

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

**EFEITO DE FONTES DIETÉTICAS DE FERRO SOBRE O DESEMPENHO DE  
REPRODUTORAS PESADAS E CONTEÚDO DE FERRO NO OVO**

FRANCIELE BESS  
Médica Veterinária/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção  
do Grau de Mestre em Zootecnia  
Área de Concentração Nutrição Animal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Bess, Franciele

Efeitos de fontes dietéticas de ferro sobre o desempenho de reprodutoras pesadas e conteúdo de ferro no ovo / Franciele Bess. -- 2012.

93 f.

Orientador: Sergio Vieira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Ferro. 2. Farinha de carne ossos. 3. Minerais orgânicos. 4. Ovo. 5. Matrizes pesadas. I. Vieira, Sergio, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FRANCIELE BESS  
Medica Veterinária

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### MESTRE EM ZOOTECNIA

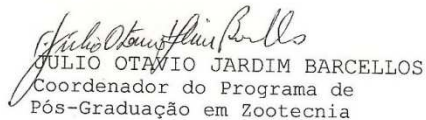
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 28.02.2012  
Pela Banca Examinadora

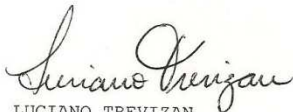


SERGIO LUIZ VIEIRA  
PPG ZOOTECNIA/UFRGS  
Orientador

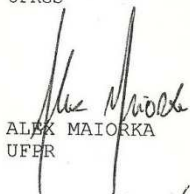
Homologado em: 25.04.2012  
Por



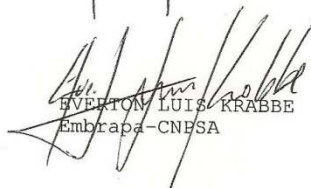
JULIO OTAVIO JARDIM BARCELLOS  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia



LUCIANO TREVIZAN  
UFRGS



ALEX MAIORKA  
UFRR



EVERTON LUIS KRABBE  
Embrapa-CNPSA



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que durante esses anos sempre esteve comigo e me guiou para que eu chegasse até aqui. Agradeço muito a minha família, meu pai Deoclécio Bess, minha mãe Eleuza Scatolin Bess, minha irmã Grasielle Bess, meu irmão Erike Daniel Bess e meu namorado Mateus Otto que sempre esteve ao meu lado me apoiando. Saibam que o amor e orgulho que sinto desta família é incondicional, obrigada pelo apoio, confiança e força de todos esses anos.

Tenho muito a agradecer ao meu orientador, prof. Sérgio Luiz Vieira, que através das cobranças, conselhos e desafios ao longo desses dois anos, me proporcionou crescimento, tanto pessoal quanto profissional. É uma honra levar o título de mestre e juntamente sua amizade.

Gostaria de agradecer também aos meus colegas André, Diogo, Rafael, Minero, Daniel, Jaime, Natacha, Fúlvio, Henrique, Tiago, Samanta e Rafael Cruz. A convivência com vocês foi muito importante para mim, obrigada pela ajuda, paciência e amizade.

Agradeço também ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRGS pela oportunidade e à empresa Zinpro pela parceria.

## **EFEITOS DE FONTES DIETÉTICAS DE FERRO SOBRE O DESEMPENHO DE REPRODUTORAS PESADAS E CONTEÚDO DE FERRO NO OVO <sup>1</sup>**

Autora: Franciele Bess

Orientador: Sergio Luiz Vieira

### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi comparar dietas com ou sem adição de farinha de carne e ossos e diferentes fontes de suplementação de ferro (Fe) em dietas para matrizes de corte. Sessenta matrizes de corte Cobb, 22 semanas de idade, foram alojadas individualmente em gaiolas e alimentadas com uma dieta (15,6% PB, 2.840 kcal EM /kg, 3,2% Ca, 0,45% de fósforo disponível) sem suplementação de Fe por 84 dias. As aves foram aleatoriamente divididas em 6 tratamentos em um fatorial de 2 dietas (Vegetal e Animal) e 3 fontes de Fe (Sem, Inorgânico e Complexado). As dietas tiveram mesmo perfil nutricional com exceção do Fe. A dieta Vegetal foi formulada com milho, farelo de trigo e farelo de soja, enquanto que a dieta Animal teve a inclusão de 2,5% de farinha de carne e osso. A dieta Sem não foi suplementada com Fe, enquanto que as dietas Inorgânico e Complexado tiveram 60 mg/kg de Fe suplementados através de sulfato ferroso ou Fe-amino ácido:12% de Fe com vários aminoácidos (Fe-AA), respectivamente. As dietas foram fornecidas por 3 períodos de 4 semanas cada e os ovos foram coletados diariamente para avaliação da produção. Foram pesados os ovos dos 3 últimos dias de cada período, sendo então a gema e albúmen separados e congelados para posterior análise do conteúdo de Fe por espectrometria de absorção atômica. Os dados foram analisados usando Anova com medidas repetidas no tempo. O conteúdo Fe na gema aumentou com o tempo em todos os tratamentos, exceto para a dieta Vegetal sem suplementação de Fe ( $P < 0,01$ ). A concentração média de Fe na gema foi maior para a dieta Animal suplementada com Fe-AA, o menor para a dieta Vegetal não suplementada com Fe, e sem diferenças entre os outros quatro tratamentos. A produção de ovos foi reduzida nas aves que não receberam nenhum tipo de suplementação de Fe comparada as que receberam ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, a produção de ovos foi afetada quando as aves não receberam suplementação de Fe e a suplementação de Fe pode afetar o conteúdo na gema e albúmen, dependendo da presença de fontes de proteína animal na dieta.

Palavras chave: ferro, farinha de carne e ossos, minerais quelatados, ovo, matrizes pesadas

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Nutrição Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93p.) Fevereiro, 2012.

## DIETARY EFFECTS OF IRON SOURCES ON BROILER BREEDERS PERFORMANCE AND EGG IRON CONTENTS <sup>1</sup>

Author: Franciele Bess

Adviser: Sergio Luiz Vieira

### ABSTRACT

The objective of this study was to compare diets with or without meat and bone meal by-product and different Fe supplementation in broiler breeder diets. Sixty Cobb 500 females, 22 wks of age, were placed individually in cages and fed a typical breeder diet (15.6% CP, 2,840 kcal ME/kg, 3.2% Ca, 0.45% Av P) without Fe supplementation for 84 d. Starting on the 85<sup>th</sup> d birds were randomly allocated to 6 dietary treatments in a factorial of 2 diets (Vegetal and Animal) and 3 Fe sources (None, Inorganic and Complexed). Diets had similar nutrient profile with the exception of Fe. Vegetable diet was formulated with corn, wheat bran and soybean meal, whereas the Animal diet had the inclusion of 2.5% meat and bone meal. The None diet was not supplemented with Fe, whereas 60 mg/kg of Fe was supplemented in the Inorganic (Fe (II) sulfate) or in the Complexed (Fe-amino acid: 12% Fe, with varying percentages of AA). Diets were provided for 3 periods of 4 wks and eggs were collected daily. In the last three days of each week, eggs were weighed, and yolk and albumen were separated. Egg composites were frozen for further analysis of Fe content using atomic absorption spectrometry. Resulting data were analyzed using a two-way Anova with repeated measures. Yolk Fe contents increased with time in all treatments, except for the Vegetable diet without Fe supplementation ( $P < 0.01$ ). Average Fe concentration in yolk was the highest for the Animal diet supplemented with Fe-AA, lowest for the Vegetable diet not supplemented with Fe, and without differences between the other four treatments. Egg production was reduced for birds fed both diets without Fe supplementation when compared to those with any type of Fe supplementation ( $P < 0.05$ ). It is concluded that breeder hens have reduced hen day egg production when not supplemented with Fe and that Fe supplementation can affect yolk and albumen contents depending on the presence of animal protein sources in the diet.

Key-words: iron, meat and bone meal, chelated mineral, egg, broiler breeders

---

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Animal Science – Animal Nutrition, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93p.) February, 2012.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	1
1.1 INTRODUÇÃO .....	2
1.2. REVISÃO DA LITERATURA .....	4
1.2.1. Funções fisiológicas do Fe.....	4
1.2.2. Absorção e transporte do Fe.....	7
1.2.3. Armazenamento e excreção do Fe .....	10
1.2.4. A Fosvitina .....	11
1.2.5. Biodisponibilidade do Fe .....	13
1.2.6. Fatores que afetam a absorção do Fe .....	15
1.2.7. Minerais orgânicos.....	16
1.2.8. Deficiência de Fe .....	19
1.2.9. Uso da farinha de carne e ossos em reprodutoras .....	23
1.3. HIPÓTESES .....	25
1.4. OBJETIVOS .....	25
CAPÍTULO II .....	26
Effects of dietary iron sources on broiler breeders performance and egg composition .....	27
Abstract .....	28
1. Introduction.....	29
2. Materials and methods .....	31
2.1 <i>General broiler husbandry</i> .....	31
2.2 <i>Dietary treatments</i> .....	32
2.3 <i>Measurements</i> .....	34
2.4 <i>Statistical analyses</i> .....	34
3. Results.....	35
4. Discussion .....	40
5. Conclusion.....	42
References .....	43
CAPÍTULO III .....	47
3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
3.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
APÊNDICES .....	55

## RELAÇÃO DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Recomendações diárias de ingestão de Fe. ....	20
---	----

### CAPÍTULO II

Table 1. Ingredient and chemical composition of the basal diet. ....	33
Table 2. Blood parameters prior to the beginning of the treatments. ....	35
Table 3. Calculated and analyzed Fe concentration in the experimental feeds. ....	36
Table 4. Hen day egg production. ....	37
Table 5. Egg yolk Fe concentrations. ....	38
Table 6. Egg albumen Fe concentrations. ....	39



## RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura do grupo heme (Fe-protoporfirina IX).....	6
Figura 2. O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do Fe .....	8
Figura 3. Mecanismo de ligação da fosvitina da gema do ovo com o Fe.....	16

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

Apêndice 1. Normas para publicação de artigos no periódico Animal Feed Science and Technology .....	56
Apêndice 2. Conteúdo de ferro na gema por período, mg/kg .....	80
Apêndice 3. Conteúdo de ferro na clara por período, mg/kg.....	81
Apêndice 4. Produção de ovos por período, %.....	82
Apêndice 5. Gravidade específica dos ovos por período .....	84
Apêndice 6. Peso dos ovos por período,g .....	86
Apêndice 7. Análise de variância da gravidade específica .....	87
Apêndice 8. Análise de variância do peso dos ovos .....	88
Apêndice 9. Análise de variância da produção de ovos.....	88
Apêndice 10. Análise de variância do conteúdo de ferro na gema .....	88
Apêndice 11. Análise de variância do conteúdo de ferro na clara .....	89
Apêndice 12. Parâmetros sanguíneos antes do início dos tratamentos.....	89
Apêndice 13. Valores das concentrações de ferro analisados nos ingredientes e na água.....	90

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina
Dcytb	Redutase citocromo b duodenal
DMT1	Proteína transportadora de metal divalente
Fe-AA	Fe - aminoácido
Fe	Ferro
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico
Fe <sup>2+</sup>	Íon ferroso
FCO	Farinha de carne e ossos
HCP1	Proteína transportadora do heme
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
SEM	Erro padrão da média
STfR	Receptores solúveis de transferrina
TIBC	Capacidade de ligação do soro
TSE	Encefalopatia espongiforme transmissível

## **CAPÍTULO I**

## 1.1. INTRODUÇÃO

O Fe é um mineral essencial a vários processos metabólicos nos animais, sendo especialmente exigido no transporte de oxigênio e nas reações de oxiredução. O Fe dietético pode ser dividido em heme e não heme. O Fe heme está presente na dieta somente quando subprodutos de origem animal são incluídos na formulação, enquanto que o Fe não heme está presente nos alimentos de origem vegetal.

A biodisponibilidade do Fe para os animais depende de vários fatores, dentre os quais, seu estado de valência que pode ser alterado com o pH do meio, por exemplo, o ácido ascórbico que age como redutor aumentando a biodisponibilidade deste mineral. Por outro lado, existem outros fatores que tornam o ferro menos disponível com a formação de complexos insolúveis como, por exemplo, o ácido fítico em alimentos de origem vegetal.

A suplementação de Fe na avicultura é feita usualmente através de fontes de baixo custo, como o sulfato ferroso ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ ). Apesar das fontes minerais de Ca e P como os calcários e os fosfatos serem ricas em Fe, a forma predominante nestes alimentos é a férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), o que torna o ferro menos disponível.

Pesquisas com Fe em matrizes de corte são escassas. A importância deste mineral vem sendo negligenciada em função de sua

abundância na natureza e seu baixo custo na suplementação. Entretanto, além das fontes naturais deste mineral possuírem baixa disponibilidade para aves, a produção de ovos aumenta consistentemente devido à seleção genética e, portanto, é esperado um aumento de demanda deste nutriente de forma a possibilitar a expressão das características produtivas consideradas nos programas de melhoramento animal: produção, composição do ovo e desenvolvimento embrionário podem ser beneficiados por fontes mais disponíveis de Fe.

O uso de subprodutos de origem animal em reprodutoras está se tornando mais popular devido à melhora na qualidade microbiológica e processamento dos mesmos. Essa prática tem como finalidade reduzir custos na formulação, principalmente com relação à proteína, Ca e P, porém pode afetar diretamente a disponibilidade de Fe para as aves em função da forma heme presente neste ingrediente.

Outra forma disponível de mineral é a forma complexada. Os minerais quelatados são mais solúveis e seu uso tem sido incorporado na nutrição animal. Além disso, estas fontes minerais são bioquimicamente mais estáveis e protegidas contra reações e competição com outros componentes da dieta que podem reduzir sua absorção. Vários estudos vêm demonstrando benefícios dos quelatos metal aminoácido no metabolismo animal. O objetivo deste estudo foi comparar dietas com ou sem subprodutos de origem animal (farinha de carne e ossos) e a suplementação de ferro com sulfato ferroso ou com Fe - aminoácido (Fe - AA) sobre os parâmetros peso de ovos, produção e conteúdo de Fe no ovo.

## **1.2. REVISÃO DA LITERATURA**

A função do Fe na composição sanguínea tornou-se evidente durante século dezessete, quando foi demonstrado que sais de Fe forneciam resposta positiva no tratamento de mulheres jovens com anemia ferropriva. O mecanismo envolvido não estava bem compreendido até que Zinoffsky em 1866 descobriu que os cristais de hemoglobina (Hb) em eqüinos continham 0,335% de Fe (Underwood, 1977). Embora o homem já soubesse dos benefícios da ingestão de alimentos ricos em Fe, foi somente em 1872, que Boussingault, reconheceu este mineral como um nutriente vital para os animais (Anderson, 1999).

### **1.2.1. Funções fisiológicas do Fe**

O mineral Fe está presente em muitas enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons (citocromos), pela ativação do oxigênio (oxidases e oxigenases) e pelo transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina). O sistema citocromo consiste em uma série de reações nas quais oxidações ocorrem com a produção de adenosina trifosfato (ATP) e formação de água. O Fe participa de atividades como oxidação, redução e transporte de elétrons, ativando sítios de enzimas óxido redutoras e proteínas ligadas ao oxigênio (Williams et al., 1976).

Este mineral existe no organismo animal basicamente em formas complexas ligado a proteínas (transferrina e ferritina), hemo componentes (hemoglobina ou mioglobina), hemo enzimas (citocromo mitocondrial e microsomal) além de outras enzimas como catalase e peroxidase (McDowell, 1992). Quando na forma de hemoglobina representa aproximadamente 60% do total corporal, enquanto que a mioglobina representa apenas 3 a 7% do total de ferro corporal em mamíferos (Hambidge et al., 1986).

O peso molecular da hemoglobina é 68.000 kDa e cada molécula contém quatro átomos de Fe. A hemoglobina é um tetrâmero composto por quatro globinas contendo um radical heme ligado fracamente por ligação não covalente ao Fe. O grupo heme (Figura 1) é composto por um anel orgânico heterocíclico, chamado porfirina ou protoporfirina com um átomo de Fe no centro, sendo que o Fe se encontra na forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ). As porfirinas são uma classe de moléculas orgânicas, que possuem estrutura de um macrociclo tetrapirrólico, formado por quatro anéis pirrol, ligados por pontes metínicas, com um espaço, em seu centro, apropriado para acomodar um íon metálico (Jorge, 2006).

A hemoglobina atua ligando-se ao oxigênio, sendo também chamada nesta forma de oxihemoglobina, depois, libera este oxigênio para os tecidos, ligando-se então ao dióxido de carbono (carboxihemoglobina) nos vasos venosos, que por sua vez, libera este dióxido de carbono nos pulmões, trocando-o uma vez mais por oxigênio (Bothwell et al., 1979). A hemoglobina está nos eritrócitos e é responsável por 90% do total protéico destas células (Davis et al., 1987).



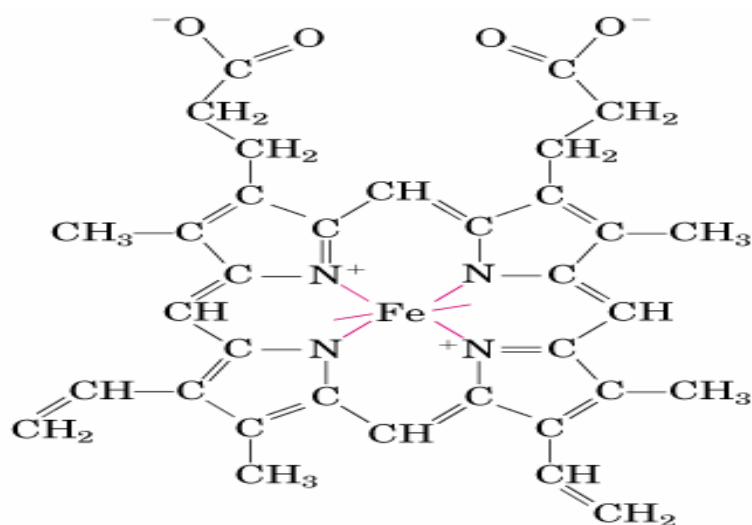


Figura 1. Representação da estrutura do grupo heme (Fe-protoporfirina IX) (Adaptado de Nelson & Cox, 2004).

A mioglobina é uma proteína (ferro porfirina) contendo um átomo de Fe por molécula, com peso molecular de 17.000 kDa. Está presente nas células musculares e possui maior afinidade por oxigênio que a hemoglobina, facilitando a transferência do oxigênio da oxihemoglobina para os sítios de oxidação nas células musculares (Fruton & Simmonds, 1958).

As enzimas contendo Fe incluem catalases, citocromo A, B e C, verdoperoxidase presentes nos leucócitos, succinato desidrogenase, nicotinamida-adenina dinucleotídeo, coenzima NADH reduzida, redutases e fosfatase (Conrad et al., 1980). O Fe possui também importante função no ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs), uma vez que as 24 enzimas deste ciclo contêm Fe nos seus centros de atividades ou o possuem como um co-fator essencial. Assim, este elemento é vital para o metabolismo energético, celular e corporal como um todo, estando também diretamente relacionado com a formação de melanina (McDowell, 1992).

### 1.2.2. Absorção e transporte do Fe

A absorção de Fe é afetada por diversos fatores como idade, status de Fe orgânico, estado de saúde do animal, condições de integridade da saúde intestinal; quantidade e forma química do Fe ingerido além quantidade e proporcionalidade dos outros componentes da dieta ingerida (Morris, 1987).

A absorção de Fe ocorre através do trato gastrintestinal, mais especificamente no duodeno e jejuno. Hahn et al. (1943) propôs uma teoria sobre absorção, denominada “Teoria do bloqueio de mucosa” que sustentava que apenas a quantidade necessária de Fe para suprir a necessidade animal era absorvida e quando a necessidade animal estava adequada, determinada basicamente pelo estatus sérico de Fe e pela demanda eritropoiética, uma maior absorção era rejeitada pelo próprio organismo. Esta teoria evoluiu com Conrad & Crosby (1963) que além dos fatores acima concluíram que a própria concentração de Fe na mucosa epitelial das células duodenais seria um fator regulador na absorção. Murray & Stein (1970) demonstraram que o Fe pode ser absorvido pelas células da mucosa epitelial duodenal na forma de íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), em quantidades muito menores na forma de íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou como parte de um componente orgânico.

A absorção de Fe na forma inorgânica é altamente influenciável pelo pH gástrico ou pela composição dos alimentos. O pH ácido promove a conversão do  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  aumentando sua absorção (Tako & Glahn, 2011). Existe um mecanismo ainda não completamente elucidado para a absorção do ferro trivalente  $\text{Fe}^{3+}$  através da paraferitina, um complexo de 520 kDa, que participa da captação do ferro mediada pela mucina no lúmen intestinal, porém

a absorção nesta forma acontece em quantidades praticamente insignificantes (Conrad et al., 2000).

A Figura 2 ilustra uma célula intestinal e a localização das proteínas envolvidas no processo de absorção. Apesar do  $\text{Fe}^{2+}$  ser mais disponível, a maior parte do ferro inorgânico está presente na forma  $\text{Fe}^{3+}$ . O ferro  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido pela redutase citocromo b duodenal (Dcytb) a  $\text{Fe}^{2+}$  e então internalizado via proteína transportadora de metal divalente (DMT1) (Fleming, 2005). O DMT1, além do Fe, transporta  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  e o fato do DMT1 não ser um transportador específico de íons ferro pode explicar a interação entre cátions bivalentes durante o processo de absorção (Flanagan et al., 1980).

O mecanismo de absorção do Fe heme, proveniente da hemoglobina e mioglobina difere daquele do Fe não heme. A internalização do Fe heme da dieta é feita pela proteína transportadora do heme (HCP1), posicionada na membrana apical das células do duodeno. O heme liga-se à membrana da borda em escova dos enterócitos duodenais e a proteína transportadora (50-kDa) transmembrana atravessa intacta a membrana plasmática, importando o heme extracelular. A seguir o heme apresenta-se ligado à membrana de vesículas no citoplasma da célula (Grotto, 2008). No interior da célula, o Fe é liberado da protoporfirina pela heme oxigenase. Após sua liberação, o Fe passa a fazer parte do mesmo grupo de Fe não heme, sendo armazenado na forma de ferritina ou liberado do enterócito para o sangue (Miret et al., 2003).

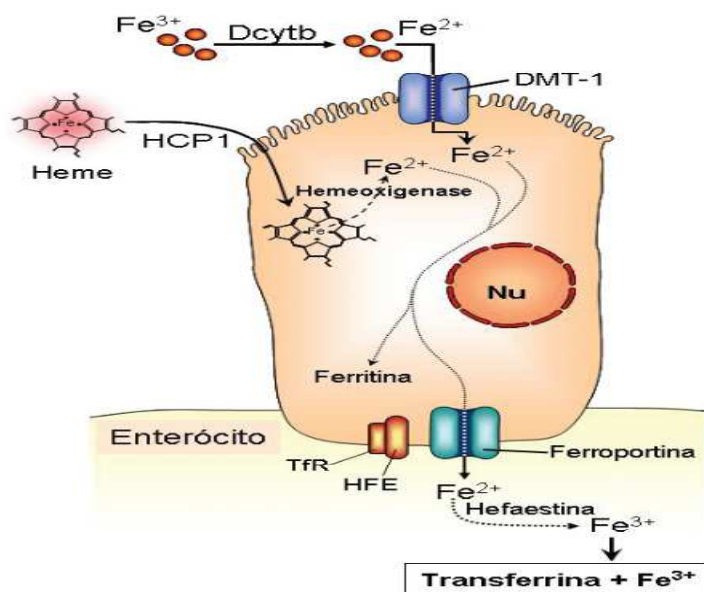


Figura 2. O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do Fe. Dcytb: ferroredutase; DMT1: transportador de metal divalente; HCP-1: proteína transportadora do heme; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina (Grotto, 2008).

O ferro dietético, absorvido pelas células da mucosa intestinal, tem dois destinos básicos: ser incorporado pela ferritina presente nas próprias células da mucosa e ser transportado através da célula intestinal e excretado por um transportador na membrana basolateral, a ferroportina, ligando-se depois à transferrina sérica (beta-globulina). A transferrina se liga a 2 átomos de  $\text{Fe}^{3+}$ , e é então catalisada por uma ferroxidase que, no sangue, existe sob a forma de uma ou mais proteínas (ceruloplasmina, ferroxidase I e ferroxidase II). A transferrina libera, para o metabolismo, somente um dos dois átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  que, então, se reduz a  $\text{Fe}^{2+}$  para as reações de formação de mioglobina (no músculo), hemoglobina, enzimas de heme e para excreção na bile (Bacila, 2003).

A transferrina é sintetizada principalmente no fígado e apenas 2% do ferro corporal está ligado a esta proteína que se torna um elemento crucial no

ciclo do Fe. Através dela, é que o Fe chega aos precursores eritróides da medula óssea, que possuem grande quantidade de receptores de transferrina em sua membrana (Punnonen et al., 1997)

O Fe absorvido pelas células da mucosa intestinal só será repassado para a transferrina (e daí para todo o organismo) se as necessidades corpóreas deste metal assim determinarem. Caso contrário, ele permanece no interior destas células mucosas, sem ser de fato absorvido, e o processo normal de descamação e renovação celular se encarrega de eliminá-lo (Cook, 1982).

Animais deficientes em Fe absorvem este elemento ingerido com mais facilidade. Para responder a essa maior demanda, há uma maior expressão das proteínas envolvidas no processo de absorção de ferro, como a proteína transportadora de metal divalente (DMT1) e a proteína transportadora do heme (HCP1) (Conrad & Crosby, 1963).

### **1.2.3. Armazenamento e excreção do Fe**

O Fe fica estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina e hemossiderina. A concentração de ferritina nos tecidos, juntamente com a hemosiderina, reflete o status de Fe no organismo animal. Ferritina é uma proteína não heme (globulina) que contém no mínimo 20% de Fe, presente em todos os tecidos corporais, especialmente no fígado. Existe uma alta correlação positiva entre a concentração sérica de ferritina humana e o conteúdo de Fe corporal (Walters et al., 1973). A ferritina medida no plasma na verdade, é a apoferritina (molécula sem Fe), contudo “ferritina sérica” é o termo mais usado. A apoferritina é sintetizada pelo fígado e

possui uma estrutura geométrica esférica, delimitando uma região central capaz de armazenar várias moléculas de Fe. Quando ligada ao Fe ganha o nome de ferritina. Essa proteína é a principal estrutura responsável pelo armazenamento de Fe no organismo e possui a capacidade de mobilizar rapidamente grandes quantidades do metal quando necessário (Theil, 2004).

A hemossiderina é um derivado da ferritina após proteólise por enzimas lisossomais. Funciona também como uma proteína armazenadora de Fe, porém de liberação muito lenta.

O Fe absorvido é retido e mantido corporalmente com grande tenacidade e não é facilmente eliminado do organismo, exceto em casos como hemorragias severas. O Fe que é liberado da hemoglobina durante a quebra dos eritrócitos no processo de hemocaterese (renovação das hemácias) é carregado até o fígado, e é secretado na bile. A maior parte do Fe da bile é reabsorvida e reutilizada para formação de nova hemoglobina.

Embora a excreção seja muito baixa, as quantidades perdidas são de importância nutricional para animais em produção. O Fe excedente é excretado via fezes, como um subproduto do metabolismo da mucosa celular intestinal (Harmon et al., 1974).

#### **1.2.4. A Fosvitina**

A fosvitina é uma proteína que se encontra na gema do ovo com a função de carrear o Fe. Segundo Jiang & Mine (2000) 95% do Fe presente na gema está ligado a fosvitina, numa conformação muito estável. A fosvitina é produzida no fígado de reprodutoras na forma de vitelogenina, sendo então transportada via sanguínea ao ovário onde é internalizada e fragmentada em

duas proteínas vitelínicas a fosvitina e a lipovitelina. A produção das mesmas é estimulada pela secreção de estrógenos ocorre devido à secreção de estrógenos ovarianos da fêmea em postura (Wallace & Selman, 1981; Matsubara & Sawano, 1995).

A fosvitina é uma das principais fosfoproteínas com uma massa molecular de 35 kDa, contendo aproximadamente 10% de P e 6,5% de carboidratos. O nome proposto “fosvitina” indica seu elevado conteúdo de P na gema de ovos de galinha (Jiang & Mine, 2000). Mais da metade dos aminoácidos componentes da fosvitina são serinas, as quais estão, em sua maioria, associadas aos ésteres fosfatos. (Schirm & Gruber, 1973).

A mistura de fosvitina e  $\text{Fe}^{2+}$  causa a auto-oxidação deste em  $\text{Fe}^{3+}$  formando complexos estáveis fosvitina- $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 3), resistentes a modificações no pH, tratamentos de alta pressão e temperatura em autoclave (Ishikawa et al., 2004). A interação fosvitina-Fe ocorre em pH ótimo de 5,7 a 7, isto é, nesta faixa de pH, maior quantidade de  $\text{Fe}^{2+}$  é auto-oxidada a  $\text{Fe}^{3+}$  na presença de fosvitina. O pH da gema do ovo encontra-se dentro desta faixa tornando-se então uma reserva estável de Fe.

Na fosvitina isolada, encontram-se 2 a 3 átomos de Fe por molécula e na gema do ovo, 95% do ferro está ligado a fosvitina (Ishikawa et al., 2004). A relação entre serina e Fe na fosvitina é de 2:1 (Byrne et al., 1984). Cada molécula de fosvitina possui aproximadamente 135 resíduos de fosfoserina indicando que cada molécula de fosvitina é capaz de quelar de 60 a 70 íons de Fe (Taborsky, 1980).

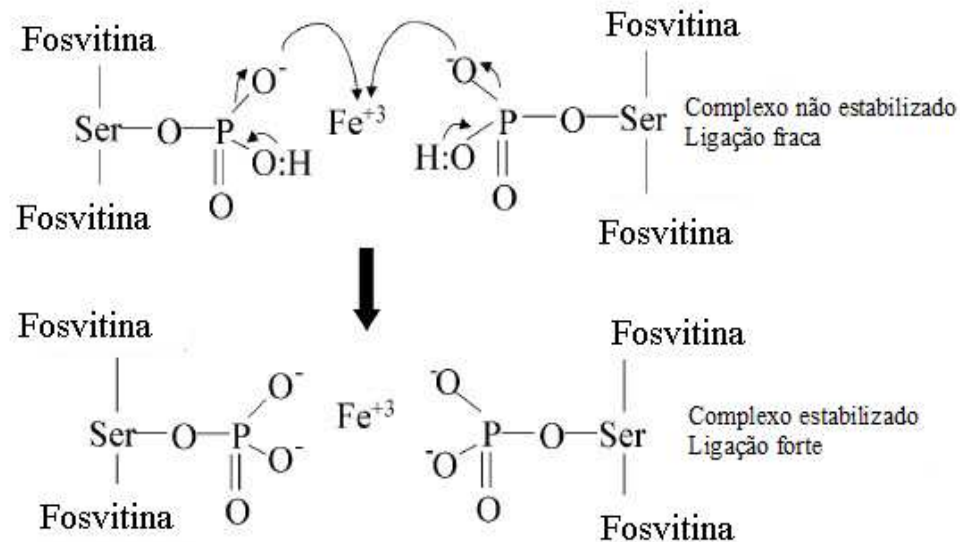


Figura 3. Mecanismo de ligação da fosvitina da gema do ovo com o Fe (Anton et al., 2007).

### 1.2.5. Biodisponibilidade do Fe

Pesquisas sobre a biodisponibilidade do Fe em matérias primas utilizadas na alimentação dos animais domésticos são limitadas devido ao fato de que a anemia é de pouca significância em espécies animais de relevância econômica e alimentar com exceção dos suínos.

Dietas para reprodutoras geralmente são suplementadas com Fe como parte do premix mineral. Nestas dietas o Fe dietético pode ser dividido em heme e não heme. O Fe heme está presente na dieta somente quando produtos de origem animal são utilizados na formulação, enquanto que o Fe originado de ingredientes vegetais bem como pequena parte do Fe presente em subprodutos de origem animal é composto por moléculas não heme (Theil, 2004).



A concentração de Fe no ovo varia de acordo com a sua forma química e sua concentração na dieta (Naber, 1979). Por outro lado, a concentração nas plantas varia conforme a bioquímica do solo (Lindsay, 1982).

A biodisponibilidade de Fe para os animais é variável, dependendo do estado oxidativo do Fe. O Fe não heme é liberado pela digestão ácida no estômago e deve ser reduzido a íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) antes da absorção por parte dos enterócitos duodenais (Tako & Glahn, 2011). Compostos como o ácido ascórbico, citratos e aminoácidos podem reduzir íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) no lúmen intestinal e, portanto, aumentar a sua biodisponibilidade (Monsen, 1988). O Fe heme é mais disponível para os animais em geral (Henry & Miller, 1995). Em ingredientes de origem vegetal, o fitato se liga permanentemente a quantidades importantes de Fe e, portanto, dificulta a disponibilidade de Fe quando comparado com Fe heme (Davies & Nightingale, 1975).

Outras fontes alimentares contém Fe. Altas concentrações de Fe estão presentes em fontes comuns de Ca e P, tais como, calcário, fosfato de rocha e fosfato bicálcico (NRC, 1994). No entanto, o Fe nestes compostos é altamente indisponível, uma vez que a maior parte está presente no estado férrico (Appel et al., 2001).

Fontes comuns de Fe utilizadas para suplementar dietas para aves e suínos no Brasil são o carbonato de ferro ( $\text{FeCO}_3$ ), sulfato ferroso mono hidratado ( $\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) e o sulfato ferroso hepta hidratado ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), contendo respectivamente 43%, 30% e 20% de ferro. As recomendações atuais de suplementação de Fe para matrizes de corte variam de 40 a 70 mg/kg (Aviagen, 2007; Leeson & Summers, 1997; Cobb-Vantress, 2010).

### **1.2.6. Fatores que afetam a absorção do Fe**

Vários elementos nutritivos e não nutritivos existentes na dieta têm demonstrado efeito na absorção de Fe, e por consequência, na sua biodisponibilidade. Enquanto que ácido ascórbico, ácido fólico, citratos, cisteína e histidina auxiliam na redução do Fe de sua forma férrica para seu estado ferroso, da mesma maneira, meios ácidos proporcionam melhor absorção deste mineral (Garcia et al., 2005). Por outro lado, altos níveis de cobre, manganês, zinco e cádmio aumentam a necessidade de Fe, por competirem entre si pelos mesmos sítios de absorção na mucosa intestinal (Berguer et al., 2005; Miller et al., 2006). Estão bem documentados os antagonismos durante a absorção dos íons Fe e Ca, Fe e Zn, Ca e Zn, Cu e Zn, Mg e Ca, Mn e Zn nas vesículas das membranas das células epiteliais do intestino delgado (Bertolo et al., 2001). Waddel & Sell (1964) demonstraram que houve um decréscimo na absorção de Fe em aves, quando a dieta teve os níveis de cálcio, fósforo ou ambos, aumentados. O fósforo fítico tem sido descrito como um mineral que afeta a absorção de Fe através da formação de moléculas insolúveis de fosfato férrico e fitato (Underwood, 1981). Quanto ao efeito antagônico na utilização de Fe e Zn quando administrado em doses elevadas, Settlemire & Matrone (1967), concluíram que o Zn impacta negativamente a absorção de Fe através de dois modos de ação: impactando negativamente a incorporação de Fe sob a forma de ferritina, e diminuindo o tempo de vida das células sanguíneas vermelhas, levando a um aumento da necessidade orgânica do mesmo (Baker & Halpin., 1991). Efeitos similares foram descritos recentemente por Fischer et al. (2005) estudando a suplementação conjunta de Fe e Zn.

Por outro lado, alguns nutrientes têm se mostrado efetivos na melhoria da absorção do Fe. Van Campen & Gross (1969) sugeriram que o uso de aminoácidos, como histidina, beneficia positivamente a absorção de Fe, através da formação de quelatos solúveis. Fontes mais biodisponíveis de minerais, obtidos através da adoção de novas tecnologias de ligação, melhoram a sua absorção e de outros minerais, comparativamente ao tradicional fornecimento de fontes inorgânicas de minerais na forma de seus sais. Nos últimos anos, tem ocorrido considerável aumento no interesse pelo uso de quelatos ou minerais complexados em dietas para aves.

#### **1.2.7. Minerais orgânicos**

Os minerais orgânicos são definidos por Leeson & Summers (1997) como sendo uma mistura de elementos minerais que são ligados a algum tipo de carreador o qual pode ser um aminoácido ou polissacarídeo que possuem a capacidade de ligar-se ao metal por ligações covalentes através de grupamentos amino ou oxigênio, formando assim uma estrutura cíclica.

Segundo Kratzer & Vohra, 1986, o quelato é um complexo metálico onde o metal apresenta mais ligações do que sua valência, e este é ligado a um ligante doador. O complexo possui um átomo mineral no centro da molécula e um ligante ao seu redor. Quando o ligante possui mais de um átomo doador o complexo se torna um anel heterocíclico que é o anel quelato.

Para ser classificado como um agente quelante, o composto orgânico deve conter um mínimo de dois grupos funcionais (oxigênio, nitrogênio, amino ou hidroxil), sendo que cada um destes deve possuir a capacidade de doar seu par de elétrons para ser combinado com o íon metálico

via ligação covalente, e o ligante possa então formar uma estrutura de anel heterocíclico com um íon metálico (Kratzer & Vohra, 1986). Esses minerais normalmente possuem preços mais elevados que os minerais inorgânicos, mas espera-se que ocorra melhora no desempenho, na absorção, ou utilização de alguma maneira quando comparados com os minerais inorgânicos (Vieira, 2008).

Kratzer e Vohra (1986) afirmam que o mecanismo pelo qual o agente quelante melhora a utilização do mineral depende da capacidade do ligante seqüestrar o mineral ou a sua maior habilidade em competir com outros ligantes no trato gastrointestinal formando complexos solúveis com o mineral. A absorção pode ocorrer de duas formas: o mineral pode ser ligado à mucosa sendo absorvido pela célula epitelial ou como ocorre na maioria das vezes o agente quelante é absorvido levando junto a si o metal ligado.

A Association of American Feed Control Officials - AAFCO (1997) define os compostos minerais ligados a moléculas orgânicas fazendo parte de 5 categorias:

Quelato metal aminoácido – produto resultante da reação de um sal metálico solúvel com aminoácidos a uma taxa molar de 1:1 até 1:3. O peso molecular médio do aminoácido hidrolisado deve ser aproximadamente 150 e o peso molecular resultante não pode exceder 800.

Complexo metal aminoácido – produto resultante do complexo entre um metal solúvel com um aminoácido.

Complexo metal com aminoácido específico - produto resultante do complexo entre um metal solúvel com um aminoácido específico.

Metal proteínatos – produto resultante da quelação de um sal solúvel com aminoácidos ou proteínas parcialmente hidrolisada.

Complexo metal polissacarídeo - produto resultante do complexo entre um sal solúvel e uma solução de polissacarídeo declarada como um ingrediente de um complexo metálico específico.

Poucos estudos foram conduzidos para determinar a biodisponibilidade das fontes orgânicas de Fe para os animais. Spears et al. (1992) comparando fontes de Fe-metionina com fontes inorgânicas concluiu através da concentração de hemoglobina que a biodisponibilidade do Fe orgânico foi de 180 quando comparado com as formas inorgânicas consideradas como 100. Segundo Reddy et al. (1992) as formas orgânicas dos minerais quelatados aumentam a biodisponibilidade dos minerais em relação as formas inorgânicas o que pode trazer vários benefícios ao animal, tais como: maior taxa de crescimento, maior ganho de peso, maior produção de ovos, melhora na qualidade de carne e ovos, redução da taxa de mortalidade e redução do efeito do stress. Segundo Paik (2001) houve incremento na quantidade de Fe da gema do ovo de poedeiras recebendo complexo de Fe-metionina, quando comparado com as aves que receberam Fe na forma inorgânica. Yu et al. (2000) utilizaram um complexo Fe-aminoácido na dieta de suínos e observaram um aumento dos níveis de Fe, bem como uma maior capacidade de ligação total de Fe (TIBC) do soro. No fígado e baço os níveis de Fe não heme também foram aumentados. Acredita-se que durante a passagem através do trato gastrintestinal, os minerais quelatados são

protegidos contra a influência de fatores inibidores presentes no ambiente intestinal com relação a sais inorgânicos (Lyons & Jackes, 1994).

Metais complexados a amino ácidos são praticamente sem carga elétrica, desta forma não reagem a mudanças no pH durante a passagem pelo trato gastrintestinal. Ashmead (1985) descobriram que aminoácidos e dipeptídeos têm papel de transportadores através da membrana do enterócito. Devido a esse caminho de absorção, o mecanismo de controle homeostático a nível de enterócito é evitado. No entanto, outros estudos favorecem a idéia de que o Fe na forma quelatada também é regulado a nível de enterócito, o mesmo mecanismo de absorção a partir do sulfato ferroso (Bovell al., 2000). Muitos estudos têm demonstrado os benefícios dos minerais orgânicos no metabolismo animal, porém a detecção dos efeitos positivos no desempenho ainda é pouco consistente (Vieira, 2008).

#### **1.2.8. Deficiência de Fe**

A deficiência de Fe é a alteração hematológica mais comum que acomete a espécie humana, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (Tefferi, 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2001), 20% a 30% da população adulta mundial têm deficiência de Fe, constituindo-se, portanto, num grave problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento. A tabela abaixo apresenta uma média das recomendações de ingestão diária de Fe pela população humana.

Tabela 1. Recomendações diárias de ingestão de Fe para humanos

Faixa etária	Fe (mg/d)
0-6 meses	0,27
7-12 meses	11
1-3 anos	7
4-8 anos	10
<b>Sexo Masculino</b>	
9-13 anos	8
14-18 anos	11
19 a >70 anos	8
<b>Sexo Feminino</b>	
9-13 anos	8
14-18 anos	15
19-50 anos	18
51 a >70 anos	8
Gravidez	27
<b>Lactente</b>	
14-18 anos	10
19- 50 anos	9

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2001.

A anemia ferropriva ocorre quando existe um desequilíbrio entre a absorção e as necessidades do organismo pelo mineral. Esse desequilíbrio pode ser devido à ingestão inadequada de Fe, à sua biodisponibilidade reduzida na dieta, às necessidades aumentadas em grupos específicos, ou à perdas crônicas de sangue, que acarretam uma diminuição da taxa de hemoglobina, caracterizando a anemia (De Maeyer et al., 1989). Para animais de produção, com exceção dos leitões, a deficiência de Fe é rara e de difícil achado sob condições normais de criação, exceto em circunstâncias envolvendo perda sanguínea, deficiência na dieta e distúrbios resultantes de infestações parasitárias ou doenças (Milman et al., 2006).

A deficiência de Fe no organismo acontece em três estágios de desenvolvimento seqüenciais, podendo haver sobreposição dos mesmos. O

primeiro corresponde ao esgotamento das reservas, definido pela baixa concentração de ferritina sérica refletindo perda nos estoques de Fe do baço, fígado e da medula óssea. O segundo estágio é conhecido como eritropoiese da deficiência de Fe, em que os eritrócitos em desenvolvimento têm mais necessidade de Fe. Este estágio é caracterizado pelo aumento na capacidade de ligação de Fe e diminuição da concentração de Fe sérico. E o terceiro e mais grave estágio, conhecido como anemia ferropriva, é desenvolvido quando a quantidade de Fe é inadequada para a síntese da hemoglobina, resultando em concentrações de hemoglobina abaixo dos valores de referência estabelecidos (Dallman, 1986).

Os estágios de deficiência podem ser analisados através de testes bioquímicos como Hemoglobina (Hb), ferritina, receptores solúveis de transferrina (sTfR) e hematócrito (Ht) complementados a exames indicadores de infecções agudas e crônicas (melhor procedimento para avaliar o status de Fe). Na prática nem todos os exames são realizados pela dificuldade do procedimento e custo elevado (Biesalski & Erhardt, 2007).

O tempo de vida das hemácias varia entre as espécies aviárias, nas galinhas varia entre 28 a 35 dias (Sturkie, 1976) e 120 dias nos mamíferos. A curta vida das hemácias nas aves atribuiu-se a seu elevado metabolismo e a temperatura corporal de 41° C. Nas aves, as hemácias são ovais e nucleadas, medem 7,7 micra de largura e 8,1 a 10 micra de comprimento. A contagem total de hemácias permite realizar uma análise mais pormenorizada com presença ou ausência de anemia ou hemoconcentração (Noriega, 2000).

Um dos testes realizados para diagnóstico de anemia nutricional é a



hemoglobina sérica. Um ponto crítico na medida da Hb é a diluição exata do anticoagulante. Infelizmente a medida de Hb não é muito sensível ou específica para a deficiência de Fe (Cook, 2005). Somente o terceiro estágio da deficiência de Fe afeta a síntese de hemoglobina, assim como a presença de doenças infecciosas.

A ferritina sérica é considerada o melhor indicador para o status de Fe (Finch et al., 1986). O plasma mantém correlação com os estoques de Fe corporal e no primeiro estágio da anemia os estoques de ferritina decrescem, sendo este o parâmetro mais sensível. Em humanos a mensuração da ferritina é feita por imunoturbidimetria, ELISA ou radioimunoensaio, ou seja, é feita com o uso de anticorpos espécie-específico (Cook, 2005).

O hematócrito normalmente correlaciona-se com os níveis de hemoglobina, porém é menos sensível á deficiência de Fe que a Hb. Portanto, somente a mensuração do hematócrito não é um bom indicador do status de Fe. O hematócrito permite avaliar a parte globular em uma amostra de sangue. Baixo índice de hematócrito pode ser observado em doenças agudas ou crônicas, septicemias e doenças hemorrágicas (Campbell & Dein, 1984). Os valores normais do hematócrito nas aves variam de acordo com a idade (Noriega, 2000).

#### **1.2.9. Uso da farinha de carne ossos em reprodutoras**

Pelo valor biológico das proteínas de origem animal, a farinha de carne e ossos (FCO), é uma matéria prima amplamente utilizada ao preparo de rações. Isto é devido ao seu valor nutritivo, em proteína, gordura e minerais como cálcio e fósforo e principalmente como fonte de aminoácidos e vitamina

B12 (Butolo, 2002). A inclusão de farinha de carne e ossos na ração das aves afeta diretamente a biodisponibilidade de Fe, já que neste ingrediente o Fe é encontrado na forma heme.

A FCO tem um papel como redutora nos custos de formulações. O uso de FCO em dietas para reprodutoras está se tornando mais popular desde que houve melhora nas questões sanitárias em várias regiões do mundo, porém, ainda existem restrições quanto aos riscos de contaminação vertical por *Salmonella spp.*

Além dos problemas de qualidade de FCO, por exemplo, contaminação por *Salmonella spp.*, problemas mais sérios surgiram com a Encefalopatia Espongiforme Transmissível (TSE). Os primeiros casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) foram detectados em 1986 no Reino Unido. Sua presença mais recente no Canadá e nos EUA gerou uma perda de milhões de dólares às exportações remetendo o Brasil a possibilidade de rebaixamento da categoria I para a II no World Organization for Animal Health (OIE). Entretanto, o Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil (MAPA) tomou várias medidas, entre as quais a rastreabilidade de animais importados visando a eliminação destes e também foi inserida entre as normas a instrução normativa (IN) 15/2003, a qual foi aditada mais tarde pela IN 29/2004, sendo essas as normas em vigor que disciplinam a produção e uso de proteínas animais na alimentação animal.

Como exportador, o Brasil cumpre exigências de alguns países como a União Européia que através da implementação da ABPR - Animal By-products Regulation (Regulation EC No 1774/2002) bane o uso de FCO para

animais de produção. Porém, segundo Dale (2002), não há motivos para a suspensão do uso de subprodutos de origem animal para aves, pois não se tem notícia da ocorrência de enfermidades como TSE nessa espécie. Desta maneira, não há restrições no mercado interno quanto ao uso dos subprodutos de origem animal na alimentação de matrizes de corte.

### **1.3. HIPÓTESES**

1. As aves não suplementadas com Fe apresentam perdas de desempenho produtivo.
2. Dietas sem ingredientes de origem animal apresentam resposta superior à suplementação de Fe da fonte complexada com AA.
3. As aves suplementadas com complexo Fe-AA têm maior deposição de ferro no ovo.

#### **1.4. OBJETIVOS**

1. Avaliar se existem diferenças entre as dietas de origem animal e vegetal sobre o desempenho produtivo das reprodutoras.

2. Avaliar se existem diferenças entre a suplementação de Fe na forma de sulfato ferroso ou de Fe-AA sobre a produção, peso e conteúdo de Fe no ovo.

3. Avaliar a concentração de ferro nos ovos de reprodutoras alimentadas com Fe-AA ou sulfato ferroso utilizando dietas de origem animal e de origem vegetal.

## CAPÍTULO II<sup>1</sup>

**Dietary effects of iron sources in broiler breeders performance and egg  
iron contents**

F. Bess <sup>a</sup>, S. L. Vieira <sup>a,\*</sup>, A. Favero <sup>a</sup>, R. A. Cruz <sup>a</sup>, P. C. Nascimento <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

Corresponding author: S. L. Vieira ([slvieira@ufrgs.br](mailto:slvieira@ufrgs.br)), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil. Phone/fax: 55 51 33086048.

---

<sup>1</sup> Artigo submetido à revista Animal Feed Science and Technology em Novembro de 2011

## ABSTRACT

Sixty Cobb 500 broiler breeder hens, 22 wks of age, were individually placed in zinc galvanized cages and fed diets without Fe supplementation for 84 days. Birds were then randomly allocated to 6 dietary treatments with similar nutrient profile, except for Fe, in a factorial of 2 diets (All Vegetable and Animal by Product) and 3 Fe sources None, Inorganic (60 mg/kg of Fe) and Complexed (60 mg/kg). The All Vegetable diet was formulated with corn, soybean meal and wheat bran whereas the Animal by Product diet had the same ingredients and was added with 2.5% meat and bone meal. The None diet was not supplemented with Fe, whereas Inorganic and Complexed diets had 60 mg/kg of Fe as supplement from Fe<sup>2+</sup> sulfate or Fe-amino acid (Fe-AA). Diets were provided for 3 periods of 4 wks and eggs were collected daily. Hen day egg production and Fe contents of yolk and albumen were analyzed using a two-way Anova with repeated measures. Throughout the study egg production was lowest for birds fed diets without Fe supplementation but without difference between the Fe sources. Contents of Fe in yolk increased from the first to the second period without changes afterwards, whereas it decreased in albumen from the second to the third period. Yolk Fe concentration was highest for the Animal by Product diet supplemented with Fe-AA, lowest for the Vegetable diet not supplemented with Fe, and without differences for the other treatments. Albumen Fe concentration was only increased when Fe was supplemented in diets having animal by-product, but further increases were dependent on the use of Fe-AA. It is concluded that breeder hens have reduced hen day egg production when not supplemented with Fe and that Fe supplementation can



affect yolk and albumen contents depending on the presence of animal protein sources in the diet.

Key words: iron, meat and bone meal, chelated mineral

*Abbreviations:* AA, amino acid; CP, crude protein; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Fe-AA, Fe-amino acid; Hb, Hemoglobin; nPP, non phytate P.

## **1. Introduction**

Broiler breeder diets are usually supplemented with Fe as part of the mineral premix. This is an essential mineral, which is involved in a varied number of metabolic processes. Most of these processes include oxygen transport and therefore, the majority of Fe in the animal organism is part of hemoglobin and myoglobin (Leeson and Summers, 2001). Dietary Fe can be roughly divided in heme and non-heme pools. Heme Fe is only present in the diet when animal by products are used in feed formulation, whereas Fe in plant originated ingredients, as well as a small proportion of Fe in animal by-products, are non-heme molecules (Bjom-Rasmussen et al., 1974; Theil, 2004).

An average egg has around 1.5 mg of Fe (Cao et al., 1996), which is mostly in the yolk being part of the phosvitin molecule, an egg protein that delivers minerals for the embryo during incubation (Greengard et al., 1964). Egg Fe concentration varies according to its chemical form as well as its concentration in the feed (Naber, 1979; Stadelman and Pratt, 1989). On the other hand, Fe concentrations in crops vary depending on soil chemistry (Lindsay, 1982).

Availability of Fe for animals is variable depending on the Fe oxidative status. Non-heme Fe is released by acid digestion in the stomach and must be reduced to ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) prior to uptake by duodenal enterocytes (Tako and Glahn, 2011). Compounds such as ascorbic acid can reduce ferric ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in the intestinal lumen and therefore increase its bioavailability (Monsen, 1988). Heme Fe is more available for animals in general (Hallberg et al., 1979; Henry and Miller, 1995). In plant-originated ingredients, phytate permanently binds important amounts of Fe and, therefore, hinders the availability of Fe when compared to heme Fe (Davies and Nightingale, 1975). Heme Fe is only present in the poultry feed when animal by-products are used, which is in general avoided in the feeding of broiler breeders to reduce risks of vertical progeny contamination with pathogens, such as *Salmonella spp.*

Supplementation of Fe in poultry diets is usually done with non-expensive sources, such as ferrous sulfate. High concentrations of Fe are also present in common Ca and P sources, such as, limestone, rock phosphate and dicalcium phosphate (NRC, 1994). However, Fe in these compounds is largely unavailable since it is mostly present in the ferric state (Appel et al., 2001).

Research with Fe for broiler breeders is scarce. This is a mineral that has been neglected as an important mineral either because it is highly available in the nature or because its supplemental sources are comparatively inexpensive. However, since Fe in natural sources is of low availability for birds, but also because egg production by individual breeder hens has been constantly increasing, research on the requirements of this mineral are needed.

Egg production, Fe in egg components and embryo development may benefit on more available sources of Fe in breeder diets.

The use of animal by-products in breeder diets is becoming more popular since high quality meat and bone meal exempt of sanitary issues is now available in many regions of the world. This practice targets the reduction of feeding costs, mostly because it can reduce the cost of dietary protein, but its dietary inclusion directly affects Fe bioavailability for breeders.

Chelated minerals are expected to have higher solubility in the gastrointestinal tract and have been increasingly used in animal nutrition. Moreover, these mineral sources are biochemically more stable and protected from adverse reactions and competition with other components of diet that could reduce their rate of absorption (Close, 1998). Many studies have demonstrated the benefits of metal amino acid (AA) chelates in the animal metabolism, but the detection of positive effects on live performance is less consistent (Vieira, 2008).

The objective of this study was to compare diets with or without animal by-products (meat and bone meal) and the supplementation of Fe with a traditional Fe<sup>2+</sup> sulfate source or with Fe-amino acid (Fe-AA) complex.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. General broiler husbandry*

Birds were managed according to the directives of the Ethics and Research Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (Porto Alegre, RS, Brazil).

Sixty Cobb 500 female broiler breeder hens, 22 wks of age, were obtained from a local hatchery (Doux Frangosul, Montenegro, RS, Brazil). Birds were individually weighed and placed in zinc galvanized steel cages (0.33 m wide x 0.46 m deep x 0.40 m height) in an open sided house. Lighting and feeding throughout the study followed recommendations from the Cobb Breeders Management Guide (2010).

## *2.2. Dietary treatments*

Birds were fed a typical broiler breeder vegetal mash diet with 156.7 g/kg of Crude Protein (CP), 11.89 AME<sub>n</sub> MJ/kg, 32.0 g/kg Ca and 4.5 g/kg non phytate P (nPP) without Fe supplementation for 84 days. During this period blood was drawn from the brachial vein in syringes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from all birds on the 28, 56 and 84<sup>th</sup> days to evaluate hematocrit and hemoglobin (Hb). Concentration of Hb was determined using the cyanmethemoglobin method described by Crosby et al. (1954), whereas for hematocrit determination, blood was placed in microcapillaries then centrifuged for 5 minutes for 10,000 to 12,000 rpm for the separation of red blood cells. On day 85, hens were randomly allocated to 6 dietary treatments in a factorial design of 2 diets and 3 Fe sources. The two diets were formulated using only plant-based ingredients (All Vegetable) such as corn, soybean meal and wheat bran, or having the same ingredients added by 2.5% meat and bone meal (Animal by Product). Both diets were not supplemented with Fe (None) or had supplementation of 60 mg/kg of Fe from FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Inorganic) or from Fe-AA (Complexed). All feed ingredients and compounded diets used in the study were analyzed for Fe using atomic

absorption spectrometry (USEPA 3050B). Contents of Fe in water were negligible (< 0.04 mg/L). Diets were analyzed for Ca (927.02), CP (988.05) (AOAC, 1990) and P (Cavell, 1955.). Feed formulation is shown on Table 1. Each treatment had 10 replications of one hen each. Two extra hens were kept individually caged and fed diets corresponding to each treatment to replace eventual mortality. Diets were provided for 3 periods of 4 weeks each after 34 wk.

**Table 1**  
Ingredient and chemical composition of the basal diet<sup>a</sup>.

Ingredients	Animal by Product	All Vegetable
Maize	563.4	573.7
Soybean meal (460 g/kg)	192.3	216.8
Wheat bran (140 g/kg)	100.0	80.2
Limestone (360 g/kg)	37.5	38.8
Oyster shells	35.0	35.0
Soybean fat	25.2	24.7
Meat and bone meal (420 g/kg)	25.0	-
Dicalcium phosphate	9.0	18.3
Common salt	3.5	3.7
Potassium carbonate	2.1	1.9
DL-Methionine (990 g/kg)	1.7	1.7
Sodium bicarbonate	1.0	1.2
Mineral Premix <sup>b</sup>	1.0	1.0
Vitamin Premix <sup>c</sup>	2.0	2.0
Choline chloride (600 g/kg)	0.9	0.9
L-Threonine (985 g/kg)	0.2	0.1
Lysine HCl (780 g/kg)	0.2	-
Calculated nutrient composition (mg/kg)		
Crude protein	156.9 (162.0) <sup>e</sup>	155.3 (163.9)
AMEn <sup>d</sup> (MJ/kg)	11.72	11.72
Calcium	32.0 (32.8)	32.0 (33.0)
Non-phytate phosphorus	4.5	4.5
Total phosphorus	6.7 (7.7)	6.7 (7.5)
Digestible lysine	7.1	7.1
Digestible total sulfur amino acids	6.1	6.1
Digestible threonine	5.3	5.3
Choline	1500	1500

<sup>a</sup> Each diet was used with or without Fe supplementation with 60 mg/kg Fe from ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) or Fe-amino acid.

<sup>b</sup> Mineral premix supplied the following per kilogram of diet: Zn, 100 mg; Mn, 100 mg, Cu, 10 mg; Se, 0.3 mg and I, 1 mg (Zn, Mn and Cu from sulfate, whereas Se was from sodium selenite and I from calcium iodate).

<sup>c</sup> Vitamin premix supplied the following per kg of diet: vitamin A, 12000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 3000 IU; vitamin E, 100 IU; vitamin C, 50 mg; vitamin K<sub>3</sub>, 6 mg; vitamin B12, 35 µg; thiamine, 3 mg; riboflavin, 15 mg; vitamin B6, 6 mg; niacin, 40 mg; pantothenic acid, 25 mg; folic acid, 4 mg; biotin, 0.3 mg.

<sup>d</sup> Apparent metabolizable energy corrected for N.

<sup>e</sup> Values within parenthesis are analyzed means.

### 2.3. Measurements

Egg production was daily recorded whereas egg weight was evaluated with eggs produced in the last 3 days of each period of 28 days. After these measurement, the same eggs had their yolk and albumen composites separated, being later pooled by every 2 replicates of the same treatment. Therefore, there were 5 egg yolk and albumen samples per treatment per period. Each pooled sample was stirred mixed and immediately stored at -18°C. Concentration of Fe in egg composites was determined using Atomic Absorption Spectrometry (leggi et al., 2010). Measurements were carried out using an ANALITIK JenaAG (Jena, Germany) model novAA 300 atomic absorption spectrometer equipped with SpectrAA (Varian, Australia) hollow cathode lamps as the radiation source. Standard Fe solution (1000 mg/L) was obtained from National Institute of Standards and Technology (NIST, USA).

### 2.4. Statistical analyses

Performance and egg data were analyzed using repeated measures with the MIXED Procedure of SAS (Littell et al., 1996) with diet,

source, period and their interactions as main effects. A compound symmetry structure was fitted, as it showed the highest value of the Schwarz Bayesian criterion (Littel et al., 1998). A consideration was made that measures in all periods had the same variance and that all pairs of measures from the same animal had the same correlation. All means were compared using the Tukey test (Tukey, 1991) and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Data obtained in the 3 periods prior to feeding the experimental diets (Table 2) showed a significant decrease in hematocrit and hemoglobin parameters on day 84 ( $P < 0.01$ ) when compared to the same parameters obtained in the first period. These parameters were indicative of Fe deficiency when the dietary treatments were implemented.

**Table 2**  
Blood parameters prior to the beginning of the treatments<sup>a</sup>.

Week <sup>b</sup>	Hematocrit, %	Hemoglobin, g/dl
0	33.65 <sup>a</sup>	7.02 <sup>a</sup>
4	33.67 <sup>a</sup>	6.98 <sup>a</sup>
8	29.97 <sup>b</sup>	6.99 <sup>a</sup>
16	28.87 <sup>b</sup>	6.57 <sup>b</sup>
Mean	31.54	6.89
SEM ( $n=10$ )	0.65	0.15
Prob.	0.0001	0.0022

<sup>a</sup> Blood was drawn from the brachial vein in the amount of 1.0 ml per hen every 4 weeks

<sup>b</sup> Hens were evaluated at 22, 26, 30 and 34 weeks of age.

Calculated and analyzed Fe in the diets are presented in Table 3. Calculation of Fe was done using previous Fe analyzed contents in each feed ingredient. Analyses of the final compound diets showed a small variation between calculated and analyzed; however, Fe increased from the non-supplemented to supplemented diets as expected, regardless of Fe source.

**Table 3**

Calculated and analyzed Fe concentration in the experimental feeds.

Treatments <sup>a</sup>		Fe, mg/kg <sup>d</sup>	
All Vegetal	Animal by Product	Calculated	Analyzed <sup>c</sup>
None	-	588	561 ± 15
Inorganic	-	648	626 ± 18
Complexed <sup>b</sup>	-	648	624 ± 12
-	None	496	522 ± 13
-	Inorganic	556	576 ± 18
-	Complexed	556	574 ± 16

<sup>a</sup>All Vegetable diet was formulated with corn, soybean meal, and wheat bran; Animal by Product diet had the inclusion of 2.5% meat and bone meal; None: not supplemented with Fe, Inorganic: 60 mg/kg from ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O); Complexed: 60 mg/kg from Fe-amino acid.

<sup>b</sup>Availa®Fe 120 produced by Zinpro Corporation, Minnesota, USA. Guaranteed composition: 12.00% of Fe, tryptophan 0.07%, aspartic acid 0.98%, threonine 0.71%, serine 1.73%, glutamic acid 1.76%, proline 1.47%, glycine 1.33%, alanine 0.78%, cystine 0.71%, valine 1.11%, methionine 1.09%, isoleucine 0.70%, leucine 1.17%, tyrosine 0.40%, phenylalanine 0.69%, histidine 0.16%, lysine 0.29% and arginine 0.98%.

<sup>c</sup>One replicated pooled sample from each of 3 batches was analyzed using atomic absorption spectrometry.

<sup>d</sup>Calculated values were obtained using linear feed formulation using analyzed Fe in all feed ingredients.

Daily egg production is presented on Table 4. A reduction was observed with time, as expected for breeder hens as they experience the post peak declining egg production (Cobb-Vantress, 2010). Egg production from hens fed diets not supplemented with Fe showed a significant reduction ( $P < 0.05$ ) when compared to diets supplemented with Fe, regardless of diet type. There were no interaction between diet, Fe source and period ( $P > 0.05$ ).



**Table 4**  
Hen day egg production<sup>a</sup>.

Treatments <sup>b</sup>		Production, %			
All Vegetable	Animal by Product	Period 1 <sup>c</sup>	Period 2	Period 3	Mean
None	-	73.9 ± 3.73	67.1 ± 3.52	55.7 ± 6.46	65.5 <sup>b</sup>
Inorganic	-	76.0 ± 2.96	70.3 ± 3.41	67.1 ± 3.52	71.1 <sup>a</sup>
Complexed	-	72.5 ± 2.50	68.2 ± 2.46	64.2 ± 2.19	68.3 <sup>a</sup>
-	None	69.2 ± 3.69	63.9 ± 1.95	62.5 ± 3.25	65.2 <sup>b</sup>
-	Inorganic	77.1 ± 2.14	71.4 ± 2.86	68.5 ± 2.11	72.3 <sup>a</sup>
-	Complexed	73.2 ± 6.35	76.7 ± 1.70	69.6 ± 3.16	73.2 <sup>a</sup>
Mean		73.7 <sup>a</sup>	69.6 <sup>b</sup>	64.6 <sup>c</sup>	
Diet			0.3884		
Fe Source			0.0463		
Period			0.0001		
Diet x Fe Source			0.6075		
Diet x Period			0.2149		
Fe Source x Period			0.3519		
Diet x Fe Source x Period			0.3621		

Means within line and columns with no common superscript are significantly different.

<sup>a</sup> Total egg production in each period expressed as a percentage of each 28 d per period.

<sup>b</sup> All Vegetable diet was formulated with corn, soybean meal, and wheat bran; Animal by Product diet had the inclusion of 2.5% meat and bone meal; None: not supplemented with Fe, Inorganic: 60 mg/kg from ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O); Complexed: 60 mg/kg from Fe-amino acid.

<sup>c</sup> Hens were 38, 42 and 46 wks of age at the end of each period.

Egg weight was affected by period following an expected trend as hens aged ( $P < 0.05$ ). Value for the parameter was within commercial production parameters; however, there were no statistical differences for diet or Fe sources. Mean egg weights at 28, 56 and 84 days of experiment (38, 42 and 46 wks of age) were:  $66.5 \pm 1.21$  g,  $68.71 \pm 1.06$  g and  $69.88 \pm 1.24$  g.

Contents of Fe in yolks (Table 5) were affected by diet ( $P < 0.001$ ), Fe source ( $P < 0.001$ ), and period ( $P < 0.001$ ) as well as by the interaction between diet and Fe source ( $P < 0.05$ ). Contents of Fe increased from the first to the

second period, but they did not change afterwards. Average Fe concentration in yolk was highest for the Animal diet supplemented with Fe-AA, lowest for the Vegetable diet not supplemented with Fe, and without differences between the other four treatments.

**Table 5**  
Egg yolk Fe concentrations<sup>a</sup>.

Treatments <sup>b</sup>		Fe,mg/kg			Mean
All Vegetable	Animal by Product	Period 1 <sup>c</sup>	Period 2	Period 3	
None	-	45.5 ± 2.73	65.3 ± 1.90	62.2 ± 3.58	57.7 <sup>c</sup>
Inorganic	-	56.5 ± 4.18	72.0 ± 1.52	71.4 ± 3.49	66.7 <sup>b</sup>
Complexed	-	63.7 ± 2.80	74.7 ± 2.13	74.8 ± 2.32	71.1 <sup>b</sup>
-	None	68.5 ± 2.53	73.4 ± 4.16	77.7 ± 3.64	73.2 <sup>b</sup>
-	Inorganic	60.6 ± 3.71	78.2 ± 2.18	71.8 ± 1.58	70.2 <sup>b</sup>
-	Complexed	70.4 ± 2.70	88.2 ± 2.60	90.9 ± 4.32	83.1 <sup>a</sup>
Mean		60.8 <sup>b</sup>	75.3 <sup>a</sup>	74.8 <sup>a</sup>	
Diet			0.0001		
Fe Source			0.0001		
Period			0.0001		
Diet x Fe Source			0.0103		
Diet x Period			0.8292		
Fe Source x Period			0.7011		
Diet x Fe Source x Period			0.0683		

Means within line and columns with no common superscript are significantly different.

<sup>a</sup>Data was obtained using atomic absorption analysis on samples of yolk and albumen pooled by 2 replications, which remained the same throughout the study.

<sup>b</sup>All Vegetable diet was formulated with corn, soybean meal, and wheat bran; Animal by Product diet had the inclusion of 2.5% meat and bone meal; None: not supplemented with Fe, Inorganic: 60 mg/kg from ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O); Complexed: 60 mg/kg from Fe-amino acid.

<sup>c</sup>Hens were 38, 42 and 46 weeks of age at the end of each period; eggs were collected in the last 3 days of each period.

As expected, contents of Fe in albumen (Table 6) were much lower than the concentrations in the yolk. As with yolks, contents of Fe in albumen were affected by diet ( $P < 0.001$ ), Fe source ( $P < 0.001$ ), and period ( $P < 0.001$ ) as

well as by the interaction between diet and Fe source ( $P < 0.003$ ). A decrease in Fe was observed from the second to the third period. Content of Fe in albumen was lowest for diets not supplemented with Fe, regardless of diet type. Supplementation with Fe did not affect egg albumen concentration from hens fed All Vegetable diets; however, gradual increases followed the supplementation of Fe with Inorganic and then with the Complexed source when the Animal by Product diet was added.

**Table 6**  
Egg albumen Fe concentrations <sup>a</sup>.

Treatments <sup>b</sup>		Fe, mg/kg			Mean
All Vegetable	Animal by Product	Period 1 <sup>c</sup>	Period 2	Period 3	
None	-	1.1 ± 0.23	1.0 ± 0.09	0.9 ± 0.06	1.0 <sup>c</sup>
Inorganic	-	1.4 ± 0.14	1.2 ± 0.13	1.0 ± 0.07	1.2 <sup>c</sup>
Complexed	-	1.4 ± 0.06	1.2 ± 0.04	1.0 ± 0.03	1.2 <sup>c</sup>
-	None	1.4 ± 0.10	1.2 ± 0.16	1.0 ± 0.08	1.2 <sup>c</sup>
-	Inorganic	1.8 ± 0.14	1.6 ± 0.23	1.4 ± 0.10	1.6 <sup>b</sup>
-	Complexed	2.2 ± 0.16	2.2 ± 0.04	1.7 ± 0.10	2.1 <sup>a</sup>
Mean		1.5 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.2 <sup>b</sup>	
Diet			0.0001		
Fe Source			0.0001		
Period			0.0001		
Diet x Fe Source			0.0003		
Diet x Period			0.7635		
Fe Source x Period			0.7998		
Diet x Fe Source x Period			0.9105		

Means within line and columns with no common superscript are significantly different.

<sup>a</sup> Data was obtained using atomic absorption analysis on samples of yolk and albumen pooled by 2 replications., which remained the same throughout the study.

<sup>b</sup> All Vegetable diet was formulated with corn, soybean meal, and wheat bran; Animal by Product diet had the inclusion of 2.5% meat and bone meal; None: not supplemented with Fe, Inorganic: 60 mg/kg from ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$ ); Complexed: 60 mg/kg from Fe-amino acid.

<sup>c</sup> Hens were 38, 42 and 46 weeks of age at the end of each period; eggs were collected in the last 3 days of each period.

#### 4. Discussion

Research data to support Fe requirements for broiler breeders are scarce. Recommended supplementations of Fe for broiler breeder hens vary from 40 to 70 mg/kg (Aviagen, 2007; Leeson and Summers, 2007; Cobb-Vantress, 2010b). Hen day egg production data obtained in the present study clearly indicates that breeder hens fed diets not supplemented with Fe were deficient since their egg production, as well as Fe in egg yolk and albumen was reduced. Egg production was improved when diets were supplemented with 60 mg/kg of Fe from sulfate or from Fe-AA; however, the present data do not allow for a determination of Fe requirements because only one Fe level was used. Also, the Fe supplementation used in the diets in this study was somewhat higher when compared to current recommendations, which may have been in excess to the minimum needed to maximize egg production.

Egg yolk Fe deposition increased when hens were fed diets supplemented with Fe. However, data obtained in this study show that birds fed non-supplemented diets having meat and bone meal produced yolks with higher Fe content than their counterparts fed the All Vegetable diet. Increased Fe absorption is expected when Fe is originated from animal tissue as heme Fe when compared to inorganic forms (Henry and Miller, 1995). After ingestion of ingredients containing animal protein, heme results from proteolysis of myoglobin and hemoglobin, which is maintained in a soluble form available for absorption protected from chelation that can negatively affect Fe absorption (as it happens in its inorganic form). The association with protein increases the availability of heme Fe for animals (Hallberg et al., 1979). Heme Fe enters the

small intestinal absorptive cell as an intact metalloporphyrin, which is then split by heme oxygenase releasing inorganic Fe; therefore, both ingested Fe (as organic or inorganic) have a common pathway within the intestinal cell (Uzel and Conrad, 1998).

Phosvitin is a major egg yolk protein that accounts for 60% of the total yolk phosphoproteins composed by an unusual AA composition with around 60% phosphoserine, which results in a very strong affinity to bivalent metals, such as Ca, Mg, as well as Fe (Taborsky and Mok, 1967). Almost all the Fe present in the yolk is bound to phosvitin (Greengard et al., 1964), but the total capacity to bind Fe by phosvitin is higher than the total usually found (Samaraweera et al., 2011). Therefore, increased absorption of Fe by more bioavailable dietary sources may lead to a higher storage of egg yolk Fe. In this study, egg yolk Fe was not only increased when heme Fe was added to the diets without supplemental Fe, but it was further increased when Fe-AA was added.

Other studies have identified an association between the dietary Fe concentration for laying hens and the Fe content of eggs. Park et al. (2004) found that Fe content of eggs increased by 5 and 18% by the addition of either Fe sulfate or Fe-methionine, respectively. Supplementing Fe with levels much higher than usual (120 mg/kg) from a sulfate source, Skrivan et al. (2005) found increased Fe concentration in egg yolk by 6.3%. In the present study, supplementing 60 mg/kg of Fe from sulfate led to an increase of 15.5% in egg yolk Fe when supplementation was done on the All Vegetable diet. The average Fe content in this diet was, however, similar to the non-supplemented Animal

by-Product diet indicating that heme Fe from a 2.5% meat and bone meal addition was sufficient to provide Fe levels in the yolk compatible to concentrations obtained standard commercial supplementations are done. Supplementation of 60 mg/kg from Fe-AA demonstrated to be synergistic with heme Fe, which therefore led to further increases in Fe in the yolk.

## **5. Conclusion**

Hen day egg production and Fe contents in yolk and albumen from breeder hens fed diets without Fe supplementation are reduced indicating a state of deficiency in these animals.

Increased egg production is found with broiler breeder hens fed diets supplemented with 60 mg/kg of Fe from sulfate or Fe-AA.

Egg yolk Fe content increases similarly as breeder hens are fed diets with 60 mg/kg Fe from sulfate or Fe-AA; however, Fe contents in yolk further increase when hens are fed diets having meat and bone meal added with Fe-AA.

Egg albumen Fe contents increase only when Fe is supplemented in diets having meat and bone meal; further increases in Fe contents result from adding Fe-AA.

## References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990. Official Methods of Analysis, 15 th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Appel, M. J., Kuper, C. F., Woutersen, R. A., 2001. Disposition, accumulation and toxicity of iron fed as iron (II) sulfate or as sodium iron EDTA in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 39, 261-269.
- Aviagen, 2007. Parent Stock Nutrition Specification. Aviagen Group, Alabama, USA.
- Bjom-Rasmussen, E., Hallberg, L., Isaksson, B., Arvidsson, B., 1974. Food iron absorption in man. Applications of the two-pool extrinsic tag method to measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. *J. Clin. Invest.* 53, 247-255.
- Cao, J., Luo, X. G., Henry, R., Ammerman, C. B., Littell, R. C., Milles, R. D., 1996. Effect of iron concentration age and length of iron feeding on feed intake, and tissue iron concentration of broiler chicks for use as a bioassay of supplemental iron sources. *Poult. Sci.* 75, 495-504.
- Cavell, A.J., 1955. The spectrophotometric determination of phosphorus in plant material. *J. Sci. Food Agric.* 6, 479–480.
- Close, W. H., 1998. The role of trace mineral proteinates in pig nutrition. *Biotechnology in the feed industry*. In: Lyons, T. P and K. A. Jaques (Ed.), *Proc. Altech's 14 th Annu. Simp.*, Nottingham, UK, pp. 469-489.
- Cobb Vantress. 2010a. Cobb Breeder Management Guide. Cobb Vantress Inc., Arkansas, USA.

Cobb-Vantress. 2010b. Nutrition Breeder Management Supplement. Cobb Vantress Inc., Arkansas, USA.

Cook, J.D. Diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Best Practs Res Clin Haematol*, v. 18. P. 319-332. 2005.

Crosby, W. H., Munn, J. I., Furth, F. W., 1954. Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. *US Armed Forces Med. J.* 5, 693-703.

Davies, N. T., Nightingale, R., 1975. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of Zn and whole body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats. *Brit. J. Nutr.* 34, 243-258.

Greengard, O., Sentenac, A., Mendelsohn, N., 1964. Phosvitin, the iron carrier of egg yolk. *Biochim. Biophys. Acta.* 90, 406-407.

Hallberg L, Bjorn-Rasmussen, E., Howard, L., Rossander, L., 1979. Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Stand. J. Gastroenterol.*, 14,769-79.

Henry, P. R., Miller, E. R., 1995. Iron bioavailability, in: Ammerman, C. B., Baker., D. H., Lewis, A. J. (Eds.), *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins*. Academic Press, San Diego, pp. 169-199.

leggli, C. V. S., Bohrer, D., Nascimento, P. C., Carvalho, L. M., Garcia, S. C., 2010. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in emulsified egg samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta.* 80, 1282-1286.



- Leeson, S., Summers, J. D., 1997. Feeding programs for broiler breeders, in: Lesson, S., Summers, J. D. 2007. (Eds.), Commercial Poultry Nutrition. Univ. Books, Guelph, pp. 255-297.
- Leeson, S., Summers, J. D., 2001. Minerals, in: Lesson, S., Summers, J. D. (Eds.), Scott's Nutrition of the Chicken. Univ. Books, Guelph, pp. 331-428.
- Lindsay, W. L., Schwab, A. P., 1982. The chemistry of Fe in soils and its availability to plants. *J. Plant. Nutr.* 5, 821-840.
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., 1996. SAS System for mixed models. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Littell, R. C., Henry, P. R., Ammerman, C. B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216-1231.
- Monsen, E. R., 1988. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J. Am. Diet Assoc.* 8, 786-790.
- Naber, E. C., 1979. The effect of nutrition on the composition of eggs. *Poult. Sci.* 58, 518-528.
- NRC, 1994. Nutrient requirements of poultry. National Research Council, Washington, DC, USA.
- Park, S. W., Namkung, H., Ahn, H. J., Paik, I. K., 2004. Production of iron enriched eggs of laying hens. *J. Anim. Sci.* 17, 1725-1728.
- Samaraweera, H., Zhang, W. G., Lee, E. J., Ahn, D.U., 2011. Egg yolk phosphitin and functional phosphopeptides. *J. Food Sci.* 76, 143-141.
- Skrivan, M., Skrivanova, V., Marounek, M., 2005. Effects of dietary zinc, iron, and copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil, and herbage. *Poult. Sci.* 84, 1570-1575.

- Stadelman, W. J., Pratt, D. E., 1989. Factors influencing composition of the hen's egg. *Worlds Poult. Sci. J.* 45, 247-266.
- Taborsky, G., Mok, C. C., 1967. Phosvitin. Homogeneity and molecular weight *J. Biol. Chem.* 242, 1495-1501.
- Tako, E., Glahn, R. P., 2011. Iron status of the late term (*Gallus gallus*) embryo and hatchling. *Int. J. Poult. Sci.* 10, 42-48.
- Theil, E. C. 2004. Iron, ferritin, and nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 327-343.
- Tukey, J., 1991. The philosophy of multiple comparisons. *Stat. Sci.* 6, 100-116.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Method 3050B: Acid Digestion of Sludges, Solids and Soils. Gov. Print. Office, Washington, DC.
- Uzel, C., Conrad, M. E., 1998. Absorption of heme iron. *Semin. Hematol.* 35, 27-34.
- Vieira, S. L., 2008. Chelated minerals for poultry. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 10, 73-79.

## **CAPÍTULO III**

### 3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além dos animais, a população humana também é beneficiada através do consumo de produtos de origem animal enriquecidos com Fe. A maior disponibilização de Fe nas dietas dos seres humanos é uma necessidade crescente, tendo em vista o baixo consumo da população e sendo a anemia ferropriva um problema mundialmente comum.

O uso de farinha de carne e ossos na dieta de reprodutoras mostra-se como uma boa alternativa de suplementação de Fe em função da alta biodisponibilidade do mineral. Além disso, a melhoria na qualidade desse ingrediente e seu baixo custo são estímulos a sua inclusão na formulação de rações.

O uso de Fe-AA como suplemento animal pode ter os mesmos benefícios que as demais fontes presentes no mercado. Porém, além de não possuir variabilidade em sua composição, tem uma maior capacidade de deposição no ovo quando acrescido de uma dieta de origem animal.

É evidente a necessidade de uma reavaliação das exigências de Fe para reprodutoras. Este mineral é negligenciado em função de estar amplamente distribuído no ambiente, porém sua biodisponibilidade é baixa. Novos experimentos precisam ser conduzidos utilizando diferentes fontes e níveis de suplementação. Outros parâmetros como eclodibilidade, percentual

de ovos incubáveis e avaliação da progênie poderiam ser utilizados para evidenciar a importância deste mineral para as aves.

### 3.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAFCO- Association of American Feed Control Officials Incorporated. **Official Publication**, Olympia, 1997.

ANDERSON, B. K.; EASTER, R. A. A review of Iron Nutrition in Pigs. **Pig Book**, Champaign, p.75-89, 1999.

ANTON, M.; CASTELLANI, O.; DUBIARD, C. G. Phosvitin. **Bioactive Egg Compounds**, Berlin, p.17-24, 2007.

APPEL, M. J.; KUPER, C. F.; WOUTERSEN, R. A. Disposition, accumulation and toxicity of iron fed as iron (II) sulfate or as sodium iron EDTA in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.39, p. 261-269, 2001.

ASHMEAD, D. The influence of chelated iron proteinate, fed to sows with no iron supplementation to their baby pigs. **Journal of Animal Science**, East Lansing, v. 49 (suppl.1), 235p, 1979.

AVIAGEN. **Parent Stock Nutrition Specification**. Aviagen Group, Alabama, USA, 2007.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. 2<sup>th</sup> ed. São Paulo: Varela, 2003. 372p.

BAKER, D. H.; HALPIN, K. M. Manganese and iron interrelationship in the chick. **Poultry Science**, Champaign, v.70, n.1, p.146-52, 1991.

BERGER, J. et. al. Efficacy of combined iron and zinc supplementation on micronutrient status and growth in Vietnamese infants. **European Journal of Clinical Nutrition**, Montpellier, v.23, p.23-27, 2005.

BERTOLO, R. F. P.; BETTGER, W. J.; ATKINSON, S. A. Divalent metals inhibit and lactose stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Montvale, v.12, n.2, p.73-80, 2001.

BIESALSKI, H. K.; ERHARDT, J. G. Diagnosis of nutritional anemia-laboratory assessment of iron status. In: **NUTRITIONAL Anemia**. Sight and Life Press, Switzerland, v.1, p.38-44, 2007.

BOTHWELL, T. H. et al. **Iron Metabolism in Man**. Oxford: Blackwell Scientific, London, 1979.

BOVELL, B. A. C.; VITERI, F. E.; ALLEN L. H. Iron absorption from ferrous biglycinate and ferric triglycinate in whole maize is regulated by iron status, **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston v.71, p.1563-1569, 2000.

BUTOLO, J. E. Ingredientes de Origem Animal. In: **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**, Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição, 2002., p.239-280

BYRNE, B. M. et al. Amino acid sequence of phosvitin derived from the nucleotide sequence of part of the chicken vitellogenin gene. **Biochemistry**, Oxford, v.23, n.19, p.4275-4279, 1984.

CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian hematology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.14, n.2, p.223-248, 1984.

COBB-VANTRESS. **Nutrition Breeder Management Supplement**. Arkansas: Cobb Vantress Inc., 2010.

COOK, J. D. Clinical evaluation of iron deficiency. **Seminars in Hematology**, Maryland, v.19, p.6-18, 1982.

COOK, J. D. Diagnosis and management of iron-deficiency anemia. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, Philadelphia v.18, n.2, p.319-332, 2005.

CONRAD, J. H.; CROSBY, M. H. Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption. **Blood**, Philadelphia, v.22, p.406, 1963.

CONRAD, J. H. et al. Iron, manganese, sodium and zinc interrelationship in a tropical soil, plant and animal system. In: **WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION**, 1980, Buenos Aires. Proceedings,. Buenos Aires, 1980. p.48-53

CONRAD, M. E. et al. Separate pathways for cellular uptake of ferrous and ferric iron. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v.279, p.767-774, 2000.

DALE, N. La Harina de Carne y Hueso: Segura y Eficiente. **Industria Avícola. Latino Americana de Poultry International**, Buenos Aires, v.49, n.4, 18p, 2002.

DALLMAN, P. R. Iron deficiency in the weaning: a nutritional problem on the way to resolution. **Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement**, Stockholm, v.323, p.59-67, 1986.

DAVIS, G. K.; MERTZ, W. Trace elements in Human and Animal Nutrition. New York: **Academic Press**, 1987.

DAVIES, N. T.; NIGHTINGALE, R. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of Zn and whole body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats. **British Journal of Nutrition**, Edinburg. v.34, p.243-258, 1975.

DE MAEYER, E. M. et al. Preventing and Controlling Iron Deficiency Anemia Through Primary Health Care., Genebra, World Health Organization. 1989.

FINCH, C. A. et al. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. **The Western Journal of Medicine**, California, v.145, n.5, p.657-663, 1986.

FLANAGAN, P. R.; HAIST, J.; VALBERG, L. S. Comparative effects of iron deficiency induced by bleeding and a low-iron diet on the intestinal absorptive interactions of iron, cobalt, manganese, zinc, lead and cadmium., **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.110, n.9, p.1754-1763, 1980.

FLEMING, R. E. Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. **Current Opinion in Gastroenterology**, Philadelphia, v.21, p.201-206, 2005.

FISCHER, W. C. et al. Interactive effects of iron on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, Baltimore, v.82, n.1, p.5-12, 2005.

FRUTON, J. S.; SIMMONDS, S. **General Biochemistry**. 2<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1958.

GARCIA, J.; DATOL-BARRETE M.; DIZO, N. M. Industry experience in promoting weekly iron-folic acid supplementation in the Philippines. **Nutrition Reviews**, New York, v.63, n.2, p.146-51, 2005.

GROTTO, Z. W. H. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia**, Rio de Janeiro, v.30, n.5, p.390-397, 2008.

HAHN, P. F. et al. **Journal of Experimental Medicine**, New York, n.78, p.169, 1943.

HAMBIDGE, K. M.; CASEY, C. E.; KREBS, N. F.,. Trace elements in Human and Animal Nutrition. New York: **Academic Press**, 1986. v.2.

HARMON, B. G. et al. Oral iron dextran and iron form steel slats as hematinics for swine. **Journal Animal Science**, Savoy, v.39, p.699-702, 1974.



HENRY, P. R.; MILLER, E. R. Iron bioavailability. **Bioavailability of Nutrients for animals**. San Diego, California: Academic Press, 1995. p.169-199

ISHIKAWA, S. et al. Egg yolk phosvitin inhibits hydroxyl radical formation from the Fenton reaction. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Canada, v.68, p.1324-1331, 2004.

JIANG, B.; MINE, Y. Preparation of novel functional oligophosphopeptides from hen egg yolk phosvitin. **Journal Agriculture Food Chemical**, Canada, v.48, p.990-994, 2000.

JORGE, S. G. **Porfirias Hepáticas**. Disponível em: <[www.hepcentro.com.br/porfiria.htm](http://www.hepcentro.com.br/porfiria.htm)>. Acesso em: 16/12/2011.

KRATZER, F. H.; VOHRA, P. Chelates in Nutrition. **Research in Veterinary Science**, Boca Raton, v.67, p.223-228, 1986.

LEESON, S., SUMMERS, J. D. Feeding programs for broiler breeders. In: COMMERCIAL poultry nutrition. Guelph: Univ. Books, 1997. p.255-297

LINDSAY, W. L., SCHWAB, A. P. The chemistry of Fe in soils and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v.5, p.821-840, 1982.

LYONS, T. P.; JAQUES, K. A. Biotechnology in fed industry. In: **ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM**, 20., Lexington, 1994. **Proceedings**. Lexington, 1994. p.1-50

MATSUBARA, T.; SAWANO, K. Proteolytic Cleavage of Vitellogenin and Yolk Proteins During Vitellogenin Uptake and Oocyte Maturation in Barfin Flounder (*Verasper Moseri*). **Journal Experimental Zoology**, Amsterdam, v.272, p.34-35, 1995.

McDOWELL, L. R. Minerals in animal and human nutrition. New York: **Academic Press**, 1992.

MILLER, S. M.; McPERSON, R. J.; JUUL, S. E. Iron supplementation decreases zinc prothoporphyrin to heme ratio in premature infants. **Journal of Pediatrics**, New York, v.148, n.1, p.44-48, 2006.

MILMAN, N. B. Y.; BERGHOLT, T.; ERIKSEN, L. Side Effects of Oral Iron Prophylaxis in Pregnancy- Myth or Reality. **Acta Haematologica**, Copenhagen, v.115, p.53-57, 2006.

MIRET, S.; SIMPSON, J. R.; MCKIE, A. T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v.23, p.283-301, 2003.

MONSEN, E. R. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. **Journal of the American Dietetic Association**, Philadelphia v.8, p.786-790, 1988.

MORRIS, E. R. **Trace elements in human and animal nutrition**, New York: Academic Press, 1987.

MURRAY, J.; STEIN, N. **Trace element metabolism in animals**. Edinburgh: Scotland, v.1 1970.

NABER, E. C. The effect of nutrition on the composition of eggs. **Poultry Science**,. Savoy, v.58, p.518-528, 1979.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academic Press, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4<sup>th</sup> Ed., New York,: W. H. Freeman, 2004.

NORIEGA, M. L. V. C. Apuntes de hematología aviar: Curso de hematología aviaria. Ciudad del México, **Universidad Nacional Autónoma de México**, 2000. 70p (**Apostilla Mimeo**).

PAIK, I. Application of chelated minerals in animal production. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v.14, p.191-198, 2001.

PUNNONEN, K.; IRJALA, K.; RAJAMÄKI A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. **Blood**, Philadelphia, v.89, p.1052-1057, 1997.

REDDY, A. B.; DWIVED J. N.; ASHMEAD, A. D. Mineral chelation generates profit. **Misset-World Poultry**, Netherlands, v.8, p.13-15, 1992.

SCHIRM, J.; GRUBER, M.; A. B, G. Post-translational phosphorylation of phosvitin. **Feb. Letters**, Amsterdam, v. 30, 8p, 1973.

SETTLEMIRE, J. C.; MATRONE, C. A. Availability of iron. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.53,791p, 1967.

SPEARS, J. W. et al. Efficacy of iron methionine as a source for iron for nursing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70 (suppl. 1), 243p,1992.

STADELMAN, W. J., PRATT, D. E. Factors influencing composition of the hen's egg. **World's Poultry Science Journal**, Wallington, v.45, p.247-266, 1989.

STURKIE, P. D. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation, In: **Avian physiology**. New York: Springer-Verlag, 1976.p.53-75.

TEFFERI, A. Anemia in adults: A contemporary approach to diagnosis. **Mayo Clinic Proceedings**, Parsippany, v.78, p.1274-1280, 2003.

TABORSKY G. Iron binding by phosvitin and its conformational consequences. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.255, p.2976-2985, 1980.

TAKO, E.; GLAHN, R. P. Iron status of the late term (*Gallus gallus*) embryo and hatchling. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v.10, p.42-48, 2011.

THEIL, E. C. Iron, ferritin, and nutrition. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo alto, v.24, p.327-343, 2004.

UNDERWOOD, E. J. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4<sup>th</sup> ed. New York: **Academic Press**, 1977.

UNDERWOOD, E. J Sources of mineral. In: THE MINERAL nutrition of livestock. 2<sup>th</sup> ed. London, CABI, 1981. p.9-19.

VAN CAMPEN, J. A.; GROSS, F.C. Aminoacids in piglets nutrition. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.69, p.947, 1969.

VIEIRA, S. L. Chelated minerals for poultry. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.10, p.73-79, 2008.

YU, B.; HUANG, W.; CHIOU, P. W. Bioavailability of iron from amino acid in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.86, p.39-52, 2000.

WADDEL, R. J.; SELL, S. A. Calcium and Iron in poultry. **Journal of Animal Science**, Savoy. v.45, p.320-325, 1964.

WALLACE, R. A., SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in Teleosts. **American Zoologist**, California, v.21, p. 325-343, 1981.

WALTERS, G. O.; MILLER, F. M.; WORWOOD, M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.26, p.770-772, 1973.

WILLIAMS, D. M.; LOUKOPOULUS, D.; LEE, G. R.; CARTWRIGHT, G. E. Role of copper in mitochondrial iron metabolism. **Blood**, Philadelphia, v.48, p.77-85, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). Iron deficiency anemia: assessment, prevention, and control: **A guide for programme managers**. Geneva : World Health Organization, 2001.

## **APÊNDICES**

Apêndice 1. Normas para publicação de artigos no periódico *Animal Feed Science and Technology*.

## **GUIDE FOR AUTHORS**

### **INTRODUCTION**

#### ***Types of article***

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Professor G. Flachowsky, Federal Research Centre of Agriculture, Institute of Animal Nutrition, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany.

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturer's guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, wherein this information is not disclosed.

Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites.

Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

#### ***Contact details for submission***

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

#### ***Page charges***

This journal has no page charges.

#### **BEFORE YOU BEGIN**

#### ***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics>.

### ***Policy and ethics***

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>;

EU Directive 2010/63/EU for animal experiments

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm);

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

### ***Conflict of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### ***Submission declaration***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it



will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### ***Changes to authorship***

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### ***Copyright***

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### ***Retained author rights***

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit

the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### ***Language and language services***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit. Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editor-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editor-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anifee/>

#### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

#### **PREPARATION**

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

#### **Article Structure**

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously. However, in the text no reference should be made

to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Material and methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4. The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.

e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.

f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.

g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.

h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

***Essential title page information***

***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the

main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### ***Abstract***

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

### ***Keywords***

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).



***Nomenclature and units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable.

Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or .1.0. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is only used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent.

Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/ kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols e.g. <sup>18</sup>O. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### ***Math formulae***

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If  $0.10 > P > 0.05$ , then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2.

Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around \* and /. In probability expressions ( $P < 0.05$ ). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

### ***Artwork***

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### ***Tables***

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of

tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### ***References***

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...".

"This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author,

arranged according to publication dates - publications of the same author with one coauthor- publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Reference style*

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s)

in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

*Reference to a journal publication:*

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51.59.

*Reference to a book:*

Strunk, Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

*Reference to a chapter in an edited book:*

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281.304.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

***Video data***

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these



within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data

in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

*Ensure that the following items are present:*

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### ***Additional Information***

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium

for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal Physics Letters B): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication

will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Apêndice 2. Conteúdo de ferro na gema por período, mg/kg

Ferro	Dieta	Período 1	Período 2	Período 3
Sem	Vegetal	42,26	64,34	49,02
Sem	Vegetal	40,47	63,21	66,54
Sem	Vegetal	55,84	61,20	64,36
Sem	Vegetal	46,12	65,48	69,83
Sem	Vegetal	43,13	72,32	61,38
Inorgânico	Vegetal	61,46	67,57	81,02
Inorgânico	Vegetal	63,21	75,99	76,02
Inorgânico	Vegetal	44,55	70,93	64,13
Inorgânico	Vegetal	48,39	74,97	73,31
Inorgânico	Vegetal	64,91	71,02	62,88
Orgânico	Vegetal	62,04	79,57	74,44
Orgânico	Vegetal	53,87	69,74	83,06
Orgânico	Vegetal	70,43	79,90	74,43
Orgânico	Vegetal	65,81	70,84	68,65
Orgânico	Vegetal	66,54	73,80	73,55
Sem	Animal	73,03	61,86	72,15
Sem	Animal	66,62	87,46	70,97
Sem	Animal	60,16	75,55	84,85
Sem	Animal	68,34	70,91	88,26
Sem	Animal	74,36	71,51	72,66
Inorgânico	Animal	63,72	84,58	73,05
Inorgânico	Animal	54,85	74,63	76,36
Inorgânico	Animal	51,00	76,81	68,16
Inorgânico	Animal	61,20	73,15	68,25
Inorgânico	Animal	72,40	81,95	73,21
Orgânico	Animal	80,65	97,46	93,63
Orgânico	Animal	67,35	86,70	92,94
Orgânico	Animal	70,88	87,29	101,76
Orgânico	Animal	67,45	81,35	75,29
Orgânico	Animal	65,70	88,20	90,91

Apêndice 3. Conteúdo de ferro na clara por período, mg/kg

Ferro	Dieta	Período 1	Período 2	Período 3
Sem	Vegetal	1,17	0,89	1,20
Sem	Vegetal	0,73	1,21	1,00
Sem	Vegetal	0,79	1,27	0,88
Sem	Vegetal	1,12	0,80	0,98
Sem	Vegetal	2,06	0,91	0,83
Inorgânico	Vegetal	1,01	1,62	0,96
Inorgânico	Vegetal	1,12	1,36	1,07
Inorgânico	Vegetal	1,61	1,13	0,91
Inorgânico	Vegetal	1,60	1,22	0,88
Inorgânico	Vegetal	1,67	0,80	1,29
Orgânico	Vegetal	1,579	1,09	1,17
Orgânico	Vegetal	1,352	1,31	1,07
Orgânico	Vegetal	1,594	1,32	1,05
Orgânico	Vegetal	1,289	1,26	1,15
Orgânico	Vegetal	1,429	1,36	0,97
Sem	Animal	1,16	0,82	1,23
Sem	Animal	1,37	0,89	1,07
Sem	Animal	1,61	1,36	1,00
Sem	Animal	1,28	1,65	1,25
Sem	Animal	1,72	1,44	0,80
Inorgânico	Animal	1,37	1,42	1,11
Inorgânico	Animal	1,95	1,27	1,46
Inorgânico	Animal	2,18	1,18	1,65
Inorgânico	Animal	2,09	2,47	1,72
Inorgânico	Animal	1,79	1,67	1,46
Orgânico	Animal	1,76	2,12	2,07
Orgânico	Animal	2,71	2,19	1,63
Orgânico	Animal	2,36	2,32	1,50
Orgânico	Animal	2,06	2,35	1,70
Orgânico	Animal	2,37	2,15	1,99

Apêndice 4. Produção de ovos por período, %

Ferro	Dieta	Período 1	Período 2	Período 3
Sem	Vegetal	85,71	71,43	55,00
Sem	Vegetal	89,29	78,57	67,86
Sem	Vegetal	78,57	82,14	64,29
Sem	Vegetal	71,43	67,86	60,71
Sem	Vegetal	57,14	53,57	64,29
Sem	Vegetal	71,43	60,71	64,29
Sem	Vegetal	75,00	75,00	64,29
Sem	Vegetal	85,71	71,43	71,43
Sem	Vegetal	53,57	46,43	60,71
Sem	Vegetal	71,43	64,29	64,29
Inorgânico	Vegetal	75,00	53,57	60,71
Inorgânico	Vegetal	64,29	67,86	75,00
Inorgânico	Vegetal	71,43	67,86	42,86
Inorgânico	Vegetal	75,00	71,43	82,14
Inorgânico	Vegetal	78,57	60,71	64,29
Inorgânico	Vegetal	89,29	85,71	75,00
Inorgânico	Vegetal	89,29	89,29	75,00
Inorgânico	Vegetal	75,00	67,86	64,29
Inorgânico	Vegetal	60,71	64,29	60,71
Inorgânico	Vegetal	82,14	75,00	71,43
Orgânico	Vegetal	57,14	57,14	60,71
Orgânico	Vegetal	71,43	60,71	67,86
Orgânico	Vegetal	67,86	64,29	60,71
Orgânico	Vegetal	75,00	67,86	50,00
Orgânico	Vegetal	75,00	64,29	64,29
Orgânico	Vegetal	71,43	78,57	75,00
Orgânico	Vegetal	67,86	64,29	67,86
Orgânico	Vegetal	82,14	71,43	64,29
Orgânico	Vegetal	85,71	82,14	71,43
Orgânico	Vegetal	71,43	71,43	60,71
Sem	Animal	64,29	60,71	42,86
Sem	Animal	53,57	57,14	64,29
Sem	Animal	67,86	75,00	64,29
Sem	Animal	78,57	64,29	67,86
Sem	Animal	75,00	64,29	67,86
Sem	Animal	50,00	57,14	57,14
Sem	Animal	71,43	67,86	75,00
Sem	Animal	64,29	57,14	50,00
Sem	Animal	85,71	71,43	75,00
Sem	Animal	82,14	64,29	60,71
Inorgânico	Animal	67,86	71,43	67,86



Inorgânico	Animal	71,43	71,43	60,71
Inorgânico	Animal	75,00	64,29	57,14
Inorgânico	Animal	75,00	60,71	67,86
Inorgânico	Animal	85,71	64,29	75,00
Inorgânico	Animal	82,14	64,29	71,43
Inorgânico	Animal	78,57	85,71	75,00
Inorgânico	Animal	67,86	67,86	64,29
Inorgânico	Animal	85,71	78,57	67,86
Inorgânico	Animal	82,14	85,71	78,57
Orgânico	Animal	89,29	71,43	67,86
Orgânico	Animal	75,00	78,57	71,43
Orgânico	Animal	75,00	78,57	64,29
Orgânico	Animal	17,86	71,43	64,29
Orgânico	Animal	78,57	75,00	64,29
Orgânico	Animal	82,14	75,00	82,14
Orgânico	Animal	71,43	78,57	53,57
Orgânico	Animal	82,14	89,29	67,86
Orgânico	Animal	78,57	71,43	71,43
Orgânico	Animal	82,14	78,57	89,29

---

## Apêndice 5. Gravidade específica dos ovos por período

Ferro	Dieta	Período 1	Período 2	Período 3
Sem	Vegetal	1090	1083	1083
Sem	Vegetal	1089	1088	1085
Sem	Vegetal	1090	1083	1085
Sem	Vegetal	1085	1080	1080
Sem	Vegetal	1085	1080	1080
Sem	Vegetal	1091	1093	1090
Sem	Vegetal	1091	1091	1084
Sem	Vegetal	1083	1081	1079
Sem	Vegetal	1095	1088	1080
Sem	Vegetal	1091	1090	1086
Inorgânico	Vegetal	1088	1084	1084
Inorgânico	Vegetal	1084	1083	1085
Inorgânico	Vegetal	1088	1090	1085
Inorgânico	Vegetal	1086	1086	1076
Inorgânico	Vegetal	1083	1083	1085
Inorgânico	Vegetal	1086	1086	1089
Inorgânico	Vegetal	1088	1083	1085
Inorgânico	Vegetal	1090	1084	1083
Inorgânico	Vegetal	1086	1085	1083
Inorgânico	Vegetal	1085	1084	1083
Orgânico	Vegetal	1081	1079	1076
Orgânico	Vegetal	1089	1083	1080
Orgânico	Vegetal	1089	1086	1084
Orgânico	Vegetal	1086	1083	1085
Orgânico	Vegetal	1083	1081	1080
Orgânico	Vegetal	1085	1084	1080
Orgânico	Vegetal	1090	1088	1085
Orgânico	Vegetal	1081	1081	1080
Orgânico	Vegetal	1091	1094	1086
Orgânico	Vegetal	1088	1083	1080
Sem	Animal	1083	1080	1079
Sem	Animal	1085	1085	1075
Sem	Animal	1089	1090	1085
Sem	Animal	1091	1091	1090
Sem	Animal	1081	1085	1088
Sem	Animal	1088	1083	1078
Sem	Animal	1085	1085	1079
Sem	Animal	1089	1085	1085
Sem	Animal	1093	1089	1085
Sem	Animal	.	1079	1070
Inorgânico	Animal	1089	1083	1081
Inorgânico	Animal	1085	1085	1085

Inorgânico	Animal	1094	1094	1081
Inorgânico	Animal	1095	1094	1091
Inorgânico	Animal	1085	1085	1081
Inorgânico	Animal	1088	1084	1080
Inorgânico	Animal	1085	1083	1080
Inorgânico	Animal	1085	1083	1078
Inorgânico	Animal	1085	1088	1080
Inorgânico	Animal	1094	1090	1088
Orgânico	Animal	1084	1090	1085
Orgânico	Animal	1089	1079	1078
Orgânico	Animal	1081	1083	1074
Orgânico	Animal	.	1088	1089
Orgânico	Animal	1091	1093	1084
Orgânico	Animal	1090	1091	1085
Orgânico	Animal	1090	1085	1085
Orgânico	Animal	1084	1085	1078
Orgânico	Animal	1090	1091	1085
Orgânico	Animal	1094	1091	.

---

Apêndice 6. Peso dos ovos por período, g

Ferro	Dieta	Período 1	Período 2	Período 3
Sem	Vegetal	67,25	66,50	68,50
Sem	Vegetal	70,25	72,38	75,75
Sem	Vegetal	65,38	67,38	70,63
Sem	Vegetal	65,50	69,13	69,00
Sem	Vegetal	65,00	67,00	69,25
Sem	Vegetal	69,00	70,38	69,25
Sem	Vegetal	64,88	66,63	68,25
Sem	Vegetal	66,25	69,00	69,75
Sem	Vegetal	62,50	68,00	65,00
Sem	Vegetal	67,63	67,38	68,75
Inorgânico	Vegetal	69,75	70,50	74,50
Inorgânico	Vegetal	68,38	71,50	68,88
Inorgânico	Vegetal	66,00	67,00	70,75
Inorgânico	Vegetal	62,88	66,25	65,00
Inorgânico	Vegetal	73,63	71,00	79,25
Inorgânico	Vegetal	66,38	66,88	67,25
Inorgânico	Vegetal	64,00	65,38	67,50
Inorgânico	Vegetal	68,63	68,88	69,75
Inorgânico	Vegetal	62,63	63,00	64,50
Inorgânico	Vegetal	65,13	66,75	64,38
Orgânico	Vegetal	69,50	70,88	73,50
Orgânico	Vegetal	69,88	68,50	67,88
Orgânico	Vegetal	72,63	75,25	74,38
Orgânico	Vegetal	67,25	70,50	71,25
Orgânico	Vegetal	68,00	67,63	70,88
Orgânico	Vegetal	70,13	69,63	71,50
Orgânico	Vegetal	68,25	70,75	69,50
Orgânico	Vegetal	65,00	72,00	71,50
Orgânico	Vegetal	65,63	63,63	68,13
Orgânico	Vegetal	71,38	73,13	74,63
Sem	Animal	70,50	68,00	69,00
Sem	Animal	67,88	71,25	71,50
Sem	Animal	69,75	71,13	73,38
Sem	Animal	75,13	76,50	76,25
Sem	Animal	67,25	68,13	70,00
Sem	Animal	71,00	78,00	79,75
Sem	Animal	70,50	72,38	75,50
Sem	Animal	68,13	70,63	73,00
Sem	Animal	65,63	69,00	68,50
Sem	Animal	.	63,63	63,38
Inorgânico	Animal	65,38	69,63	73,63
Inorgânico	Animal	68,00	70,38	68,13

Inorgânico	Animal	64,00	66,63	67,88
Inorgânico	Animal	57,50	61,88	64,25
Inorgânico	Animal	69,75	72,63	77,13
Inorgânico	Animal	72,13	73,63	78,50
Inorgânico	Animal	59,13	62,25	64,13
Inorgânico	Animal	67,00	68,38	70,00
Inorgânico	Animal	61,75	63,25	64,88
Inorgânico	Animal	66,75	71,25	72,38
Orgânico	Animal	65,75	71,38	69,13
Orgânico	Animal	57,13	63,63	66,50
Orgânico	Animal	62,63	69,25	68,25
Orgânico	Animal	.	66,88	69,75
Orgânico	Animal	62,63	68,63	67,50
Orgânico	Animal	61,88	66,75	65,38
Orgânico	Animal	63,00	67,13	68,00
Orgânico	Animal	61,25	65,50	66,25
Orgânico	Animal	61,50	66,00	65,75
Orgânico	Animal	62,63	66,75	66,63

Apêndice 7. Análise de variância da gravidade específica

<b>ANOVA</b>					
Dentro dos sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Período	2	699,65	349,82	57,18	0,0001
Dieta x Período	2	39,21	19,60	3,20	0,4460
Ferro x Período	4	8,20	2,05	0,34	0,8538
Dieta x Ferro x Período	4	24,35	6,08	1,00	0,4137
Erro A	105	642,42	6,11		
Entre os sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Dieta	1	11,40	11,40	0,31	0,5799
Ferro	2	3,55	1,77	0,50	0,9529
Dieta x Ferro	2	124,14	62,07	1,69	0,1944
Erro B	54	1985,13	36,76		

## Apêndice 8. Análise de variância do peso dos ovos

<b>ANOVA</b>					
Dentro dos sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Período	2	388,65	194,32	88,22	0,0001
Dieta x Período	2	33,21	16,60	7,54	0,3948
Ferro x Período	4	12,35	3,08	1,40	0,2382
Dieta x Ferro x Período	4	16,76	4,19	1,90	0,1153
Erro A	106	233,50	2,20		
Entre os sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Dieta	1	23,99	23,99	0,82	0,3705
Ferro	2	84,17	42,08	1,43	0,2481
Dieta x Ferro	2	365,08	182,54	6,20	0,3800
Erro B	54	1588,88	29,42		

## Apêndice 9. Análise de variância da produção de ovos

<b>ANOVA</b>					
Dentro dos sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Período	2	2464,85	1232,42	17,00	0,0001
Dieta x Período	2	226,19	113,09	1,56	0,2149
Ferro x Período	4	324,26	81,06	1,12	0,3519
Dieta x Ferro x Período	4	318,02	79,50	1,10	0,3621
Erro A	108	7831,63	72,51		
Entre os sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Dieta	1	163,26	163,26	0,76	0,3884
Ferro	2	1405,75	702,87	3,25	0,0463
Dieta x Ferro	2	217,26	108,63	0,50	0,6075
Erro B	54	11660,71	215,93		

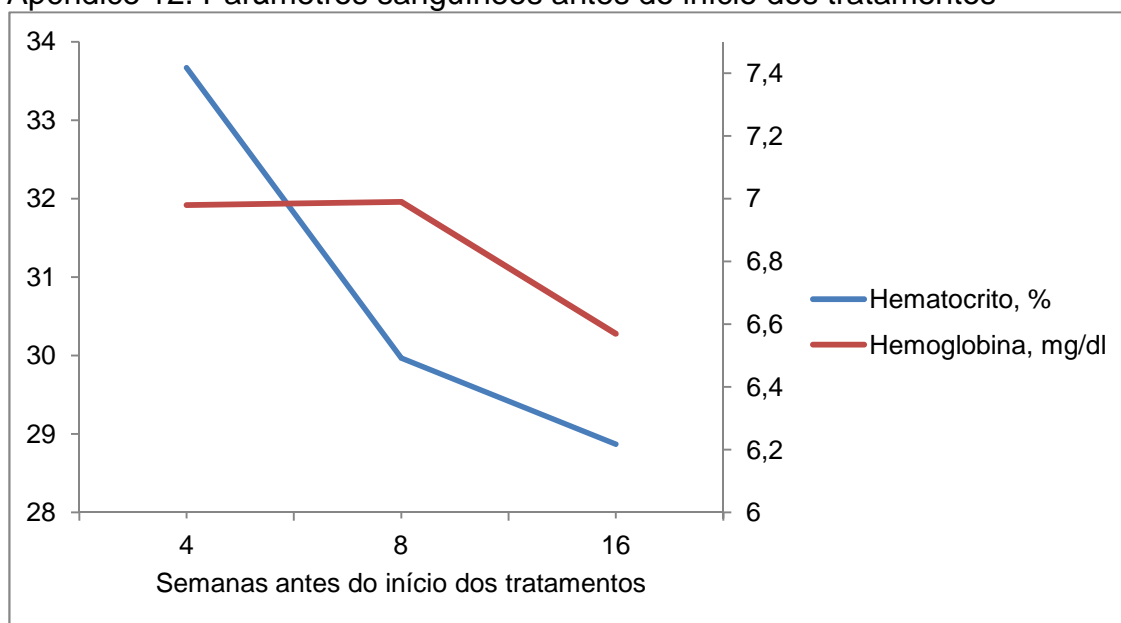
## Apêndice 10. Análise de variância do conteúdo de ferro na gema

<b>ANOVA</b>					
Dentro dos sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Período	2	4035,68	2017,84	47,33	0,0001
Dieta x Período	2	16,02	8,01	0,19	0,8292
Ferro x Período	4	93,51	23,37	0,55	0,7011
Dieta x Ferro x Período	4	418,64	104,66	2,46	0,0683
Erro A	48	2046,29	42,63		
Entre os sujeitos	GL	SQ	QM	F	p
Dieta	1	2423,49	2423,49	47,7	0,0001
Ferro	2	2204,82	1102,41	21,41	0,0001
Dieta x Ferro	2	573,3	286,65	5,57	0,0103
Erro B	24	1235,63	51,48		

## Apêndice 11. Análise de variância do conteúdo de ferro na clara

<b>ANOVA</b>					
<b>Dentro dos sujeitos</b>					
	GL	SQ	QM	F	p
Período	2	1,96	0,98	11,12	0,0001
Dieta x Período	2	0,04	0,02	0,27	0,7635
Ferro x Período	4	0,14	0,03	0,41	0,7998
Dieta x Ferro x Período	4	0,08	0,02	0,25	0,9105
Erro A	48	4,23	0,08		
<b>Entre os sujeitos</b>					
	GL	SQ	QM	F	p
Dieta	1	5,20	5,20	81,06	0,0001
Ferro	2	4,16	2,08	32,47	0,0001
Dieta x Ferro	2	1,52	0,76	11,89	0,0003
Erro B	24	1,53	0,06		

## Apêndice 12. Parâmetros sanguíneos antes do início dos tratamentos



## Apêndice 13. Valores das concentrações de ferro analisados nos ingredientes e na água

Ingredientes/água	Concentração de Fe
Milho	211,00 mg/kg
Soja	849,00 mg/kg
Farelo de trigo	242,00 mg/kg
Fosfato bicálcico	9.000,00 mg/kg
Calcário	2.000,00 mg/kg
Farinha de ostras	341,00 mg/kg
Carbonato de potássio	4,00 mg/kg
Bicarbonato de Na	13,00 mg/kg
Premix vitamínico	0,23 mg/kg
Premix mineral sem ferro	479,00 mg/kg
Caulin	527,00 mg/kg
Farinha de carne	490,00 mg/kg
Sal	39,00 mg/kg
Água	0,04 mg/L



## VITA

Franciele Bess, segunda filha de Deoclécio Bess e Eleuza Scatolin Bess, nasceu em Xanxerê, SC, aos 25 dias de abril de 1985. cursou o ensino fundamental na Escola Estadual de Ensino Fundamental Joaquim Nabuco em Xanxerê, SC. Concluiu o ensino médio no Colégio La Salle de Xanxerê, SC. Em 2003 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, RS, obtendo o grau de Médica Veterinária em setembro de 2009. Iniciou, em março de 2010, o curso de mestrado na área de Produção Animal, subárea Nutrição de Não-ruminantes, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, permanecendo neste até o presente momento.