	2130	1,503	1082	1626
7	600	4	1	26	116	1,406	377	531						
7	600	5	2	32	116	1,718	403	692	1,614	1497	2416	1,576	1094	1724
7	600	6	2	41	115	1,283	419	538	1,387	1558	2161	1,425	1139	1623
7	600	7	2	47	118	1,490	424	632	1,467	1667	2445	1,459	1243	1813
7	600	8	2	53	118	1,501	433	650	1,532	1486	2276	1,546	1053	1628

APÊNDICE 4: Níveis de colina e delineamento experimental (Experimento 2)

Trat	Nível Inicial	Nível Cresc	Nível Final	Nível 1_28	Nível 7_28	Nível 1_35	Nível 1_42	Nível 21_42	Rep	Box	Bloco
1	177	169	157	173	173	172	167	164	1	3	1
1	177	169	157	173	173	172	168	165	2	9	1
1	177	169	157	174	173	172	167	164	3	13	1
1	177	169	157	174	173	172	168	165	4	17	1
1	177	169	157	173	173	172	168	164	5	21	1
1	177	169	157	173	173	172	167	164	6	25	2
1	177	169	157	174	173	172	167	164	7	30	2
1	177	169	157	174	173	172	168	164	8	32	2
1	177	169	157	174	173	172	168	164	9	37	2
1	177	169	157	174	173	172	168	164	10	41	2
2	377	369	357	374	373	372	368	365	1	2	1
2	377	369	357	373	373	372	368	365	2	8	1
2	377	369	357	373	373	372	368	364	3	15	1
2	377	369	357	373	373	372	368	364	4	18	1
2	377	369	357	373	373	372	368	364	5	22	2
2	377	369	357	374	373	372	368	364	6	28	2
2	377	369	357	373	373	372	368	364	7	35	2
2	377	369	357	374	373	372	368	364	8	38	2
3	577	569	557	574	573	572	568	564	1	4	1
3	577	569	557	573	573	572	568	565	2	7	1
3	577	569	557	574	573	572	568	565	3	12	1
3	577	569	557	573	573	572	568	565	4	19	1
3	577	569	557	574	573	572	567	564	5	23	2
3	577	569	557	574	573	572	567	564	6	27	2
3	577	569	557	573	573	572	568	564	7	33	2
3	577	569	557	573	573	573	573	569	8	40	2
4	777	769	757	774	773	772	768	764	1	1	1
4	777	769	757	774	773	772	768	764	2	6	1
4	777	769	757	773	773	772	768	765	3	10	1
4	777	769	757	774	773	772	768	765	4	16	1
4	777	769	757	774	773	772	768	764	5	26	2
4	777	769	757	774	773	772	768	764	6	29	2
4	777	769	757	774	773	772	767	764	7	36	2
4	777	769	757	774	773	772	768	764	8	42	2
5	977	969	957	973	973	972	968	964	1	5	1
5	977	969	957	974	973	972	968	964	2	11	1
5	977	969	957	974	973	972	968	964	3	14	1
5	977	969	957	974	973	972	968	964	4	20	1
5	977	969	957	974	973	972	967	964	5	24	2
5	977	969	957	973	973	972	968	964	6	31	2
5	977	969	957	974	973	972	968	964	7	34	2
5	977	969	957	973	973	972	968	964	8	39	2

APÊNDICE 5: Dados brutos de desempenho (Experimento 2)

Trat	PM1	PM7	CA1a7	GP1a7	CR1a7	PM14	CA8a14	GP8a14	CR8a14	CA1a14
1	45	169	1,139	123	140	440	1,288	271	349	1,240
1	45	175	1,192	130	155	440	1,340	265	355	1,291
1	46	162	1,471	116	170	417	1,324	255	338	1,370
1	47	176	1,130	130	146	479	1,227	303	371	1,198
1	46	173	1,374	126	174	473	1,261	300	378	1,294
1	47	149	1,197	102	122	380	1,339	232	310	1,296
1	48	162	1,295	114	148	407	1,382	245	339	1,354
1	47	164	1,383	117	162	454	1,289	284	365	1,318
1	47	163	1,263	116	146	454	1,335	290	388	1,314
1	47	176	1,113	129	144	488	1,248	312	389	1,208
2	47	191	1,223	145	177	495	1,296	304	394	1,273
2	46	179	1,192	133	158	485	1,230	307	377	1,218
2	48	168	1,317	120	159	475	1,249	301	376	1,270
2	47	185	1,277	138	176	477	1,261	292	369	1,266
2	47	176	1,119	130	145	470	1,267	294	373	1,222
2	47	176	1,361	130	176	450	1,346	274	368	1,351
2	47	181	1,221	134	163	455	1,477	274	404	1,393
2	47	176	1,257	128	161	435	1,432	260	372	1,372
3	46	187	1,207	140	170	494	1,300	307	400	1,271
3	46	182	1,252	135	170	489	1,284	307	395	1,274
3	46	160	1,393	115	160	456	1,286	296	380	1,316
3	46	173	1,246	127	159	441	1,336	268	358	1,307
3	47	164	1,547	117	181	439	1,364	275	375	1,418
3	46	183	1,153	136	157	518	1,230	329	405	1,206
3	47	180	1,230	132	163	429	1,526	250	381	1,424
3	47	158	1,290	111	144	450	1,382	284	393	1,354
4	48	181	1,235	133	165	497	1,311	309	405	1,287
4	46	185	1,141	139	159	478	1,362	285	388	1,285
4	46	172	1,167	125	146	466	1,243	296	368	1,217
4	47	174	1,237	127	157	472	1,329	298	396	1,302
4	47	186	1,173	139	163	459	1,428	273	390	1,342
4	47	170	1,380	123	170	426	1,552	256	397	1,496
4	47	154	1,502	107	160	400	1,519	247	375	1,514
4	47	168	1,228	121	149	406	1,555	238	370	1,445
5	46	178	1,183	132	156	438	1,428	260	372	1,345
5	47	175	1,296	128	166	462	1,253	287	360	1,267
5	47	162	1,303	115	150	440	1,255	278	349	1,269
5	46	168	1,463	122	178	467	1,334	295	393	1,375
5	47	170	1,267	123	155	455	1,282	285	366	1,277
5	47	178	1,394	131	183	461	1,357	283	384	1,369
5	47	177	1,359	130	177	459	1,515	282	427	1,465
5	47	180	1,143	133	152	464	1,355	283	384	1,287

APÊNDICE 5: Continuação

Trat	GP1a14	CR1a14	PM21	CA15a21	GP15a21	CR15a21	CA1a21	GP1a21	CR1a21
1	394	488	883	1,510	386	583	1,279	838	1071
1	395	510	940	1,165	543	633	1,311	894	1172
1	371	509	896	1,317	475	625	1,334	850	1134
1	432	518	967	1,134	558	632	1,250	920	1150
1	426	552	972	1,235	536	662	1,312	925	1214
1	333	432	869	2,119	290	614	1,311	823	1078
1	359	486	909	1,476	432	638	1,338	861	1153
1	406	535	931	1,494	445	665	1,358	884	1200
1	406	534	970	1,276	533	680	1,315	923	1214
1	441	533	1000	1,174	570	669	1,262	952	1201
2	448	570	1039	1,175	590	693	1,302	992	1292
2	440	535	993	1,214	553	672	1,275	947	1207
2	427	542	962	1,405	468	658	1,312	914	1199
2	430	545	1045	1,249	566	707	1,279	998	1276
2	424	518	992	1,243	537	668	1,285	945	1215
2	403	545	945	1,328	485	644	1,323	898	1189
2	407	567	998	1,409	496	698	1,366	951	1298
2	388	532	940	1,688	387	653	1,359	893	1213
3	448	569	1022	1,194	585	699	1,299	976	1268
3	443	564	977	1,167	555	647	1,302	930	1211
3	410	540	992	1,341	503	675	1,316	946	1244
3	395	517	913	1,395	438	611	1,302	867	1128
3	392	556	955	1,280	515	659	1,339	908	1215
3	472	569	1068	1,342	524	704	1,244	1021	1271
3	382	544	937	1,138	512	583	1,266	890	1126
3	403	545	945	1,579	424	669	1,352	898	1214
4	449	577	1003	1,320	507	669	1,304	955	1246
4	431	554	990	1,298	507	658	1,284	944	1212
4	419	510	939	1,464	428	627	1,272	893	1136
4	425	553	969	1,260	515	648	1,303	922	1201
4	412	553	926	1,290	483	623	1,338	879	1176
4	379	567	948	1,486	441	656	1,395	901	1257
4	354	535	902	1,644	388	637	1,411	855	1207
4	360	520	878	1,491	436	650	1,403	831	1166
5	392	528	900	1,159	507	588	1,313	854	1121
5	415	526	962	1,379	482	664	1,301	915	1190
5	394	500	896	1,352	445	601	1,295	850	1100
5	421	578	979	1,465	456	668	1,336	933	1246
5	408	521	1021	1,306	534	697	1,287	974	1253
5	414	567	973	1,489	450	670	1,372	926	1271
5	412	604	959	1,271	523	665	1,391	912	1269
5	416	536	978	1,244	540	672	1,297	931	1208

APÊNDICE 5: Continuação

Trat	PM28	CA22a28	GP22a28	CR22a28	CA1a28	GP1a28	CR1a28	PM35	CA29a35
1	1518	1,393	635	885	1,328	1473	1955	2082	1,773
1	1570	1,455	631	918	1,370	1525	2088	2274	1,605
1	1378	1,643	482	792	1,446	1332	1926	2140	1,570
1	1560	1,474	593	874	1,338	1513	2024	2269	1,549
1	1638	1,479	666	985	1,382	1592	2200	2435	1,532
1	1456	1,471	586	862	1,377	1409	1940	2275	1,698
1	1438	1,625	529	860	1,446	1390	2011	2124	1,699
1	1510	1,442	579	835	1,391	1463	2035	2186	1,663
1	1596	1,455	626	911	1,372	1549	2125	2342	1,580
1	1618	1,491	619	922	1,352	1571	2124	2362	1,671
2	1662	1,496	624	933	1,376	1615	2222	2451	1,668
2	1631	1,486	638	948	1,360	1585	2155	2356	1,599
2	1602	1,480	640	947	1,381	1554	2146	2386	1,574
2	1710	1,503	665	1000	1,367	1663	2273	2488	1,596
2	1660	1,456	668	973	1,355	1613	2186	2424	1,534
2	1542	1,502	597	896	1,395	1495	2085	2265	1,618
2	1642	1,607	644	1036	1,456	1595	2322	2431	1,589
2	1576	1,469	636	934	1,404	1528	2146	2280	1,615
3	1631	1,503	609	915	1,377	1585	2182	2393	1,535
3	1686	1,453	709	1030	1,363	1640	2235	2486	1,533
3	1584	1,528	593	906	1,397	1538	2148	2342	1,573
3	1545	1,445	633	914	1,362	1500	2042	2251	1,606
3	1598	1,444	644	930	1,383	1551	2145	2293	1,675
3	1611	1,595	543	867	1,362	1565	2132	2340	1,652
3	1575	1,434	637	914	1,336	1527	2040	2307	1,598
3	1616	1,445	672	970	1,392	1569	2184		
4	1638	1,428	635	907	1,354	1590	2153	2320	1,625
4	1618	1,474	628	926	1,360	1572	2137	2380	1,755
4	1573	1,440	634	913	1,341	1527	2047	2331	1,504
4	1566	1,551	597	926	1,393	1519	2116	2254	1,619
4	1507	1,475	581	858	1,392	1460	2034	2120	1,760
4	1586	1,457	638	930	1,421	1539	2187	2200	1,906
4	1480	1,593	578	921	1,479	1433	2120	2193	1,598
4	1396	1,618	518	838	1,483	1349	2001	2122	1,606
5	1520	1,421	621	882	1,357	1474	2000	2234	1,555
5	1590	1,472	629	925	1,370	1543	2114	2310	1,567
5	1453	1,506	556	838	1,379	1406	1938	2122	1,601
5	1640	1,439	661	951	1,378	1594	2197	2396	1,561
5	1652	1,462	632	924	1,356	1605	2176	2306	1,758
5	1572	1,666	599	998	1,486	1525	2267	2264	1,673
5	1580	1,518	621	942	1,442	1533	2211	2252	1,767
5	1616	1,472	638	940	1,368	1569	2147	2358	1,576

APÊNDICE 5: Continuação

Trat	GP29a35	CR29a35	CA1a35	GP1a35	CR1a35	PM42	CA36a42	GP36a42	CR36a42
1	564	1000	1,451	2037	2955	2998	1,577	820	1293
1	704	1130	1,444	2229	3217	2952	1,765	678	1197
1	762	1196	1,491	2094	3122	2946	1,782	738	1315
1	709	1098	1,405	2222	3122	2876	1,835	607	1114
1	796	1220	1,432	2388	3420	3116	1,994	681	1359
1	720	1223	1,477	2228	3290	3078	1,704	803	1368
1	686	1166	1,526	2077	3168	3108	1,631	875	1427
1	676	1124	1,477	2139	3158	3022	1,620	836	1354
1	745	1178	1,440	2295	3303	3067	1,792	725	1300
1	692	1156	1,443	2315	3340	3158	1,648	796	1312
2	682	1138	1,456	2404	3500	3136	1,806	684	1236
2	725	1160	1,435	2310	3315	3045	1,777	689	1225
2	784	1234	1,445	2338	3379	3142	1,735	756	1312
2	778	1242	1,440	2441	3513	3270	1,778	782	1391
2	764	1172	1,412	2377	3357	3206	1,677	782	1312
2	724	1171	1,468	2219	3256	3073	1,693	807	1366
2	789	1253	1,498	2384	3570	3256	1,716	824	1415
2	704	1138	1,470	2233	3281	3091	1,677	811	1361
3	762	1169	1,428	2346	3351	3100	1,770	707	1252
3	800	1226	1,417	2440	3457	3228	1,756	742	1303
3	758	1192	1,454	2296	3339	3050	1,742	708	1234
3	705	1133	1,440	2205	3175	2913	1,786	662	1182
3	695	1164	1,473	2246	3309	3133	1,695	840	1424
3	729	1204	1,453	2294	3332	3282	1,617	942	1524
3	733	1171	1,421	2260	3211	3085	1,681	778	1308
3									
4	682	1108	1,435	2272	3260	3138	1,645	818	1346
4	762	1337	1,470	2334	3430	3198	1,666	818	1362
4	758	1140	1,394	2285	3186	3047	1,720	716	1231
4	688	1114	1,461	2207	3225	2938	1,749	684	1197
4	613	1078	1,501	2073	3112	2966	1,708	776	1326
4	614	1170	1,558	2153	3354	3006	1,693	806	1365
4	713	1140	1,517	2147	3256	3160	1,614	888	1433
4	726	1166	1,525	2075	3166	2924	1,665	802	1335
5	714	1110	1,420	2188	3107	2914	1,767	680	1202
5	720	1128	1,432	2263	3241	3038	1,742	728	1268
5	669	1071	1,450	2075	3009	2934	1,667	752	1254
5	756	1180	1,437	2350	3376	3142	1,716	746	1280
5	654	1150	1,472	2259	3325	3176	1,682	870	1464
5	692	1158	1,544	2217	3424	3086	1,651	822	1357
5	672	1187	1,535	2205	3385	3086	1,678	834	1400
5	742	1169	1,435	2311	3316	3122	1,671	764	1276

APÊNDICE 5: Continuação

Trat	CA1a42	GP1a42	CR1a42	CA22a42	GP22a42	CR22a42	CA29a42	GP29a42
1	1,484	2952	4382	1,574	2115	3328	1,662	1480
1	1,518	2907	4413	1,612	2013	3244	1,683	1382
1	1,562	2900	4529	1,663	2050	3408	1,669	1568
1	1,497	2830	4236	1,616	1910	3086	1,681	1316
1	1,544	3070	4738	1,648	2144	3533	1,729	1478
1	1,535	3031	4653	1,632	2208	3603	1,701	1523
1	1,552	3060	4750	1,652	2199	3633	1,663	1670
1	1,517	2975	4512	1,584	2091	3313	1,639	1512
1	1,524	3020	4603	1,616	2097	3389	1,685	1471
1	1,494	3111	4646	1,606	2158	3466	1,658	1488
2	1,531	3089	4729	1,656	2097	3473	1,737	1366
2	1,514	3000	4540	1,624	2053	3333	1,686	1415
2	1,516	3094	4691	1,602	2180	3493	1,653	1540
2	1,521	3223	4902	1,632	2225	3632	1,688	1560
2	1,477	3159	4667	1,561	2214	3456	1,606	1546
2	1,528	3026	4622	1,614	2128	3434	1,657	1531
2	1,552	3208	4979	1,641	2258	3704	1,654	1613
2	1,524	3044	4640	1,596	2151	3432	1,648	1516
3	1,507	3054	4601	1,605	2078	3334	1,647	1469
3	1,494	3182	4753	1,581	2251	3560	1,640	1542
3	1,522	3004	4571	1,618	2059	3331	1,655	1466
3	1,520	2867	4357	1,615	2000	3229	1,693	1367
3	1,534	3086	4733	1,615	2178	3517	1,686	1535
3	1,500	3236	4853	1,623	2214	3595	1,633	1671
3	1,487	3038	4519	1,579	2148	3393	1,641	1511
3								
4	1,490	3090	4606	1,574	2135	3361	1,636	1500
4	1,517	3151	4781	1,632	2208	3602	1,708	1580
4	1,471	3000	4414	1,558	2107	3283	1,609	1473
4	1,528	2891	4416	1,644	1969	3238	1,684	1372
4	1,554	2919	4535	1,654	2040	3373	1,732	1459
4	1,594	2959	4718	1,683	2058	3464	1,785	1420
4	1,542	3113	4801	1,603	2258	3619	1,607	1680
4	1,564	2877	4499	1,632	2046	3339	1,637	1528
5	1,501	2868	4305	1,585	2015	3193	1,658	1394
5	1,507	2991	4508	1,599	2077	3321	1,655	1448
5	1,504	2887	4342	1,597	2038	3253	1,634	1481
5	1,504	3096	4656	1,577	2163	3411	1,638	1502
5	1,530	3129	4787	1,641	2156	3537	1,715	1524
5	1,573	3039	4780	1,663	2113	3513	1,661	1514
5	1,572	3039	4779	1,655	2127	3521	1,718	1506
5	1,494	3075	4592	1,579	2144	3385	1,624	1505

APÊNDICE 5: Continuação

TRAT	CR29a42	CA8a21	GP8a21	CR8a21	CA8a28	GP8a28
1	2459	1,419	715	1014	1,406	1350
1	2327	1,226	764	937	1,325	1395
1	2617	1,319	735	969	1,448	1216
1	2212	1,166	790	922	1,292	1384
1	2555	1,244	799	994	1,348	1465
1	2590	1,752	721	1263	1,607	1307
1	2777	1,440	747	1076	1,519	1276
1	2478	1,414	761	1076	1,427	1340
1	2478	1,297	807	1047	1,365	1433
1	2468	1,200	823	988	1,320	1442
2	2374	1,219	847	1032	1,330	1471
2	2385	1,220	814	993	1,333	1452
2	2546	1,344	789	1060	1,406	1429
2	2633	1,254	860	1078	1,361	1525
2	2484	1,252	816	1021	1,341	1484
2	2537	1,334	769	1026	1,408	1365
2	2668	1,434	817	1172	1,507	1461
2	2498	1,579	765	1207	1,526	1400
3	2420	1,231	835	1028	1,341	1444
3	2529	1,209	795	961	1,313	1504
3	2426	1,319	831	1096	1,406	1424
3	2315	1,373	740	1015	1,407	1372
3	2588	1,309	790	1035	1,370	1434
3	2728	1,297	879	1140	1,411	1422
3	2479	1,265	758	958	1,342	1395
3		1,500	779	1168	1,473	1451
4	2454	1,317	815	1073	1,366	1450
4	2697	1,321	797	1053	1,389	1425
4	2371	1,375	770	1059	1,406	1404
4	2311	1,285	795	1022	1,390	1392
4	2527	1,340	740	991	1,399	1321
4	2535	1,512	778	1176	1,486	1416
4	2699	1,593	748	1192	1,593	1326
4	2501	1,515	710	1075	1,559	1228
5	2312	1,255	722	906	1,327	1342
5	2396	1,332	787	1047	1,395	1415
5	2421	1,314	734	965	1,398	1290
5	2460	1,414	807	1140	1,426	1468
5	2614	1,297	851	1103	1,367	1482
5	2515	1,435	795	1141	1,537	1394
5	2587	1,356	782	1061	1,427	1403
5	2445	1,282	798	1023	1,365	1436

APÊNDICE 5: Continuação

TRAT	CR8a28	CA8a42	GP8a42	CR8a42
1	1897	1,534	2829	4341
1	1847	1,499	2777	4161
1	1761	1,568	2784	4366
1	1787	1,477	2700	3987
1	1976	1,531	2943	4507
1	2100	1,658	2929	4857
1	1939	1,594	2946	4697
1	1912	1,540	2852	4393
1	1957	1,526	2904	4433
1	1903	1,480	2982	4414
2	1956	1,511	2944	4447
2	1936	1,504	2867	4313
2	2008	1,535	2969	4556
2	2075	1,524	3085	4703
2	1990	1,475	3030	4467
2	1923	1,540	2896	4461
2	2202	1,583	3075	4866
2	2136	1,592	2916	4640
3	1937	1,492	2913	4346
3	1974	1,471	3046	4480
3	2002	1,532	2890	4428
3	1930	1,551	2740	4250
3	1964	1,533	2969	4552
3	2006	1,531	3093	4735
3	1872	1,497	2906	4350
3	2136			
4	1980	1,503	2950	4434
4	1979	1,541	3005	4631
4	1973	1,512	2877	4349
4	1935	1,532	2764	4234
4	1848	1,564	2780	4349
4	2104	1,639	2836	4647
4	2113	1,600	3006	4811
4	1914	1,602	2756	4416
5	1781	1,491	2736	4078
5	1974	1,527	2863	4372
5	1804	1,519	2772	4211
5	2092	1,535	2970	4558
5	2027	1,544	3006	4641
5	2142	1,602	2908	4659
5	2001	1,570	2909	4565
5	1960	1,497	2941	4402

Apêndice 6. Normas da revista:

**The Journal of Applied Poultry Research:
Instructions to Authors**

Editorial Policies and Procedures

The mission of *The Journal of Applied Poultry Research* (JAPR) is to provide practical, reliable, and timely information to those whose livelihoods are derived from the commercial production of poultry and those whose research benefits this sector; address topics of near-term application based on appropriately designed studies and critical observations; encourage scientific approaches to practical problem solving; and present information comprehensible to a broad readership. By submission of a manuscript, the authors guarantee to the journal that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, thesis, or dissertation); that it is not under consideration for publication elsewhere; and that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out. Appropriate identification of previously published preliminary reports should be provided in a title page footnote. Translations of an article into other languages for publication require approval by the editor-in-chief. Opinions or views expressed in papers published by JAPR are those of the authors and do not necessarily represent the opinion of the Poultry Science Association (PSA) or the editor-in-chief.

Before manuscripts are submitted, authors should have them read critically by others well versed in English to facilitate review; all coauthors should approve the manuscript before its submission to the journal.

Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Jesse Grimes, North Carolina State University, Department of Poultry Science, Box 7608, Raleigh, NC 27695 (e-mail: jesse_grimes@ncsu.edu).

For assistance with ScholarOne Manuscripts, manuscript submission, or copyright forms, contact Shauna Miller, headquarters office, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820 (FAX: 217- 378-4083; shaunam@assochoq.org). For questions about manuscript preparation or supplemental files, contact Chris Davies (chrisd@assochoq.org). For other information contact Susan Pollock, managing editor, headquarters office, Poultry Science Association, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820, (telephone: 217- 356-7641; FAX: 217-378-4083;journals@assochoq.org).

Care and Use of Animals

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guidelines*

for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd ed., 2010 (Federation of Animal Science Societies, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820); and, if applicable, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd ed., Vol. 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intraabdominal or intrathoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes

caponization. The editor-in-chief of JAPR may refuse to publish manuscripts that are not compatible with these guidelines. If rejected solely on that basis, however, the paper may be resubmitted for reconsideration when accompanied by a written verification that a committee on animal care in research has approved the experimental design and procedures involved.

Types of Articles

Research Reports. Most papers published in JAPR are research reports. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts, apparatus, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in JAPR must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

In addition to research reports, other types of papers appear in the journal: **Field Reports.** Field reports will be published when adequate background is available and conclusions can be supported by quantifiable laboratory or diagnostic results. The manuscript should follow the format outlined in the Style and Form. It should include a section titled Field Report in which the observations are explained and discussed under subheadings of Materials and Methods and Results and Discussion. Authors are encouraged to include subheadings for all major areas in this section.

Review Articles. Articles submitted to this section may cover new developments in a field, describe the evolution of a currently accepted management practice, propose changes in management based on current research, or describe procedures. Clear distinctions should be made between firmly established practices and unresolved questions. Articles should begin with a concise description of the topic, followed by a critical evaluation of the important references. Review articles, whether solicited or unsolicited, will be subject to a stringent review process. Review articles should follow the general format outlined in the Style and Form, when appropriate, and include brief subheadings to separate main ideas. The title page should use the appropriate format and include a summary and statement of primary audience. Review articles may include tables, figures, and photographs. A Conclusions and Applications section should be included in most cases. The use of copyrighted materials must be by permission of the copyright holders. Authors are responsible for obtaining copyright permissions and sending them to the managing editor.

Symposium and Workshop Articles. Manuscripts presented at the annual meeting as part of a symposium or workshop may be submitted with prior agreement by the editor-in-chief. These submissions will be subject to peer review and may be accepted or rejected in the same manner as other submissions. The format may be similar to reviews, research reports, or field reports, as outlined in the Style and Form.

Letters and Commentaries. The journal accepts letters, book reviews, and other free-form communications (used to correct errors, provide clarification, or offer other points of view on pertinent issues). Submissions may be edited in consultation with the author.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers online to our web-based submission and review system (<http://mc.manuscriptcentral.com/japr>). Detailed instructions for submitting electronically are provided online at that site. Authors who are unable to submit online should contact the editorial office (shaunam@assoqh.org) for assistance.

Copyright Agreement

When a manuscript is accepted for publication, the authors agree to transfer copyright to the publisher, that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders, that written permission of the copyright holder has been obtained by the authors for material used from other copyrighted

sources (including tables, graphs, figures, and illustrations), and that any costs associated with obtaining this permission are the authors' responsibility. The Manuscript Submission and Copyright Transfer Form (available on the JAPR Web site: http://www.oxfordjournals.org/our_journals/japr/for_authors/index.html) must be completed and filed with the editorial office for each paper submitted; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Transfer form and must be completed by all authors before publication can proceed. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of coauthors. Authors who are not permitted to release copyright, such as federal employees, must still sign and return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

The journal uses a two-stage review process. All manuscripts will first receive a preliminary review to ensure appropriateness for the journal. The second review will be a more detailed scrutiny by individuals knowledgeable in the specific subject area of the paper. Additional examination of the manuscript will be made by the editors. The review process will be stringent. Names of authors will be made known to reviewers; reviewers may contact the authors directly with questions, suggestions, and comments if such contact will improve the paper or streamline the review process. The subject editors will handle all initial correspondence with authors during the review process; the editor-in-chief will notify the author of the final decision to accept or reject.

PRODUCTION OF PROOFS

Accepted manuscripts are forwarded to the editorial department for preparation for typesetting. At this point, a technical editor may contact the authors for missing information or table or figure revisions. The manuscript is then typeset, figures are reproduced, and author proofs are prepared.

Proofs

Author proofs of all manuscripts will be provided to the corresponding author. Author proofs should be read carefully and checked against the typed manuscript, because the responsibility for proofreading is with the author(s). Corrections may be returned by fax (217-378-4083), mail, or email. For faxed or mailed corrections, changes to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. If extensive editing is required, corrections should be provided on a separate sheet of paper with a symbol indicating location on the proof. Changes sent by e-mail to the technical editor must indicate page, column, and line numbers for each correction to be made on the proof. Corrections can also be marked using the note and highlight tools to indicate necessary changes. Author alterations to copy exceeding 10% of the cost of composition will be charged to the author. Editor queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication. Proof corrections should be made and returned to the technical editor within 48 hours of receipt. The publication charge form should be returned with proof corrections so as not to delay publication of the article.

Publication Charges and Offprints

Two options are available for the publication of articles in this journal: conventional page charges and Open Access (OA).

Conventional Page Charges. The current charge for publication is \$60 per printed page (or fraction thereof) in the journal if at least one author is a current professional member of PSA. If no author is a member of PSA, the publication charge is \$85 per journal page.

OA. For authors who wish to publish their papers OA (freely available without subscription when the issue is posted online), authors will pay the OA fee when proofs

are returned to the editorial office. Charges for OA are \$2,400 if at least one author is a current professional member of PSA; the charge is \$3,100 when no author is a professional member.

Offprints. Offprints may be ordered at an additional charge. When the galley proof is sent, the author is asked to complete an offprint order requesting the number of offprints desired and the name of the institution, agency, or individual responsible for publication charges.

Color Charges. The cost to publish in color in the print journal is \$600 per color image; a surcharge for offprints will also be assessed. At the time of submission on ScholarOne Manuscripts, authors will be asked to approve color charges for figures that they wish to have published in color in the print journal. Color versions of figures will be included in the online PDF and full-text article at no charge.

MANUSCRIPT PREPARATION: STYLE AND FORM

General

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in *The American Heritage Dictionary*, *Webster's Third New International Dictionary*, or the *Oxford American English Dictionary*. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 2006. 7th ed. Style Manual Committee, Council of Science Editors, Reston, VA. Authors should prepare their manuscripts with Microsoft Word and upload them using the fewest files possible to facilitate the review and editing process. Authors whose primary language is not English are strongly encouraged to use an English-language service to facilitate the preparation of their manuscript. A partial list of services can be found in the manuscript revision checklist.

Preparing the Manuscript File

Manuscripts should be submitted in Microsoft Word and should be double-spaced with lines and pages numbered consecutively using Times New Roman font at 12 points. All special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType or another equation editor. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscripts (not placed in the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript. Metric or English units (or both) are acceptable. Authors should use units appropriate for the intended audience. Energy content of feeds will be expressed as calories.

Headings

Major Headings. Major headings are centered, boldface, in all capital letters, and consist of SUMMARY, DESCRIPTION OF PROBLEM, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES. Major headings in review articles, field reports, and symposium articles may vary from those listed here, but should include SUMMARY, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES.

First Subheadings. First subheadings are boldface and italic, on a separate line beginning at the left margin, and have the first letter of each important word capitalized. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word is capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

- The title should be indicative of the content. It should capture the interest of all who might benefit from information in the manuscript. However, the length of the title should be kept to a minimum.

- Address and affiliation of authors (listed by first name or initials, middle initial, and last name) should be included. Indicate to whom correspondence should be directed by means of a footnote, with the notation “Corresponding author: (e-mail address)” at the bottom of the title page.
- List 3 to 8 key words or phrases to identify the most important subjects covered by the paper.
- The running title should be 30 characters or less, including spaces.
- Statement of primary audience. To determine appropriateness for the journal and to assist in selecting reviewers, the author should indicate clearly what sector(s) within the poultry community (e.g., flock supervisors, nutritionists, quality assurance personnel, researchers, plant managers, veterinarians) could benefit most from the content of this article.

Summary

The Summary (12 to 16 lines) is not an abstract. It is intended to give readers with diverse backgrounds a general appreciation of the manuscript contents. It should be written so that even those not directly interested in the topic will enjoy reading at least this section to keep abreast of areas other than their own. This section should not include details of materials and methods or a detailed review of the results. Keep the summary free-flowing, giving the reader a general, not specific, idea of what the study revealed. Do not include reference citations in the summary.

Description of Problem

This section will acquaint the reader with the problem, citing field experiences where appropriate. Readability is of utmost importance. Detailed literature reviews may not be appropriate for this section. A more extensive citation of references should be included in the Results and Discussion or References and Notes section. This section should end with a statement of the objective(s) of the study.

Materials and Methods

The author(s) should clearly establish in the Materials and Methods section why the problem was approached in a particular way. The rationale for including each treatment should be clearly stated. Detailed laboratory and bird management procedures should be described in the References and Notes section and not in the Materials and Methods section. Sources of stock, equipment, and materials should be listed in the References and Notes section and referred to in text by citation number. A brief statement of the statistical methods should be included, with more detailed descriptions placed in the References and Notes section. In manuscripts using several treatments, a description of treatments should be included as Table 1.

Results and Discussion

This section begins with observed results and their interpretation. Descriptive subheadings may precede all major paragraphs and changes in subject emphasis. This section should discuss specifically how findings address the problem described in the Description of Problem section and how they are related to published works. Statements regarding statistically significant differences between treatments in results should be included in the text, tables, and figures. Statements regarding differences should be avoided unless they are supported by statistical analyses and meet the stated level of probability (e.g., $P < 0.05$).

Conclusions and Applications

Conclusions and recommendations of the author(s) should be listed numerically. Each statement should be clear, concise, and without discussion. Authors are encouraged to summarize their significant findings, to identify further research needs, and to describe the constraints, economics, and other factors associated with using the results in scientific or commercial applications. Do not include references in this section.

References and Notes (with Acknowledgments)

References and notes should be cited in text, by number within an editorial bracket (e.g., [1]). In the References and Notes section, citations should be listed in the order they appear and are numbered in the text (not alphabetically). Authors are encouraged to use reference management software (e.g., EndNote or Reference Manager) to facilitate renumbering or inserting references by the editor or inserting references during the revision process. Manuscripts may be returned to authors *before review* for renumbering of references if not cited in numerical order. Include details such as statistical analysis; detailed procedures; sources of birds, instruments, or items; details of designed instruments; a literature review; and other tangential matters. Cite acknowledgments at the end of this section in a subsection called *Acknowledgments*. These entries are not numbered.

Sample References

NOTE: The headings that appear above the following sample references and notes are for clarification in these instructions, but they are not used in an actual paper, except for *Acknowledgments*.

Journal Article

1. Dansky, L. M., and F. W. Hill. 1952. Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chicks. *J. Nutr.* 47:449–459.
2. Snow, J. L., M. W. Douglas, and C. M. Parsons. 2003. Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 82:474–477.
3. Witter, R. L., and I. M. Gimeno. 2006. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian Dis.* 50:354–365. doi:10.1637/7498-010306R.1

Monograph

4. NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Dissertation

5. Heskett, E. A. 2003. Efficacy of a recombinant herpes virus of turkeys vector vaccine, expressing genes to Newcastle disease virus and Marek's disease virus, in chickens and turkeys against exotic Newcastle disease virus challenge. PhD Diss. Univ. Florida, Gainesville.

Trade Publication

6. Wilgus, H. S. 1973. Temperature-programmed feeding schedules and other means of conserving protein in market turkey production. *Feedstuffs* 45(27):27–31.

Book or Chapter in Book

7. AOAC International. 2007. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Rev. 2. AOAC Int., Gaithersburg, MD.
8. Whittow, G. C. 1976. Regulation of body temperature. Pages 146–173 in *Avian Physiology*. P. D. Sturkie, ed. Springer-Verlag, New York, NY.

Proceedings

9. Hruby, M., J. C. Remus, and E. E. M. Pierson. 2004. Nutritional strategies to meet the challenge of feeding poultry without antibiotic growth promotants. Pages 3–5 in *Proc. 2nd Mid-Atlantic Nutr. Conf.*, Timonium, MD. Univ. Maryland, College Park.

Federal Register

10. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collections at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. *Fed. Regist.* 69:10137–10151.

Laboratory Procedure

11. The extract was added to 30 mL of hexane, made to 100 mL with 10% aqueous Na₂SO₄.

Personal Communication

12. Wilson, H. R. 2005. Univ. Florida, Gainesville. Personal communication.

Proprietary Product

13. Avizyme TX, Finnfeed International, Marlborough, Wiltshire, UK.

14. Thymol, 99% purity, Acros Organics, Geel, Belgium.

Statistical Procedure

If a note has an embedded reference, the reference is cited by number (as in the text) or parenthetically within the note:

15. Data were analyzed by ANOVA with flock as the independent variable. When differences among flocks were significant, means were separated using Duncan's multiple range test (SAS User's Guide, 2001, Version 8 ed., SAS Institute Inc., Cary, NC). Pearson product-moment correlation coefficients were calculated between average percentage cracks from each flock recorded every week and average values for egg-specific gravity, breaking strength, percentage shell, shell thickness, and shell weight per unit of surface area. Significance implies $P < 0.05$.

Statistical Software

16. SAS User's Guide. 2001. Version 8 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

US Patent

17. El Halawani, M. E., and I. Rosenboim. 2004. Method to enhance reproductive performance in poultry. Univ. Minnesota, assignee. US Pat. No. 6,766,767.

Website

18. Dyro, F. M. 2005. Arsenic. WebMD. Accessed Feb. 2006. <http://www.emedicine.com/neuro/topic20.htm>.

Acknowledgments

The advice and technical assistance of Thomas Jones (affiliation, location) are acknowledged.

Tables

Number tables consecutively according to the citation in the text. Tables must be created using the MS Word table feature and inserted in the manuscript after the references section. Each table must be placed on a separate page and must have a clear descriptive heading so that the meaning of the data will be understandable without reference to the text. Indicate footnotes to tables with numbers, beginning with 1. Statistical notation should be made with lowercase and uppercase superscript letters or with asterisks, as appropriate. Statistical notation should place the superscript "a" on the largest mean. Probability values may be indicated as follows: $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, and $\dagger P \leq 0.10$.

Consult a recent issue of the journal for examples of tables.

Figures

- **Figure Size.** Prepare figures at the final size for publication. Figures should be created at the final publication size of 7 cm wide (2.75 inches) or 14 cm wide (5.5 inches).

- **Font Size.** Ensure that all type within the figure and axis labels is readable at the final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.

- **Fonts.** Use Helvetica or Times New Roman. Symbols may be inserted using the Symbol palette in Times New Roman.

- **Line Weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long dash, short dash, and dotted lines. Avoid the use of color, gray, or shaded lines because these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.

- **Axis Labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses, and should be consistent within a manuscript.

- **Shading and Fill Patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed (e.g., black, white, gray, diagonal stripes). Avoid the use of multiple shades of gray because they will not be easily distinguishable in print.

- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: □, ■, ○, ●, ▲, ▼, △, ▽, ◇, ◆, +, or ×. Symbols should be defined in a key on the figure if possible.
- **File Formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG. Avoid Power-Point files and other formats. For the best printed quality, line art should be prepared at 600 ppi. Grayscale and color images and photomicrographs should be at least 300 ppi.
- **Grayscale Figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.
- **Color Figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).
- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.
- **Caption.** The caption should provide sufficient information so that the figure can be understood without excessive reference to the text. All author-derived abbreviations used in the figure should be defined in the caption.
- **General Tips.** Avoid the use of 3-dimensional bar charts unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and the key are clear and easily readable at the final publication size.

Color Charges. The cost to publish in color in the print journal is \$600 per color image; a surcharge for offprints will also be assessed. At the time of submission on ScholarOne Manuscripts, authors will be asked to approve color charges for figures that they wish to have published in color in the print journal. Color versions of figures will be included in the online PDF and full-text article at no charge.

Abbreviations

The following abbreviations may be used without definition in JAPR. Plurals do not require "s." Chemical symbols and 3-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Other abbreviations should be defined at first use in the summary and the main text, as well as in each table or figure in which they appear. Author-defined abbreviations are boldface at first use in the main text. Abbreviations should not be used in the manuscript title, running title, or to begin a paragraph or sentence. They can be used in section headings if previously defined. This list appears inside the back cover of each issue of the journal.

ADF acid detergent fiber

ADFI average daily feed intake

ADG average daily gain

AME apparent metabolizable energy

AMEn nitrogen-corrected apparent metabolizable energy

ANOVA analysis of variance

AOAC Association of Official Analytical Chemists

BSA bovine serum albumin

BW body weight

°C Celsius

cDNA complementary DNA

CF crude fiber

cfu colony-forming units (following a numeral)

CI confidence interval

CP crude protein

cpm counts per minute

CV coefficient of variation

d day

df degrees of freedom
DM dry matter
DNA deoxyribonucleic acid
EDTA ethylenediaminetetraacetate
10 JAPR: Instructions to Authors
EE ether extract
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
°F Fahrenheit
FCR feed conversion ratio
FE feed efficiency
ft foot
g gram
gal gallon
G:F gain-to-feed ratio
GLM general linear model
h hour
HEPES *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HPLC high-performance (high-pressure) liquid chromatography
ICU international chick units
Ig immunoglobulin
IL interleukin
i.m. intramuscular
in. inch
i.p. intraperitoneal
IU international units
i.v. intravenous
kcal kilocalorie
L liter (also capitalized with any combination, e.g., mL)
lb pound
L:D hours of light:hours of darkness in a photoperiod
LSD least significant difference
m meter
μ micro
M molar
ME metabolizable energy
ME_N nitrogen-corrected metabolizable energy
MHC major histocompatibility complex
mRNA messenger ribonucleic acid
min minute
mo month
MS mean squares
n number of observations
N normal
NAD nicotinamide adenine dinucleotide
NADH reduced form of NAD
NDF neutral detergent fiber
NRC National Research Council
NS not significant
PBS phosphate-buffered saline
PCR polymerase chain reaction
ppm parts per million
r correlation coefficient
r² coefficient of determination, simple

R2 coefficient of determination, multiple
 RH relative humidity
 RIA radioimmunoassay
 JAPR: Instructions to Authors 11
 RNA ribonucleic acid
 rpm revolutions per minute
 s second
 SAS Statistical Analysis System
 s.c. subcutaneous
 SD standard deviation
 SE standard error
 SEM standard error of the mean
 SNP single nucleotide polymorphism
 SRBC sheep red blood cells
 TBA thiobarbituric acid
 T cell thymic-derived cell
 TME true metabolizable energy
 TME_n nitrogen-corrected true metabolizable energy
 TSAA total sulfur amino acids
 USDA United States Department of Agriculture
 UV ultraviolet
 vol/vol volume to volume
 vs. versus
 wt/vol weight to volume
 wt/wt weight to weight
 wk week
 yr year

SNP Nomenclature

The increasing number of SNP association studies and the improvements in chicken genome annotation require a standardized SNP nomenclature for unequivocal and correct SNP identification. Additionally, information regarding the SNP investigated should be easily accessible in a publicly available database. Therefore, all relevant SNP included in a study should be listed with their unique RefSNP (rs) or submitted SNP (ss) number (if rs number is not yet available) as indicated in the public domain NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). If the SNP investigated do not yet have an entry in the NCBI dbSNP database, the authors of the manuscript are responsible for submitting all the required information to NCBI (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) for depositing the SNP into this database and obtaining a unique ss number for the SNP. In the text of the manuscript, use of the rs/ss number of the SNP or an alternative standardized nomenclature is recommended.

Supplemental Information (Online)

The following information is available online and is updated regularly. Please refer to these pages when preparing a manuscript for submission.

Journal Title Abbreviations. A list of standard abbreviations for common journal titles is available online (http://www.oxfordjournals.org/our_journals/japr/for_authors/index.html).

SI Units. The following site (National Institute of Standards and Technology) provides a comprehensive guide to SI units and usage: <http://physics.nist.gov/Pubs/SP811/contents.html>

ScholarOne Manuscripts Instructions. Manuscripts are submitted online (<http://mc.manuscriptcentral.com/psa>). Full user instructions for using the Manuscript Central system are available online; click the “Get Help Now” link on the top right of the main page (<http://mc.manuscriptcentral.com/psa>).

VITA

Giovani Farina, filho de Arduino Antonio Farina e de Maria Lourdes Carpenedo Farina, nasceu no dia 19 de abril de 1989, em Nova Prata, RS. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual de Ensino Médio Onze de Agosto, em Nova Prata, e o Ensino Médio no Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, RS (CEFET-BG), concomitantemente ao curso Técnico em Agropecuária com Habilitação em Zootecnia (conclusão em 2006). Graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Santa Maria, RS, em 2011. Durante o início da graduação, atuou na área de produção e nutrição de ovinos, passando posteriormente para o Laboratório de Avicultura, onde permaneceu a maior parte do tempo, até sua formação. Nesse local, foi monitor da disciplina de Avicultura e bolsista de iniciação científica do CNPq, participando em vários projetos de extensão e pesquisa, assim como eventos na área.

Em março de 2012, iniciou seu Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de concentração “Nutrição de Não-Ruminantes”.