

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**SUBSTITUIÇÃO DO CLORETO DE COLINA POR UMA FONTE VEGETAL DE  
COLINA EM DIETAS DE FRANGOS**

Allan Gabriel Ferreira Dias  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

GOIÂNIA, GO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESE E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação  Tese

**2. Nome completo do autor**

ALLAN GABRIEL FERREIRA DIAS

**3. Título do trabalho**

Substituição do cloreto de colina por uma fonte vegetal de colina em dietas de frangos

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM  NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Barcellos Café, Professor do Magistério Superior**, em 09/03/2021, às 20:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALLAN GABRIEL FERREIRA DIAS, Discente**, em 09/03/2021, às 20:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1931306** e o código CRC **2014916E**.

ALLAN GABRIEL FERREIRA DIAS

**SUBSTITUIÇÃO DO CLORETO DE COLINA POR UMA FONTE VEGETAL DE  
COLINA EM DIETAS DE FRANGOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Zootecnia junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

**Área de concentração:**

Produção Animal

**Linha de Pesquisa:**

Nutrição e Produção Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café – EVZ/UFG

**Comitê de Orientação:**

José Henrique Stringhini

Ana Paula Iglesias Santin

GOIÂNIA, GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Dias, Allan Gabriel Ferreira

Substituição do cloreto de colina por uma fonte vegetal de colina em dietas de frangos [manuscrito] / Allan Gabriel Ferreira Dias. - 2021. xii, 60 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café; co-orientador Dr. José Henrique Stringhini; co-orientador Dr. Ana Paula Iglesias Santin. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2021.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de tabelas.

1. avicultura. 2. empenamento. 3. metabolismo lipídico . 4. nutrição.  
I. Café, Marcos Barcellos, orient. II. Título.

CDU 635

10/03/2021

SEI/UFG - 1895708 - Ata de Defesa de Dissertação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Ata nº **89** da sessão de Defesa de Dissertação de **Allan Gabriel Ferreira Dias** que confere o título de **Mestre (a) em Zootecnia** pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de concentração em Produção Animal.

Aos dois dias do mês de março de dois mil e vinte e um – (02/03/2021) a partir das **08h30min**, cuja participação ocorreu por meio de videoconferência pela Plataforma Google Meet, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**Níveis de substituição do cloreto de colina por uma fonte vegetal de colina em dietas de frangos**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Marcos Barcellos Café** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Érica Crosara Ladir de Lucca/ IFTriangulo Mineiro/MG**, membro titular externo; **Alessandra Gimenez Mascarenhas**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido o candidato **Aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados por **Marcos Barcellos Café**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

**Substituição do cloreto de colina por uma fonte vegetal de colina em dietas de frangos**



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Barcellos Café, Professor do Magistério Superior**, em 02/03/2021, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica Crosara Ladir de Lucca, Usuário Externo**, em 02/03/2021, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Gimenez Mascarenhas, Professora do Magistério Superior**, em 02/03/2021, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1895708** e o código CRC **0C98783F**.

Referência: Processo nº 23070.009616/2021-51

SEI nº 1895708

Dedico esse trabalho a meus pais, José Miguel Ferreira Dias e Maria Abadia Cardoso Dias, e a minha avó Helena Cardoso da Luz, por todo apoio e inspiração dada durante toda minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que tem me proporcionado, e por ter proporcionado saúde a mim e a todos que me auxiliaram no decorrer dessa etapa da minha vida, em principal na execução do projeto, em meio a pandemia do coronavirus.

Agradeço aos meus pais, José Miguel Ferreira Dias e Maria Abadia Cardoso Dias, por todo apoio me dado durante o mestrado.

Agradeço ao meu orientador prof. Marcos Barcellos Café, por todos os ensinamentos e todo o suporte que proporciona no desenvolvimento de todo o mestrado.

Agradeço imensamente ao apoio dado por meu amigo e funcionário do Departamento de Zootecnia, Reginaldo Jacovetti no início do mestrado, sem o suporte inicial dele eu não teria conseguido me instalar na cidade com tamanha tranquilidade.

Agradeço a Layane da Conceição Matias, que esteve ao meu lado durante todo esse período independentemente da distância, me apoiando e motivando a continuar em busca de meus sonhos.

Agradeço aos funcionários da UFG que me auxiliaram na execução do meu trabalho, em especial aos funcionários do aviário Charles, Kelly e Felipe por toda colaboração.

Agradeço a todos os professores que tive a oportunidade de conviver durante as matérias do mestrado, em especial o prof. José Henrique Stringhini e a prof.<sup>a</sup> Nadja Susana Mogyca Leandro.

Agradeço a meus colegas de pós-graduação, por todo auxílio durante o projeto e o companheirismo durante esses dois anos: Ana Paula, Carla, Douglas, Júlio, Janaina, Julia, João, José Wilker, Marcus, Angélica, Alisson, Lorraine, Raphael e os alunos da graduação Patrick e Marianne.

Agradeço aos professores de outros departamentos da UFG que me auxiliaram em análises, sendo a prof.<sup>a</sup> Ana Paula Iglesias Santin (Histopatologia), prof. Edemilson Cardoso da Conceição (Faculdade de Farmácia), e o Laboratório de pesquisa e desenvolvimento em Nano/Tecnologia Farmacêutica e o Laboratório Multiusuário da EVZ.

Agradeço a técnica do laboratório multiusuário (RELAM) da UFU, Mariane.

Agradeço a coordenação do PPGZ/UFG pelo respaldo em todos os momentos.

A São Salvador Alimentos<sup>®</sup> pelo apoio durante a condução do experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 Colina .....	15
2.2 Fontes de Colina .....	18
2.2.1 Fontes de Colina Vegetal.....	20
2.3 Utilização de colina em dietas de frangos de corte .....	22
2.5 Deficiência de colina .....	23
2.5.1. Problemas Locomotores .....	23
2.5.2. Esteatose hepática.....	24
2.6 Anomalias musculares peitorais .....	25
3. MATERIAL E METODOS.....	27
3.1. Local e Período de Realização.....	27
3.2. Aves e Instalações .....	27
3.3. Delineamento e Tratamentos experimentais.....	28
3.4. Variáveis Analisadas .....	30
3.4.1. Desempenho .....	30
3.4.2. Rendimento de Carcaça, Cortes e empenamento .....	30
3.4.3 Análise bioquímica sérica.....	32
3.4.4. Análises de locomoção e lesões de pernas e pés .....	32
3.4.5. Análises histológicas .....	34
3.4.6. Análise de anomalias musculares peitorais .....	36
3.5. Análise propriedades físicas das fontes de colina .....	37
3.5.1. Determinação do teor de voláteis (VT) .....	37
3.5.2. Atividade de água .....	37
3.5.3. Teste de Higroscopicidade .....	37

3.5.4. Determinação da densidade dos pós.....	37
3.5.5. Determinação da velocidade de escoamento.....	38
3.5.6. Determinação do tamanho de partícula / distribuição de tamanho.....	38
3.6. Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1. Desempenho Zootécnico e uniformidade das aves.....	40
4.2. Rendimento de carcaça, empenamento e anomalias musculares peitorais.....	42
4.3. Análises dos membros locomotores e locomoção.....	47
4.4. Análises bioquímica sérica.....	51
4.5. Análises histopatológicas.....	53
4.6. Análise física das fontes de colina.....	59
4.6.1. Análise de higroscopicidade, atividade de água e voláteis totais.....	59
4.6.2. Determinação da densidade do pó e velocidade de escoamento.....	60
4.6.3. Determinação do tamanho de partícula/ distribuição de tamanho.....	61
5. CONCLUSÃO.....	63
REFERENCIAS.....	64

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. Valores nutricionais dos diferentes tipos de cloreto de colina.....	19
TABELA 2. Descrição da quantidade utilizada das fontes de colina e inerte em cada um dos tratamentos experimentais.....	28
TABELA 3. Dieta experimental utilizada nas fases pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias).....	29
TABELA 4. Desempenho zootécnico, peso médio, ganho de peso (1 a 7 dias), consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade criatória de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina de 1 a 7 dias.....	39
TABELA 5. Desempenho zootécnico, peso médio, ganho de peso (8 a 21 dias), consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade criatória de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina de 1 a 21 dias.....	39
TABELA 6. Desempenho zootécnico, peso médio, ganho de peso (22 a 35 dias), consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade criatória de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina de 1 a 35 dias.....	39
TABELA 7. Desempenho zootécnico, peso médio, ganho de peso (35 a 42 dias), consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade criatória de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina de 1 a 42 dias.....	40
TABELA 8. Uniformidade dos frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina em cada uma das fases.....	40
TABELA 9. Rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa (CS), asa, peito e pé, cabeça, pescoço e dorso (PPCD) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.....	42
TABELA 10. Porcentagem de órgãos e gordura abdominal (GA) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.....	42
TABELA 11. Efeito de diferentes fontes de colina aos 28 e 35 dias por meio de escore visual, e aos 42 dias utilizando a porcentagem de penas em frangos de corte.....	43
TABELA 12. Frequência de observação das anomalias musculares: <i>wooden breast</i> , <i>white striping</i> e <i>spaghetti meat</i> no peito de frangos de corte tratados com diferentes fontes de colina.....	44
TABELA 13. Resultados das análises do lipidograma do plasma sanguíneo de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina aos 21 e 42 dias.....	50
TABELA 14. Resultados das análises das enzimas fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma sanguíneo de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina aos 21 e 42 dias.....	50

TABELA 15. Frequência Observada dos escores das análises histológicas das lâminas de tecido do musculo peitoral de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.....	52
TABELA 16. Efeito das diferentes fontes de colina na área de cartilagem em proliferação (ACP), área de cartilagem hipertrófica (ACH) e área total (AT) da epífise proximal da tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade e a mediana dos escores visuais da epífise proximal da tíbia dos frangos.....	54
TABELA 17. Frequência Observada dos escores das análises histológicas: padrão trabecular (PT), Inflamação, Degradação celular, necrose celular, congestão de vasos e vasos sinusoidais (VS) das lâminas de tecido hepático de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.....	55
TABELA 18. Porcentagem de voláteis totais e atividade de agua (AW) das fontes de colina utilizadas.....	57
TABELA 19. Resultados dos parâmetros físicos (massa, volume, densidade aparente, densidade compactada, Índice de Carr, Índice de Hausner e velocidade de escoamento) do cloreto de colina e da colina vegetal.....	58
TABELA 20. Relação entre fluxibilidade de um pó, porcentual da compressibilidade e a razão de Hausner.....	59

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma fonte vegetal de colina em substituição do cloreto de colina, e seus efeitos no desempenho animal, metabolismo e rendimento de carcaça de frangos de corte. Foram utilizados 1120 frangos de corte macho linhagem Cobb 500 de um dia de vida, distribuídos em 4 tratamentos com 8 repetições de 35 aves cada, sendo os tratamentos: 1 - controle (Colina na forma de Cloreto de Colina 60%); 2 - 75% de cloreto de colina e 25% de colina vegetal (*Choline-H*) como fonte de colina; 3 - 50% de cloreto de colina e 50% de colina vegetal (*Choline-H*) como fonte de colina; 4 - 100% de colina vegetal (*Choline-H*) como fonte de colina. Foi avaliado o desempenho zootécnico (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, viabilidade e uniformidade), rendimento de carcaça e cortes, padrão de empenamento, perfil bioquímico sérico, saúde do sistema locomotor e fígado, anomalias musculares peitorais, e zonas de crescimento da epífise proximal da tíbia dos frangos. Não foram encontradas diferenças significativas no desempenho zootécnico (peso médio, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade) dos frangos em nenhuma das fases avaliadas (7, 21, 35 e 42 dias), o tratamento que utilizou apenas colina vegetal proporcionou maior uniformidade das aves a partir de 35 dias, para as variáveis de rendimento de carcaça e porcentagem de órgãos também não tiveram diferenças estatísticas. Na análise de escore de empenamento não houve diferenças, já na porcentagem de penas, os tratamentos que combinaram as duas fontes de colina obtiveram maior porcentagem de penas. Em relação as análises histopatológicas e avaliações de problemas locomotores não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Na análise de bioquímica sérica, o tratamento com uso de somente colina vegetal diminuiu os níveis de colesterol e LDL aos 21 dias, e de LDL aos 42 dias, não apresentando diferenças significativas para os demais parâmetros avaliados (enzimas FA, GGT e AST e triglicérides, HDL e VLDL). Conclui-se que a fonte vegetal de colina pode substituir o integralmente o cloreto de colina em dietas de frangos de corte, sem prejudicar o desempenho e diminuindo os níveis circulantes de LDL.

**Palavras chave:** avicultura, empenamento, metabolismo lipídico, nutrição.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess a vegetal source of choline as a replacement of choline chloride and its effects in the animal performance, metabolism and yield of broilers' carcass. 1120 one day old male Cobb were used, distributed in four treatments with eight repetitions of 35 birds per unit. The treatments were: 1 - control (choline in the form of choline chloride 60%), 2 – 75% of choline chloride and 25% of vegetal choline (*Choline-H*) as a source of choline, 3 – 50% of choline chloride and 50% of vegetal choline (*Choline-H*) as a source of choline, and 4 – 100% of vegetal choline (*Choline-H*) as a source of choline. The animals' performance was evaluated (weight gain, feed consumption, feed conversion, viability and uniformity), carcass and cuts yield, feathering patterns, serum biochemical profile, liver and locomotor system health, chest muscular anomalies, and zones of growth of the proximal epiphysis of the broilers' tibias. There were no significant differences in the evaluation of broilers' performance (weight gain, feed consumption, feed conversion, and viability) in none of the assessed phases (7, 21, 35 and 42 days). The treatment with 100% of vegetal choline provided greater uniformity of the broilers after 35 days to the carcass yield and the percentage of organs also showed no statistical differences. In the feathering score analysis, no difference was found. However, in the percentage of feathers, the treatment combining the two sources of choline had higher percentage of feathers. For the histopathological analysis and the evaluation of locomotor problems, there were no significant differences between treatments. In the serum biochemical analysis, the treatment using only vegetal choline lowered the levels of LDL and cholesterol in 21 days and of LDL in 42 days, not showing any other significant differences to the other assessed parameters (AF, GGT and AST enzymes, triglycerides, HDL and VLDL). It was concluded that the vegetal source of choline can replace choline chloride as a whole in the diet of broilers, without loss of performance and lowering the levels of circulating LDL.

**Keywords:** aviculture, feathering, lipid metabolism, nutrition.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje o maior exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor mundial, alcançando um montante de 13,7 milhões de toneladas produzidas no ano de 2020, com grande perspectiva de aumento de consumo interno que aumentou de 41,1 para 43,9 kg por habitante de 2016 para 2020<sup>1</sup>. Junto com esse aumento na produção e no consumo, o setor vem enfrentando um constante desafio, o aumento dos custos, principalmente alimentação, o aumento acumulado do ano de 2020 segundo a ICPFrango<sup>2</sup> da Embrapa foi de 33,02%, compondo 73,76% dos custos de produção.

Em decorrência dos aumentos constantes nos custos de produção do frango de corte, altamente impactado pela alimentação, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de encontrar alternativas nutricionais para reduzir os custos sem que ocorra a perda no desempenho zootécnico dos animais. Com esses avanços nas pesquisas em nutrição de frangos de corte, muitos ingredientes começaram a ser pesquisados, principalmente em relação ao uso de aditivos e nutrientes específicos com o objetivo de reduzir despesas e os impactos ambientais da produção<sup>3</sup>. Nesse cenário, pesquisas como o uso de diversos aditivos que potencializariam o desempenho do animal, seja de forma a melhorar a absorção de nutrientes, saúde intestinal e metabolismo vêm ganhando destaque.

A colina é um nutriente essencial para frangos de corte, responsável por diversas funções no organismo animal, como por exemplo: metabolismo lipídico, constituinte de membranas e precursor de neurotransmissores<sup>4</sup>. A colina está também ligada ao metabolismo do colesterol, podendo atuar na diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo em aves<sup>6</sup>.

A colina também é importante para o sistema locomotor, e sua deficiência no organismo animal traz como primeiro sinal a perose (enfermidade nutricional dos membros locomotores das aves), por sua atuação na maturação da cartilagem óssea<sup>7</sup>. Por suas funções e por ter sua produção endógena insuficiente nas primeiras semanas de vida nos frangos, a colina é um nutriente essencial para os frangos, e sua suplementação na dieta é fundamental. A maioria das empresas avícolas suplementam esse nutriente nas rações sendo que as recomendações de suplementação de colina em dietas de frangos podem chegar em até 2.000g por tonelada de ração.

A fonte de colina utilizada mais comumente nas dietas de aves é o cloreto de colina, um composto sintético que por sua alta higroscopicidade dificultam sua manipulação, o armazenamento e diminui o prazo de validade da matéria prima. Devido a esses problemas

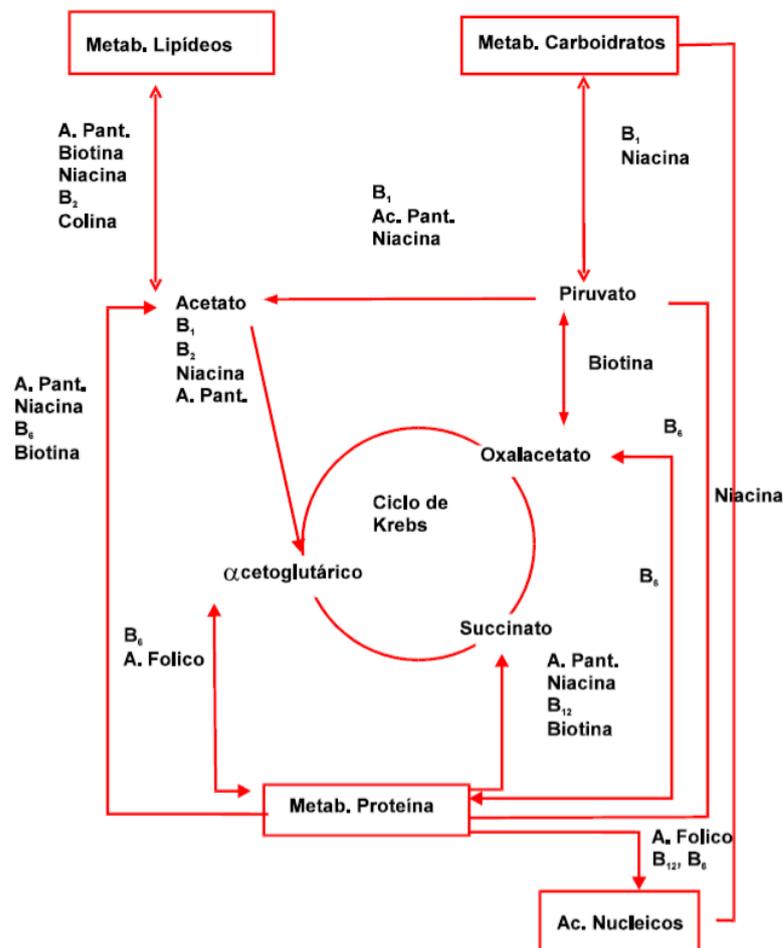
práticos na utilização do cloreto de colina nas dietas, fontes alternativas desse nutriente vêm sendo pesquisadas. Com isso vem ganhando evidência nos últimos anos o uso de fontes de origem vegetal, que são uma combinação de diversos tipos plantas ricas em fosfatidilcolina, substância rica em colina que além de poder suprir as necessidades nutricionais de colina dos frangos de corte, atendem a uma elevada demanda do mercado por produtos mais naturais, ou seja, diminuição do uso de compostos sintéticos na produção.

Com base nesse cenário, o objetivo do presente trabalho foi estudar um novo produto fonte de colina vegetal para dietas de frangos de corte, com a determinação da efetividade do seu uso considerando diferentes níveis de substituição ao cloreto de colina em dietas de frangos de corte.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Colina

A colina é tradicionalmente classificada como uma vitamina hidrossolúvel, sendo que já foi classificada como uma vitamina integrante do complexo B (B4)<sup>8</sup>. As vitaminas hidrossolúveis possuem por principais características, serem solubilizadas em meio aquoso, e atuarem como coenzimas de reações metabólicas, atuando diretamente no ciclo de Krebs (Figura 1), e por isso são chamadas de vitaminas de manutenção<sup>5</sup>.



**Figura 1.** Resumo da atuação das vitaminas hidrossolúveis no metabolismo<sup>5</sup>.

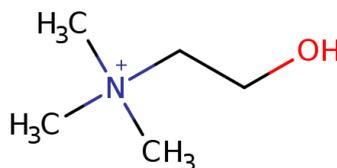
Como demonstrado na figura 1, a colina está intimamente ligada ao metabolismo lipídico, mas não atua como coenzima, e é requerida em quantidades muito superiores as demais vitaminas, tanto lipossolúveis quanto hidrossolúveis. A colina é essencial para a nutrição de aves, e pode ser sintetizada no fígado, diferente de outras vitaminas do complexo B, mas em

virtude de sua alta necessidade, é comumente suplementada, e sua deficiência pode causar esteatose hepática e problemas renais<sup>10</sup>.

Igwe et al.<sup>4</sup> descreveram as quatro principais funções da colina no organismo animal:

- Constituinte dos fosfolipídios presentes na membrana plasmática das células animais e organelas (microsomas e mitocôndrias), como parte da estrutura da lecitina (fosfatidilcolina). Essa substância é essencial para as membranas plasmáticas e para a boa maturação de cartilagens da matriz óssea<sup>11</sup>.
- Essencial para o metabolismo lipídico, prevenindo o acúmulo de gordura no fígado, transportando os lipídios na forma de lecitina.
- Componente essencial na formação de acetilcolina, neurotransmissor importantíssimo na transmissão dos impulsos nervosos do sistema nervoso parassimpático e simpático.
- Doador de grupos metil, após sua conversão no fígado em betaína, atuando a partir daí em diversas reações no organismo, como na conversão da homocisteína em metionina<sup>12</sup>.

A colina pura (hidróxido de [beta-hidroxi-etil-trimetil]-amônio) é um líquido incolor, viscoso e fortemente alcalino e altamente higroscópico. É solúvel em água, formaldeído e álcool e não possui ponto de fusão ou ebulição definido<sup>13</sup>. Sendo uma molécula bastante simples, como pode-se observar na figura 2.



**Figura 2.** Estrutura molecular da colina<sup>14</sup>

A absorção da colina é feita por meio de partículas em micelas, e absorvidas pelos enterócitos do duodeno e jejuno, no intestino delgado. A colina livre é absorvida via difusão passiva na mesma região, dependendo de carreadores, quando em baixas quantidades no lúmen intestinal. Em grandes quantidades perde eficiência, e grande parte é catabolizada pela microbiota intestinal gerando um produto (trimetilamina) que é absorvido e excretado pelo

organismo junto com a urina. Após a absorção, a colina é transportada pelos enterócitos até ser incorporada em lipoproteínas de alta densidade (HDL) e o transporte se dá pelo sistema porta onde é levada ao fígado, local de maior atuação da colina<sup>15</sup>.

As exigências de colina variam conforme a idade das aves, como é menor a capacidade de síntese nos pintos ou pintainhos, é nas fases iniciais que temos a maior suplementação de colina na dieta, sendo de 1.300, 1.000 e 750 mg.kg<sup>-1</sup> de colina nas semanas 1 a 3, 3 a 5 e 6 a 8 respectivamente, segundo o NRC<sup>16</sup> e de 550, 496, 392, 320 e 287 mg.kg<sup>-1</sup> nas cinco primeiras semanas de vida, respectivamente, segundo as Tabelas Brasileiras de Nutrição de Aves e Suínos<sup>17</sup>. Em pesquisas a variação dos níveis de colina utilizados é ainda maior, o que torna ainda mais difícil aferir com precisão a exigência de colina.

Com o passar da idade das aves as necessidades de colina diminuem, já que a com o crescimento dos pintos aumenta-se a eficiência na síntese de colina, sendo que a partir de oito semanas já não é possível visualizar efeitos de deficiência de colina nas aves, como em frangos de corte o ciclo de vida não atinge essa idade a colina é suplementada em todas as fases. Isto ocorre a partir da metilação do aminoetanol ao metilaminoetanol, que parece ser o limitador na biossíntese de colina para aves jovens<sup>15,18</sup>.

Swain e Johri<sup>19</sup> avaliando a suplementação de colina em frangos de corte após seis semanas de idade concluíram que essa suplementação não é mais necessária, e corrobora com o já citado por Igwe et al.<sup>4</sup> e Saeed et al.<sup>18</sup>. Arguello<sup>20</sup> fez um estudo com níveis de colina para poedeiras verificou que não se suplementando colina se obteve a mesma produtividade (taxa de postura, conversão alimentar e peso dos ovos) da utilização, tendo utilizado uma dose máxima de 320 mg.kg<sup>-1</sup>.

A colina tem relação metabólica em comum com a metionina. A metionina é um aminoácido sulfuroso, fundamental para o metabolismo e estrutura proteínas nas aves, tendo entre suas diversas funções (constituente de diversas proteínas no organismo), ser o principal constituinte da queratina (proteína constituinte das penas), fazendo da metionina o principal aminoácido para as aves. A relação da metionina com a colina está ligada a ambas substâncias serem doadoras de grupamentos metil. A colina pode ser adicionada na dieta de frangos como fornecedor de grupos metil, o que poupa metionina nessa função, mas não necessariamente supre os requerimentos básicos de metionina pelas aves, o que é corriqueiramente pesquisado<sup>18</sup>.

Como a molécula de colina possui três grupos metil (Figura 2) é uma fonte prontamente ativa para as reações de metilação, e isso permite a síntese de compostos chave no metabolismo proteico e energético, como metionina, carnitina, fosfatidilcolina e creatina<sup>21,22</sup>. Sendo que há autores que sugerem uma relação inversamente proporcional, enquanto outros

citam que não há essa relação, sendo que na formulação de dietas vê-se que não se leva em consideração que tenha alguma relação entre colina e metionina<sup>20,23</sup>.

Sharma e Ranjan<sup>6</sup> utilizaram uma dosagem de 500 mg.kg<sup>-1</sup> de colina como dosagem utilizada na Índia para frangos de corte de um à 42 dias. Lima et al.<sup>23</sup>, utilizaram diferentes níveis de colina e metionina para frangos de corte de 1 a 21 dias recomendando 62,535 mg.ave<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, em pesquisa conduzida no Brasil. Farina et al.<sup>24</sup> em seu experimento recomendaram 778, 632, e 645 mg.kg<sup>-1</sup> para as seguintes fases de 1 a 7, 1 a 35, e 1 a 42 dias de idade, respectivamente.

Calderano et al.<sup>25</sup> testaram diferentes níveis de duas fontes de colina, o cloreto de colina e uma fonte vegetal, e recomendaram uma dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup> da fonte vegetal de 1 a 42 dias, bastante inferior aos níveis comumente utilizados, entretanto não cita a quantidade de colina presente na fonte. Demattê Filho et al.<sup>26</sup> estudaram a substituição da fonte sintética pela fonte vegetal, e conseguiram os mesmos resultados de desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, peso médio e mortalidade), eficiência produtiva e custos produtivos com ambas fontes de colina.

Essa diferença das recomendações de colina dão uma complexidade a mais quando se trabalha com esse nutriente, e é algo comum entre todos os micronutrientes, ou seja, vitaminas e minerais. Para isso é importante além de conhecer as exigências utilizadas, as fontes disponíveis e utilizadas no mercado e assim definir qual utilizar na dieta.

## 2.2 Fontes de Colina

A colina é encontrada em praticamente todos os ingredientes utilizados na formulação de rações de aves, sendo as fontes proteicas de origem animal mais ricas nesta vitamina<sup>21</sup>. O milho e o farelo de soja possuem 1500 e 2700 mg.kg<sup>-1</sup> de colina com biodisponibilidade que varia de 60 a 75%<sup>5</sup>. Já as farinhas de origem animal, possuem colina com biodisponibilidade acima de 90%. As farinhas de carne e ossos e de peixe contém 1950 e 3500 mg.kg<sup>-1</sup> de colina<sup>5</sup>.

As fontes mais tradicionalmente utilizadas na suplementação de colina para frangos de corte e poedeiras são as fontes sintéticas, mais precisamente o cloreto de colina. O cloreto de colina é um sal quaternário de amônio [ (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>OH)-Cl; CAS 67-48-1], que possui alguns problemas na sua administração (higroscopicidade), mas mesmo assim é a mais utilizada fonte de colina, por já ter muitos estudos que comprovam sua eficácia. O cloreto de colina é sintetizado a partir da reação do metanol e amoníaco, que resulta em trimetilamina e reage

posteriormente com óxido de etileno para se obter a colina. O cloreto de colina se obtém mediante a reação da colina com o HCl<sup>27</sup>.

O cloreto de colina é altamente higroscópico, e em contato com outros nutrientes higroscópicos, havendo relatos de aumento de perdas de nutrientes por conta dessa característica, principalmente na armazenagem.

No trato gastrointestinal das aves o cloreto de colina forma a trimetilamina a partir da metabolização pela microflora. Essa substância em grandes quantidades causa uma síndrome chamada “síndrome de odor de peixe” ou Trimetilaminúria, que é mais comum em humanos, e causa um odor corporal semelhante ao de peixe podre<sup>27</sup>. O conteúdo máximo de trimetilamina deve ser inferior a 200 a 300 mg/kg, sendo esse outro limitante no uso de cloreto de colina. O cloreto de colina é comercializado em quatro formas, com diferentes níveis de colina, e estão descritas na Tabela 1<sup>28,29</sup>.

Tabela 1. Valores nutricionais dos diferentes tipos de cloreto de colina

<b>Cloreto de Colina (%)</b>	75%	70%	50%	50%
<b>Forma/Apresentação</b>	Líquida	Sólida	Sólida	Sólida/ Mineral
<b>Umidade (%)</b>	25,0	2,0	2,5	12,0
<b>Equivalente em colina (%)</b>	65,0	52,0	43,0	43,0
<b>Cl (%)</b>	19,0	15,0	12,5	12,5
<b>N (%)</b>	7,5	6,0	5,0	5,0

Fonte: adaptado FEDNA<sup>27</sup>

Outras fontes de colina muito pesquisadas para utilização na nutrição animal são as fontes vegetais. Em geral, os vegetais possuem de 60 a 75% de biodisponibilidade da colina, o milho por exemplo, possui 1.500mg.kg<sup>-1</sup> sendo aproveitado no máximo 1.200mg.kg<sup>-1</sup>, o que para muitas espécies já é suficiente, sendo que somente em aves, devido ao alto requerimento nas primeiras semanas de vida e deficiência na produção endógena de colina nessas primeiras semanas, ocorre a necessidade de suplementação.

No mercado já existem diversos produtos de origem vegetal com finalidade de substituir o cloreto de colina, e esses produtos têm sido motivos de vários projetos de pesquisa. Demattê Filho et al.<sup>26</sup> estudaram suplementação alternativa de colina e metionina para frangos orgânicos, e verificaram que o uso da fonte vegetal de colina foi suficiente para manter os mesmos níveis de ganho de peso, conversão alimentar e índice de eficiência produtiva que a fonte tradicional (cloreto de colina). No caso a fonte vegetal de metionina promoveu decréscimo de ganho de peso.

Os usos de fontes vegetais de colina também mostraram que além de sua eficiência na substituição há possibilidade de diminuição dos níveis utilizados se comparado com o cloreto de colina. Calderano et al.<sup>25</sup> obtiveram com níveis oito vezes menores de colina vegetal os mesmos desempenhos que cloreto de colina, ou seja, usando  $100\text{mg.kg}^{-1}$  de colina vegetal conseguiu um desempenho de 2265,6 kg de peso final, enquanto usando  $800\text{mg.kg}^{-1}$  de cloreto de colina 60% conseguiu 2274,8 kg de peso final, resultado que pode ser relacionado a maior biodisponibilidade e melhor aproveitamento da fonte vegetal de colina no organismo dos frangos. Sharma e Ranjan<sup>6</sup> testando uma fonte vegetal de colina em comparação com o cloreto de colina encontraram além de uma melhora no ganho de peso dos frangos até 21 dias de vida, como também a diminuição dos níveis de colesterol e triglicérides das aves.

As fontes de alimento de origem animal possuem colina altamente biodisponível, que ultrapassam 90% de biodisponibilidade. Mesmo com esse alto nível de biodisponibilidade da colina presente, essas fontes não são comumente exploradas com finalidade de fornecer colina aos animais. Alguns fatores influenciam a não utilização dessas matérias primas, como por exemplo: custo, níveis de inclusão na dieta e armazenamento.

A farinha de carne e ossos, por exemplo, é rica em cálcio e fosforo, fator que interfere diretamente em sua inclusão, que é bastante reduzida. Além disso, há uma enorme heterogeneidade dessa farinha no mercado, tanto no conteúdo proteico, quanto mineral e energético. Algumas farinhas de carne e carne e ossos contêm quantidade grande de lipídios, e acelera o processo de rancificação.

### 2.2.1 Fontes de Colina Vegetal

A colina é comumente suplementada na dieta na forma de cloreto de colina. Esse produto é altamente higroscópico, sendo por essa característica altamente susceptível a perdas nas rações, por conta do alto potencial de ocorrer reações com a água presente nos demais ingredientes das rações<sup>24</sup>. Visto essa característica, diversas fontes alternativas desse nutriente vêm sendo pesquisadas.

Farina et al.<sup>24</sup> trabalharam com duas fontes de colina (cloreto de colina e uma colina vegetal) e em sua pesquisa sugeriu os seguintes níveis de colina:  $304\text{mg.kg}^{-1}$  para a fase inicial,  $249\text{mg.kg}^{-1}$  no crescimento e  $243\text{mg.kg}^{-1}$  na fase final. Sendo que no seu estudo, os níveis de utilização da fonte vegetal foram a metade do cloreto de colina, e obteve-se resultados semelhantes.

Também há o trabalho de Calderano et al.<sup>25</sup> que sugere uma dosagem de 100mg.kg<sup>-1</sup> de colina vegetal para todas as fases. Esses trabalhos com colina vegetal vêm demonstrando a eficiência dessa forma de fornecimento de colina, e já é utilizada comercialmente no Brasil. Como já foi citado, a colina vegetal não tem os problemas de higroscopicidade, e não é reativa como o cloreto de colina com outros componentes presentes nas rações.

Essas fontes de colina pesquisadas vêm justamente para resolver o problema que atinge o cloreto de colina, o perfil higroscópico do material, que pode levar a perdas desse ingrediente. Fontes vegetais são as mais pesquisadas, vista a maior facilidade de obtenção e conservação, sendo que algumas plantas já obtiveram sucesso nessa substituição, como a *Trachyspermum amni*, *Citrullus colocynthis*, *Achyranthus áspera*, *Azadirachta indica* e *Glycine max*, variando de 30 a mais de 2.000mg de colina por kg de alimento. As fontes naturais de colina, com maior disponibilidade do nutriente são de origem animal, que passam de 80% de disponibilidade, mas as fontes vegetais têm bastante similaridade com a forma sintética na questão da disponibilidade (60 a 90%)<sup>30</sup>.

Em pesquisas que avaliaram a substituição do Cloreto de Colina por uma fonte vegetal vem demonstrando bons resultados dessa substituição, Demattê Filho et al.<sup>26</sup> utilizando uma fonte de colina vegetal (*Biocholine Powder*<sup>®</sup>) com 60% de disponibilidade, contataram os mesmos resultados produtivos que o uso do Cloreto de Colina. Calderano et al.<sup>25</sup> comparando diversos níveis de cloreto de colina com diferentes níveis de uma fonte vegetal de colina (*Biocholine*<sup>®</sup>) em dietas para frangos de corte de 1 a 21 dias, constaram que a fonte de colina vegetal obteve resultados semelhantes ao do cloreto de colina analisando o desempenho dos animais em doses seis vezes menores (600mg de cloreto de colina para 100mg de colina vegetal).

Sharma e Ranjan<sup>6</sup> avaliaram o efeito de uma fonte vegetal de colina e uma sintética em frangos de corte, verificaram que as fontes vegetais de colina são eficientes e podem substituir a fonte sintética de colina, promovendo um ganho de peso quase 200g superior ao da sintética, além de diminuir colesterol e triglicérides, de 119,1 mg.dL<sup>-1</sup> e 94,9 mg.dL<sup>-1</sup> usando a fonte sintética e 114,73 mg.dL<sup>-1</sup> e 74,30 mg.dL<sup>-1</sup> na fonte vegetal respectivamente. Esses resultados também demonstram a eficiência das fontes vegetais de colina no metabolismo de lipídios.

Com base na literatura pesquisada, é possível prever que as fontes vegetais de colina possuem um grande potencial de uso no sistema produtivo. Esses estudos demonstram não haver sinais de deficiência ou outros problemas no uso das fontes alternativas. Para afirmar isso

no presente estudo é fundamental compreender os possíveis sinais de deficiência de colina em frangos de corte.

### **2.3 Utilização de colina em dietas de frangos de corte**

Atualmente, existe uma série de pesquisas com colina no mundo e estas podem ser divididas em três seguimentos: níveis nutricionais, diminuição da suplementação de metionina com aumento do uso de colina e fontes vegetais de colina.

Colina e metionina possuem uma relação metabólica já bastante esclarecida, pois junto com a betaína são as principais moléculas doadoras de grupamentos metil. Devido a essa relação há uma linha de pesquisa que estuda a possibilidade de diminuição da suplementação de metionina com o uso de maiores níveis de colina, visando suprir essa função de doação de grupos metil utilizando a colina, considerando que essa suplementação poupa metionina para essa função e possibilita o direcionamento da metionina para a síntese proteica<sup>21,23</sup>. Quillin et al.<sup>31</sup> descrevem que se pode diminuir a metionina na dieta se aumentar a suplementação de colina, ou seja, há uma relação inversamente proporcional entre colina e metionina. Miles et al.<sup>32</sup>, Pourreza e Smith<sup>33</sup> consideram que conforme há o aumento de colina na dieta, deve-se aumentar os níveis de metionina, e que a colina não consegue suprir as necessidades de metionina. Nesses trabalhos mais clássicos acerca desse tema possuem resultados mais controversos.

Em pesquisa mais recente, Lima et al.<sup>23</sup> foi avaliada essa relação utilizando dois níveis de metionina (0,593 e 0,440 mg.kg<sup>-1</sup>) e seis níveis de colina (390, 715, 1.040, 1.365, 1.690 e 2.015 mg.kg<sup>-1</sup>) em frangos de corte de 1 a 21 dias. Conforme Lima et al.<sup>23</sup> os melhores resultados de desempenho dos frangos foram obtidos com o nível mais alto de ambos nutrientes, a redução de metionina limitou em aproximadamente 10% o ganho de peso das aves. Com níveis de 390 mg.kg<sup>-1</sup> de colina verificaram-se problemas locomotores nas aves a partir de 5 dias de vida, chegando a 100% das aves aos 21 dias, o que comprometeu diretamente o consumo de ração e ganho de peso. Repetto et al.<sup>34</sup> estudaram os efeitos da deficiência de colina verificou que a deficiência causa danos severos a diversos tecidos, causando necrose e morte celular. Esses problemas são muito visíveis no tecido nervoso, hepático e cardíaco.

Waldroup et al.<sup>35</sup> avaliaram os efeitos da redução de metionina com a suplementação de colina e betaína, e em seu trabalho demonstrou que a redução em 10% os níveis de metionina na dieta, não compromete o ganho de peso das aves, sem necessidade de suplementar, mas com a suplementação ele conseguiu melhorar a conversão alimentar e rendimento de peito, os níveis

de suplementação utilizados foram de  $1.000 \text{ mg.kg}^{-1}$  de colina ou betaína, ou a combinação de ambos ( $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  de cada). Esses e a grande parte dos trabalhos mais atuais relacionando os níveis de suplementação de metionina com colina vêm demonstrando melhores efeitos da suplementação de colina que de diminuição de metionina, e mesmo aumentando muito os níveis de colina o organismo ainda mantém os níveis de metionina como os já utilizados.

Vale salientar que tanto os níveis de suplementação e as fontes de colina são muito variados, e isso dificulta em muito a comparação entre os diversos trabalhos encontrados na literatura, principalmente trabalhos ligados a funções da colina compartilhadas com outros nutrientes, como a metionina e a betaína.

## 2.5 Deficiência de colina

A não suplementação de colina pode acarretar diversos problemas no desenvolvimento das aves, dependendo da quantidade que a dieta (principais ingredientes, como o milho e a soja) é capaz de fornecer. Os principais problemas decorrentes da deficiência de colina são a esteatose hepática e a perose<sup>7</sup>.

### 2.5.1. Problemas Locomotores

O principal problema locomotor que pode ser acarretado pela deficiência de colina é a perose ou discondroplasia tibial. A discondroplasia tibial é uma lesão comum na zona de crescimento ósseo em frangos caracterizada pela persistência de uma massa cartilaginosa anormal na região da metáfise, imediatamente abaixo da zona ou placa de crescimento<sup>36</sup>.

A etiologia dessa patologia não está bem esclarecida, e pode decorrer de problemas genéticos, nutricionais ou manejo<sup>37</sup>. Segundo Lima<sup>7</sup> um dos primeiros sinais de deficiência de colina, junto ao decréscimo produtivo é a discondroplasia. Como ocorre esse crescimento anormal da cartilagem, as aves passam a ter dificuldades locomotoras que rapidamente evoluem devido ao rápido crescimento dos frangos, e a deficiência de colina contribui para isso, visto que ela é fundamental para a boa maturação da cartilagem óssea<sup>8</sup>.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para avaliar a presença de problemas locomotores. Com o animal ainda vivo, podemos destacar a análise de locomoção e conformidade, como a avaliação do *Gait Score* e da ocorrência de deformidades *valgus* e *varus*<sup>38</sup>. No pós-morte, pode ser avaliada a presença do “plugue” cartilaginoso (crescimento anormal de cartilagem), e a área das zonas de crescimento ósseo.

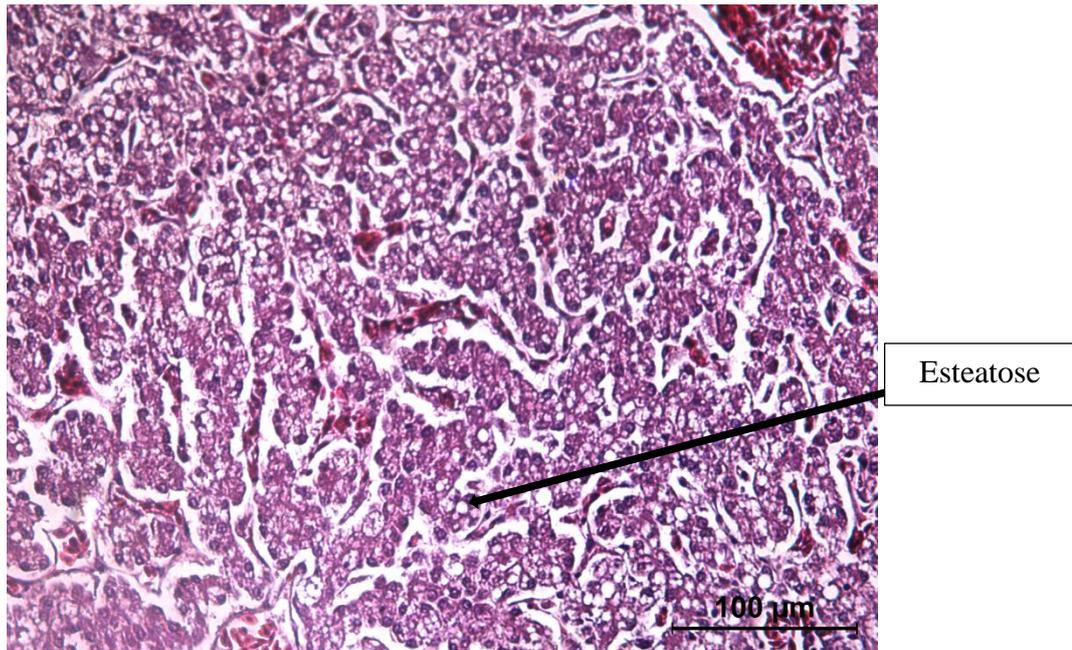
O *Gait Score* é uma técnica de análise de problemas locomotores e indiretamente de bem-estar em frangos de corte. Essa técnica consiste na análise do caminhar das aves, sobre a superfície do aviário (cama), em que o caminhar das aves é estimulado, e delimitado o escore<sup>38</sup>.

A metodologia de Dawkins et al.<sup>39</sup> define três diferentes escore, sendo o escore 0 (considerado caminhar normal), 1 (aves com pequenas dificuldades no caminhar) e 2 (aves com severas dificuldades no andar). Já Kestin et al.<sup>40</sup> definiram cinco escores sendo 1 (normal), 2 (dificuldade de caminhar identificável, mas nada que comprometa a qualidade de vida da ave), 3 (maior dificuldade no andar, com menor velocidade e dificuldade que compromete a qualidade de vida da ave), 4 (ave com severa dificuldade de andar, que se movimenta apenas com estímulo e velocidade e qualidade de vida extremamente prejudicada) e 5 (ave incapacitada de se locomover até com estímulo, locomoção extremamente prejudicada e com auxílio das asas). Dawkins et al.<sup>39</sup> também citam outras análises que podem ser feitas para analisar a problemas locomotores e bem-estar, como a pododermatite (edema nos pés, região plantar) e *hockburn* (edema nas anterior das pernas, no jarrete). Essas análises identificam lesões nas pernas das aves, que são resultantes de dificuldades locomotoras e como a discondroplasia tibial, junto com problemas de qualidade de cama, são análises muito utilizadas para determinação de bem-estar em frangos de corte.

### 2.5.2. Esteatose hepática

A colina tem fundamental importância no metabolismo lipídico no fígado, devido ao fato ser componente dos fosfolipídios (fosfatidilcolina), que compõem a membrana dos transportadores de lipídios do organismo (LDL, HDL e VLDL)<sup>11,41</sup>. Sendo assim, em caso de deficiência de colina no organismo, aumenta-se do conteúdo lipídico no tecido hepático, que em altas quantidades gera a esteatose hepática.

A esteatose hepática é definida pelo aspecto visual do fígado, em que ocorre uma mudança da cor normal do órgão, que fica pálido ou amarelado<sup>42</sup>. Essa característica pode ser resultante de diversas alterações sistêmicas, como a presença de enfermidades das aves, toxinas e também um acúmulo de gordura, caracterizada pela presença de vacúolos de lipídios no tecido hepático<sup>42,43</sup>.



**Figura 3.** Fotomicrografia do fígado de frango de corte aos 42 dias de idade com acúmulo de gordura. Fonte: arquivo pessoal.

## 2.6 Anomalias musculares peitorais

Com o desenvolvimento genético na avicultura, conseguiu-se melhorar os índices produtivos. Segundo Rodrigues e Filho<sup>3</sup> de 1980 a 2010 houve um aumento no ganho de peso de 2,2 kg por ave para 2,8 kg por ave, e uma redução de 50 para 42 dias para se alcançar o peso de abate. A conversão alimentar reduziu de 2,00 para 1,65. Os avanços foram obtidos nos parâmetros zootécnicos fizeram com que a avicultura alcançasse o patamar produtivo visto hoje em dia. Por meio do intenso melhoramento genético, houve possibilidade da criação de linhagens genéticas especializadas em rápido crescimento, resultando em carcaças mais pesadas, com baixa deposição de gordura e excelente rendimento muscular<sup>44</sup>.

Contudo, junto a essa característica, vieram alguns problemas, que variam desde problemas locomotores, como um aumento acentuado em casos de discondroplasia tibial, a alterações físicas e organolépticas na carne também chamadas de miopatias (qualquer alteração das fibras musculares). As principais anomalias musculares peitorais encontradas são *wooden breast* (peito amadeirado), *white striping* (estrias brancas) e o *spaghetti meat*, que acometem o músculo peitoral maior (*Pectoralis major*)<sup>44,45</sup>.

O *Wooden Breast* ou peito amadeirado é uma anomalia peitoral que está relacionada a qualidade de carne de peito, sendo caracterizada pela alteração visual (palidez do tecido peitoral), revestimento viscoso turvo e pela alteração física, definida pela maior rigidez do

tecido. Essa alteração ocorre a partir da terceira semana e é caracterizada histopatologicamente por uma necrose e fibrose (acúmulo de tecido conectivo) do tecido muscular e maior presença de células inflamatórias<sup>44,45</sup>.

A *White striping* ou estrias brancas é caracterizada pela presença de estrias brancas visíveis e paralelas no músculo peitoral maior e pode acometer outros cortes, como as coxas e sobrecoxas. Ela é caracterizada por uma alta degeneração muscular, necrose, fibrose e acúmulo de gordura (lipidose) nas fibras da carne, surgindo mais tardiamente na carcaça se comparado com o peito amadeirado e mais presente em machos<sup>45</sup>.

Já a *spaghetti meat* ou carne desestruturada é a anomalia peitoral mais recente relatada pela indústria. Se caracteriza pela lesão interna do músculo peitoral maior, além de uma alteração física na carne, que fica mole e com fibras que se desprendem facilmente, aspecto desfiado<sup>45</sup>. Histopatologicamente o *spaghetti meat* pode ser caracterizada por uma alta degradação das fibras musculares e um maior espaço intercelular.

A causa desses problemas ainda não é totalmente elucidada, mas há diversas teorias, como por exemplo a baixa vascularização, que ocasiona melhor oxigenação, levando a necrose muscular; o estresse oxidativo, em que leva a degeneração e regeneração celular, com deposição de colágeno<sup>45</sup>. Outra teoria é o aumento do diâmetro das fibras musculares, menor relação capilar-fibra, o aumento da distância entre os capilares e diminuição da taxa de degradação proteica, que levou ao surgimento desses problemas<sup>46</sup>. Mutryn et al.<sup>47</sup> estudaram sequenciamento de RNA relacionado ao desenvolvimento muscular peitoral e encontraram evidências de que a hipóxia localizada, estresse oxidativo, aumento do cálcio intracelular, bem como a possível troca do tipo de fibra muscular são as principais características presentes nos músculos peitorais com alguma anomalia.

Como a causa desses fatores ainda não é totalmente esclarecida, estudos com os mais variados propósitos vem sendo realizados e essas características avaliadas. Como a colina interfere diretamente no metabolismo lipídico, presume-se que possa haver alguma relação com a incidência dessas anomalias, principalmente as relacionadas com acúmulo de gordura no tecido muscular, como por exemplo, as estrias brancas.

### 3. MATERIAL E METODOS

#### 3.1. Local e Período de Realização

O experimento foi conduzido no Aviário Escola da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás em Goiânia, Goiás, durante os meses de março a maio de 2020. Todos os procedimentos neste estudo foram realizados conforme o Protocolo Registro CEUA/UFG nº 101/19. Devido a pandemia do coronavírus, todos os procedimentos de profilaxia e biossegurança foram observados pela equipe de colaboradores do projeto de pesquisa. A realização do projeto de pesquisa foi devidamente autorizada pela direção da EVZ.

#### 3.2. Aves e Instalações

Foram utilizados 1.120 pintos de corte machos, da linhagem comercial Cobb 500<sup>®</sup> com um dia de idade, e peso inicial médio de 42 g, provenientes de um incubatório comercial (São Salvador Alimentos S/A, Itaberaí, Goiás, Brasil).

Foram alojados em 32 boxes de tubos de PVC e telados, medindo 1,80 L x 1,60 C (2,88 m<sup>2</sup>), montados na área central de um galpão comercial com 12 m L x 125 m C (1500 m<sup>2</sup>). Galpão do tipo pressão negativa com sete exaustores, sistema de nebulização, entrada de ar com placa evaporativa e foram alojadas em uma cama nova de palha de arroz. As muretas laterais de alvenaria de 0,60 m e tela de arame de 2,80 m de altura, pé direito de 3,20 m e orientação leste-oeste. A densidade de alojamento em cada boxe foi de 12 aves/m<sup>2</sup> (35 aves/boxe). Cada boxe contém uma linha de bebedouros do tipo *nipple* e um comedouro tubular infantil até o sétimo dia de idade e um adulto dos oito aos 42 dias de idade.

As aves foram vacinadas no incubatório contra as doenças de Marek e Bronquite Aviária, e contra a doença de Gumboro aos 14 dias de idade, via água de bebida. Em todo o período experimental, as aves receberam ração e água *ad libitum*, e foram criadas seguindo as recomendações de iluminação, temperatura, umidade e manejo do Guia de Manejo da Cobb-Vantress<sup>48</sup>. Também foram seguidas as boas práticas de bem-estar animal de acordo com o protocolo de bem-estar para frangos de corte da ABPA<sup>49</sup>.

### 3.3. Delineamento e Tratamentos experimentais

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 8 repetições, totalizando 32 unidades experimentais, com 35 aves cada. Os tratamentos do experimento foram:

- 1) controle (Colina na forma de Cloreto de Colina 60%);
- 2) 75% de cloreto de colina e 25% de colina vegetal (*Choline-H*) como fonte de colina;
- 3) 50% de cloreto de colina e 50% de colina vegetal (*Choline-H*) como fonte de colina;
- 4) 100% de colina vegetal (*Choline-H*) como fonte de colina.

As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja, utilizando níveis comerciais, para as respectivas fases de criação, pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 35 dias de idade) e final (36 a 42 dias). As dietas foram utilizadas na forma farelada, e estão dispostos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Descrição da quantidade utilizada das fontes de colina e inerte em cada um dos tratamentos experimentais.

<b>Tratamento</b>	<b>Cloreto de Colina (%)</b>	<b><i>Choline-H</i> (%)</b>	<b>Amido (%)</b>
Cl. Colina	0,1800	-	-
Cl. Colina + Ch-H (75/25)	0,0900	0,0300	0,0600
Cl. Colina + Ch-H (50/50)	0,0900	0,0600	0,0300
Colina Vegetal	-	0,1000	0,0800

Tabela 3. Dieta experimental utilizada nas fases pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias).

<b>Ingredientes</b>	<b>Pré-Inicial (%)</b>	<b>Inicial (%)</b>	<b>Crescimento (%)</b>	<b>Final (%)</b>
Milho	58,18	62,74	65,50	76,19
Farelo de soja	34,48	29,30	26,91	14,58
Farinha de vísceras	3,400	4,467	2,200	3,000
Farinha de carne e ossos	-	-	-	1,00
Farinha de penas	-	-	-	2,467
Gordura de aves	0,533	0,600	1,933	0,533
Calcário	1,241	1,091	1,233	0,860
Sal	0,319	0,309	0,336	0,280
Bicarbonato de sódio	0,081	0,007	-	-
Fosfato monocalcico	0,431	0,213	0,680	-
DL-Metionina	0,349	0,301	0,269	0,189
L-Lisina	0,390	0,367	0,393	0,519
L-Treonina	0,120	0,100	0,101	0,083
Enramicina	0,003	0,005	0,005	0,003
Nircabazina	-	0,050	-	-
Salinomicina	-	-	0,030	-
Adsorvente	0,180	0,150	0,120	-
Fitase (500 FTU)	0,015	0,015	0,011	0,014
Antioxidante	0,004	0,004	0,004	0,004
Premix vitamínico*	0,050	0,050	0,050	0,050
Premix mineral**	0,050	0,050	0,050	0,050
<b>Inerte +Colina</b>	<b>0,180</b>	<b>0,180</b>	<b>0,180</b>	<b>0,180</b>
	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>Níveis nutricionais</b>	<b>Pré-Inicial</b>	<b>Inicial</b>	<b>Crescimento</b>	<b>Final</b>
Energia metabolizável (kcal/kg)	3010,00	3080,00	3238,85	3267,73
Proteína bruta (%)	23,8382	22,4399	19,3745	18,3022
Arginina digestível (%)	1,3546	1,2526	1,0253	0,9331
Lisina digestível (%)	1,3280	1,2280	1,0570	0,9720
Metionina digestível (%)	0,6620	0,6042	0,4955	0,4289
Metionina + cistina digestível (%)	0,9827	0,9087	0,7843	0,7222
Treonina digestível (%)	0,8765	0,8105	0,6976	0,6415
Triptofano digestível (%)	0,2641	0,2429	0,1918	0,1689
Cálcio (%)	0,9600	0,9020	0,8343	0,8000
Fósforo disponível (%)	0,4683	0,4400	0,3973	0,3721
Sódio (%)	0,2200	0,2000	0,1900	0,1900
Balanço eletrolítico (mEq/kg)	246,5685	214,5057	169,7147	147,7665
Colina (ppm)	2000,00	1850,00	1650,00	1550,00
cálcio/fósforo disponível (%)	2,0500	2,0500	2,1000	2,1500

---

\*Suplemento vitamínico (PX Vitamínico Frango SSA), níveis de garantia Inicial: vit. A 220000000 UI/Kg; vit. D3 88000000 UI/Kg; vit. E 80000 UI/Kg; vit. K3 6000 mg/kg; vit. B1 5000 mg/Kg; vit. B2 15 g/Kg; vit. B6 8000 mg/Kg; vit. B12 40000 mcg/Kg; vit. B5 32 g/Kg; vit. B3 100 g/Kg; ácido fólico 3200mg/Kg; biotina 300 mg/Kg; selênio 1000 mg/Kg. Crescimento: vit. A 100000000 UI/Kg; vit. D3 40000000 UI/Kg; vit. E 50000 UI/Kg; vit. K3 6000 mg/kg; vit. B1 4000 mg/Kg; vit. B2 12 g/Kg; vit. B6 8000 mg/Kg; vit. B12 40000 mcg/Kg; vit. B5 37 g/Kg; vit. B3 36 g/Kg; ácido fólico 2000mg/Kg; biotina 200 mg/Kg; selênio 800 mg/Kg. Final: vit. A 100000000 UI/Kg; vit. D3 40000000 UI/Kg; vit. E 20000 UI/Kg; vit. K3 4000 mg/kg; vit. B1 3000 mg/Kg; vit. B2 8000 mg/Kg; vit. B6 4000 mg/Kg; vit. B12 20000 mcg/Kg; vit. B5 19 g/Kg; vit. B3 40 g/Kg; ácido fólico 1400mg/Kg; biotina 150 mg/Kg; selênio 500 mg/Kg.

\*\*Suplemento Mineral (PX Micro mineral Frango SSA), níveis de garantia: manganês 150g/kg; zinco 140 g/kg; ferro 100 g/kg; cobre 20 g/kg; iodo 2000 mg/kg.

### 3.4. Variáveis Analisadas

#### 3.4.1. Desempenho

As variáveis de desempenho zootécnico avaliadas foram: peso médio final, ganho de peso médio, consumo médio de ração, conversão alimentar, viabilidade criatória e uniformidade. Aos sete, 21, 35 e 42 dias de idade, registrando semanalmente peso das aves, ração ofertada e sobras, e diariamente a mortalidade.

O peso vivo médio foi obtido pesagem individual de cada ave do boxe em cada período experimental. O ganho de peso calculado pela diferença entre o peso final e peso inicial das aves. O consumo médio de ração pela diferença de peso da ração oferecida e a sobra resultante a cada período, dividido pelo número de aves no período. A conversão alimentar foi obtida a partir da razão entre o consumo médio de ração e do peso/ganho médio de peso das aves, corrigida pela mortalidade de acordo com Sakomura e Rostagno<sup>50</sup>.

A viabilidade criatória foi calculada como porcentagem das aves sobreviventes em relação ao número inicial de aves alojadas. A uniformidade foi calculada a partir da contagem de aves dentro do intervalo médio de peso de cada repetição, considerando uma variação de peso de 10% a mais e 10% a menos da média da parcela para determinar o intervalo de peso das aves consideradas uniformes nos boxes, o restante das aves foram consideradas desuniformes.

#### 3.4.2. Rendimento de Carcaça, Cortes e empenamento

Foi separada uma ave por repetição, totalizando 8 aves por tratamento, para o abate. As aves representavam o peso médio do boxe, com desvio padrão de 5% acima ou abaixo deste

valor. Cada ave foi pesada e identificada, permaneceu em jejum alimentar de oito horas, recebendo apenas água.

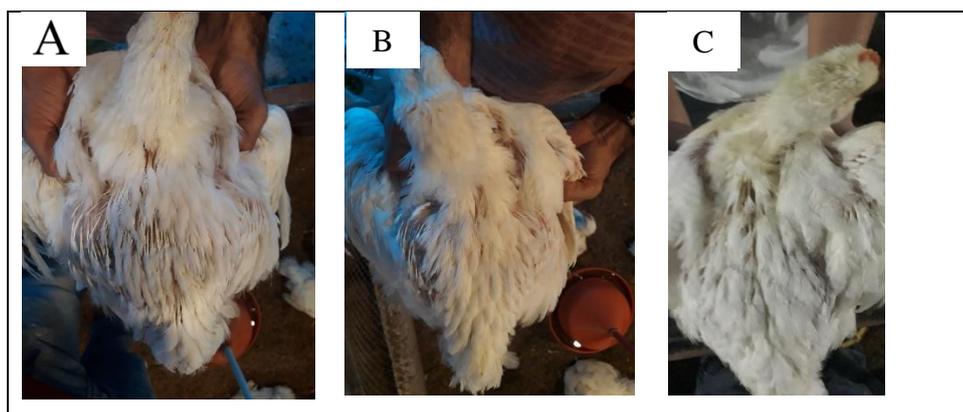
Após o período de jejum, as aves foram encaminhadas ao abatedouro experimental da Escola de Veterinária e Zootecnia, onde foram novamente pesadas e realizado o abate (atordoamento, sangria, escalda, depena e evisceração), sendo as mesmas foram retiradas da linha, pesadas novamente para realização do cálculo do rendimento de carcaça (sem pés, cabeça e pescoço), cortes (peito, coxas + sobrecoxas, asas e dorso), peso de penas e gordura abdominal.

#### 3.4.2.1. Empenamento

Para avaliação do empenamento foram utilizados dois métodos distintos, 1) o escore de visual de empenamento com 28 e 35 dias de experimento, e 2) a porcentagem de penas das aves abatidas aos 42 dias.

Para o escore de empenamento foi utilizada a metodologia que consistiu em selecionar aleatoriamente 10 aves de cinco repetições por tratamento, totalizando 50 aves por tratamento. Foi analisado visualmente o empenamento do dorso e penas de cada ave, e dado um escore de 1 a 5 de acordo com a figura 4, a partir da ave de pior empenamento para melhor empenamento.

Para a análise de empenamento foi utilizada a metodologia proposta por Garcia et al.<sup>51</sup> que consistiu em durante o abate experimental, pesar as aves pós sangria e pós depenagem. Assim, obtivemos a porcentagem de penas nas aves abatidas.





**Figura 4.** Escore de empenamento 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E).

### 3.4.3 Análise bioquímica sérica

Aos 21 e 42 dias de idade, 3,5 mL de sangue foram colhidos por punção cardíaca (em ambas idades) de uma ave por repetição, oito por tratamento, em tubo a vácuo sem anticoagulante e com gel separador de coágulo, para análises bioquímicas.

O perfil bioquímico incluiu a mensuração das lipoproteínas de alta densidade (HDL – *High Density Lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoprotein*), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL – *Very Low Density Lipoprotein*), colesterol total e triacilgliceróis; as enzimas aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). A dosagem destes foi feita seguindo-se a orientação recomendada pelo fabricante, utilizando kits analíticos comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

O colesterol e os triglicerídeos foram mensurados por reação enzimática com leitura em ponto final, pelo método enzimático Trinder, sendo catalisados pelas enzimas esterase oxidase e oxidase, respectivamente. O LDL foi determinado pela equação de Friedewald<sup>52</sup>, sendo o resultado da diferença entre o colesterol total e a soma do colesterol HDL e VLDL.

A enzima AST foi determinada pelo método cinético proposto pela *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*<sup>53</sup>. A enzima GGT pelo método cinético Szasz<sup>54</sup> modificado e a FA pelo método de Bowers e McComb<sup>55</sup> modificado.

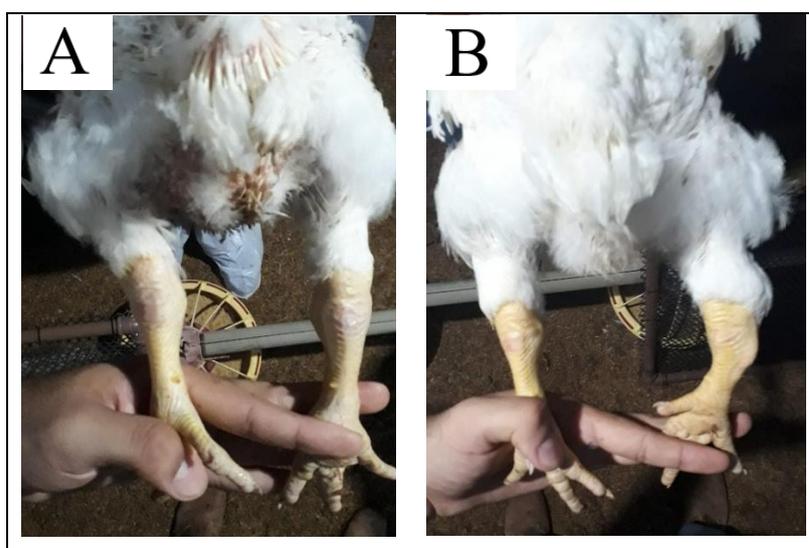
### 3.4.4. Análises de locomoção e lesões de pernas e pés

#### 3.4.4.1. *Gait Score* e *Valgus* e *Varus*

A análise de *Gait Score* foi feita aos 28 e 35 dias, sendo selecionadas 10 aves de cinco repetições por tratamento, totalizando 50 aves por tratamento. A metodologia utilizada foi a

proposta por Dawkins et al.<sup>39</sup>, que consiste em delimitar um percurso de 1 metro para as aves sobre a cama e analisar o andar, aferindo um escore de 0 a 2 (0 – normal, 1 – ligeira dificuldade na locomoção, 2 – severa dificuldade no andar).

A avaliação de *valgus* e *varus* foi feita simultaneamente a de *Gait Score* (28 e 35 dias), as aves foram pegas e as pernas esticadas, e conforme o ângulo formado foi definido a presença e ausência de desvio *valgus* ou *varus* em cada uma das pernas. Em caso de ângulo negativo da tíbia em relação ao terceiro dedo foi definido como *varus*, e o ângulo positivo como *valgus*<sup>56</sup>.



**Figura 5.** Avaliação de presença e ausência de lesão *valgus* (A) e *varus* (B).

#### 3.4.4.2. Pododermatite e Lesão de Jarrete (Hockburn)

A avaliação de pododermatite foi feita simultaneamente a de *Gait Score* e *valgus* e *varus* (28 e 35 dias), sendo observada a condição da almofada plantar de ambos os pés. Quando uma lesão era encontrada, seu diâmetro era medido por meio de uma regra de escala mm e o grau de severidade da lesão, e assim pontuado de acordo com uma escala de 0 a 3, da seguinte forma: o escore 0 (zero) correspondia a região plantar saudável; 1 (um) era equivalente a lesões com diâmetro de até 5 mm; e 2 (dois) para lesões com diâmetro maior que 5 mm; 3 (três) para lesões com diâmetro maior que 5 mm e com presença de ferida exposta<sup>56</sup>.

Para avaliação da lesão de jarrete, feita simultaneamente a de pododermatite, foi adotado critérios semelhantes aos de pododermatite. Foi utilizada uma escala de 0 a 3 conforme o tamanho da lesão no jarrete das aves, sendo 0 (zero) a ave sem lesão (normal), 1 (um) com lesão pequena; 2 (dois) com lesão grande sem presença de hemorragia; 3 (três) com lesão grande com presença de hemorragia.

### 3.4.5. Análises histológicas

Para a realização das análises histológicas, as 32 aves que foram selecionadas para abate tiveram fígado, peito e coxa e sobrecoxa separadas para coleta de amostras. Para o fígado foi feita a amostragem do órgão tomando cuidado de não perfurar a vesicular biliar e a amostra foi colocada em recipiente identificado contendo solução formol tamponado (10%) próprio para armazenamento e preservação do tecido até envio para a preparação das lâminas.

Para a análise histológica de tecido do musculo do peito (*Pectoral major*) foi realizada uma amostragem conforme a metodologia proposta por Soglia et al.<sup>57</sup>, no lado esquerdo do peito. Após isso, as amostras foram acondicionadas em recipientes identificados contendo formol para preservação do tecido até envio para a preparação das lâminas.

Para avaliação da incidência da discondroplasia tibial, foram feitas duas análises. Uma primeira análise foi visual, durante a amostragem para a confecção das lâminas histológicas, após a realização do corte transversal da tíbia (figura 6), sendo que foi dado escores de 0 a 3 seguindo metodologia de Rowland e Edwards<sup>58</sup>. Após a classificação, foram coletadas amostras e armazenadas em recipientes identificados contendo formol para preservação do tecido para envio para preparação das lâminas.



**Figura 6.** Avaliação do escore de lesão de discondroplasia tibial (imagens mostram o escore 0, sem presença de discondroplasia tibial).

Todos os tecidos coletados e armazenados foram enviados a um laboratório Prevenção (localizado na cidade de Goiânia, Goiás), especializado para a confecção de lâminas histológicas pelo método de hematoxilina-eosina. Posteriormente, as lâminas de fígado e peito

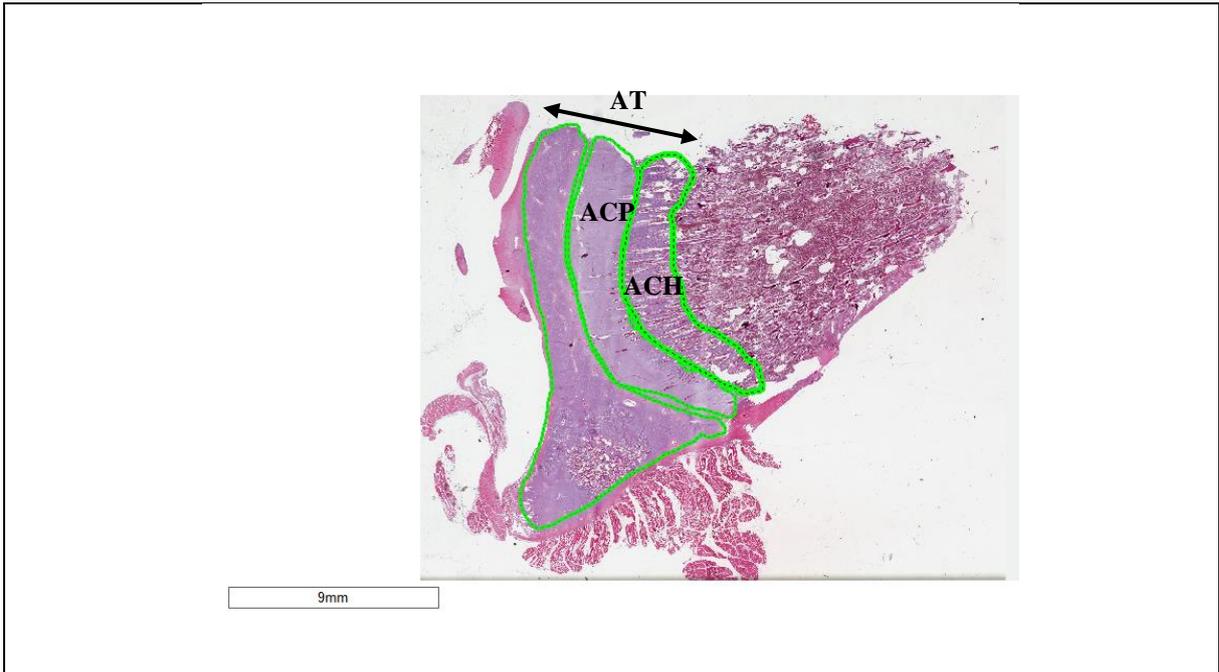
foram analisadas em microscópio no setor de patologia animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, e foram analisados diversos fatores e dados escores de 0 a 3 (0 – normal; 1 – discreta; 2 – moderada; 3 – acentuada).

Para a análise das lâminas de tecido hepático, foram analisadas as seguintes características: padrão trabecular (normal ou alterado), inflamação (0 a 3), degradação (0 a 3), necrose (0 a 3), congestão (0 a 3) e vasos sinusoidais (normal ou dilatado).

Para a análise das lâminas de tecido peitoral, foram analisadas as seguintes características: acúmulo de tecido adiposo (0 a 3), infamação (0 a 3), degradação (0 a 3), necrose (0 a 3), tecido conjuntivo (0 a 3) e presença de edema (0 a 3).

Para análise das lâminas histológicas de tecido ósseo da tíbia, foram consideradas três regiões distintas caracterizadas pela aparência morfológica: zona de repouso, zona de cartilagem em proliferação e zona de cartilagem hipertrófica. A zona de cartilagem calcificada foi considerada como o limite inferior para determinação do espessamento da zona hipertrófica, na caracterização da lesão, segundo Thorp et al.<sup>59</sup>.

Foi utilizada a metodologia de determinação de áreas da cartilagem do corte histológico do perfil longitudinal da tíbia proposta por Oviedo-Rondón et al.<sup>60</sup>. Para este processo, as lâminas histológicas confeccionadas foram digitalizadas utilizando o Scanner de Lâminas Histológicas scanner de lâminas Aperio Scanscope AT- da Leica®, da Rede de Laboratórios Multiusuário da Universidade Federal de Uberlândia. As imagens gravadas foram submetidas ao analisador de imagens, por meio de um software para análises de imagens Aperio ImageScope versão 12.4.3.5008 da Leica® onde foram medidas três áreas: cartilagem em proliferação ou placa de crescimento, cartilagem hipertrófica e área total da epífise (Figura 7).



**Figura 7.** Corte histológico da epífise da tíbia de um frango de corte aos 42 dias de idade, demonstrando as áreas medidas na caracterização da lesão, sendo elas: zona de cartilagem em proliferação ou placa de crescimento (ACP), zona de cartilagem hipertrófica (ACH) e área total da epífise (AT)

#### 3.4.6. Análise de anomalias musculares peitorais

Para a análise de anomalias musculares peitorais no musculo do peito (*Pectoralis major*) de frangos de corte foram separados das carcaças dos 32 frangos abatido o corte completo do peito e levado para analise tátil visual. Para a análise de *White Striping* foi utilizada a metodologia de Kuttappan et al.<sup>61,62</sup>, definindo-se 4 escores: 0 – normal; 1 – estrias menores que 2mm; 2 – estrias maiores que 2mm; 3 – deposição de gordura.

Para a análise de *Wooden-Breast*, foi seguido a metodologia proposta por Tijare et al.<sup>63</sup> e Petracci et al.<sup>64</sup>, definindo 5 escores para a característica: 0 – normal; 1 – leve (região cranial do peito com menos de 40% de dureza); 2 moderado (região cranial do peito com entre 40 e 80% de dureza); 3 – severo (totalmente rígido); 4 – extremo (totalmente rígido com presença de regiões hemorrágicas).

Para a análise de outras anomalias musculares peitorais, como a M.D.C (miopatia dorsal cranial), M.P.P. (miopatia peitoral profunda) e *spaguetti meat* (carne desestruturada) foi adotado como método de presença e ausência de cada uma no peito.

### 3.5. Análise propriedades físicas das fontes de colina

#### 3.5.1. Determinação do teor de voláteis (VT)

Foram pesados 0,5g da amostra e o teor de voláteis foi calculado utilizando-se uma balança com elemento de aquecimento halogênio modelo MB 35 (Ohaus®). A amostra foi submetida à temperatura de 105°C até peso constante. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados médios expressos em % (m/m)<sup>65</sup>.

#### 3.5.2. Atividade de água

Para a determinação da atividade de água dos extratos secos, foi empregado um aparelho de atividade de água composto por um termo higrômetro Testo® 650 (Testo AG, Alemanha) e uma câmara hermética.

#### 3.5.3. Teste de Higroscopicidade

Para determinação da higroscopicidade dos materiais, foi utilizado o método do dessecador e soluções salinas. As amostras secas de aproximadamente 1,0 g, 4 amostras de cada material (colina vegetal e cloreto de colina), previamente pesadas, acondicionados em cadinhos de porcelana e colocadas no dessecador, estando expostas a uma atmosfera de 75,1-75,3% de umidade relativa de 20 a 25°C, obtida através de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) preparadas na base do dessecador no dessecador<sup>66</sup>.

As amostras foram pesadas após 24 horas, e posteriormente a cada duas horas, finalizando o ensaio experimental com 50 horas das amostras em cada dessecador. Foram coletados 7 pesos: Inicial (0 horas), 24, 26, 28, 30, 32, 48 e 50 horas.

Com os pesos das amostras + umidade, foram calculados o ganho de massa via umidade, o ganho de massa por hora e porcentagem de ganho de massa via umidade de cada um dos materiais.

#### 3.5.4. Determinação da densidade dos pós

Para a determinação da densidade, 30 – 50 g dos pós foram pesados na proveta calibrada do densímetro, em que o volume foi medido. A proveta foi então submetida a 100 batidas em densímetro de pós Erweka, modelo SVM 203 e, o volume final (densidade compactada) foi

aferido. As densidades aparentes e de compactação foram calculadas dividindo a massa pesada na proveta pelo volume aferido, de acordo com as equações 1 e 2.

$$d_0 = \frac{m}{v_0} \quad (1)$$

$$d_{ac} = \frac{m}{v_f} \quad (2)$$

Em que,  $d_0$  é a densidade aparente,  $m$  é a massa,  $v_0$  é o volume do pó antes da compactação,  $d_{ac}$  é a densidade compactada,  $v_f$  é o volume do pó após a compactação e  $IH$  é o índice de Hausner.

Para estes testes torna-se possível a aplicação do Índice de Carr e Índice de Hausner, conforme demonstrado nas equações 3 e 4, respectivamente, o qual permite determinar o tipo de fluxo do pó baseado em sua densidade.

$$\text{Índice de Carr} = \frac{d_{ac}-d_0}{d_0} \times 100 \quad (3)$$

$$IH = \frac{d_{ac}}{d_0} \quad (4)$$

Em que,  $d_{ac}$  é a densidade compactada,  $d_0$  é a densidade aparente e  $IH$  é o índice de Hausner.

### 3.5.5. Determinação da velocidade de escoamento

Para a avaliação da velocidade de escoamento, aplicou-se a metodologia proposta pela Farmacopeia Americana<sup>67</sup>, usando equipamento Flowmeter, modelo GTB (Erweka®). 100 g das amostras foram transferidas para interior do funil, com abertura de 15 mm e base fixa, determinando-se a seguir a velocidade de escoamento. Os resultados das velocidades de escoamento para as diferentes massas de pós foram fornecidos pelo próprio equipamento.

### 3.5.6. Determinação do tamanho de partícula / distribuição de tamanho

Para a determinação do tamanho de partícula e distribuição de tamanho foi utilizado um agitador de tamis da marca Advantech, modelo Sonic Silfer, através da técnica de Granulometria por tamisação descrito na Farmacopeia Brasileira<sup>68</sup>, 5g de amostra foram colocados sobre um sistema de 6 tamises de malhas de mesh #10 (2000  $\mu$ m), 12 (1700), 14 (1400), 18 (1000), 20 (850) e 30 (600) para cloreto de colina 60% e mesh #50 (300  $\mu$ m), 70

(212), 100 (150), 140 (106), 200 (75) e 270 (53) para Colina Vegetal, com um recipiente coletor inferior para pós.

Acionou-se o aparelho por 2 minutos com vibração adequada. Após o final da agitação a massa de pós presente em cada um dos tamises foi pesada e calculou-se o percentual retido em cada tamis, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (5)$$

Onde,  $P_1$  é o peso da amostra retido em cada tamis (em gramas),  $P_2$  é a soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas) e 100 é o fator de porcentagem.

### 3.6. Análise Estatística

Após verificação da normalidade dos resíduos dos dados e a homogeneidade das variâncias, os mesmos foram submetidos a análise de variância e em caso de significância, os dados foram analisados via teste de Scott Knott a 5% de significância. Em caso de não normalidade e homogeneidade das variâncias (escores de locomoção, escore de anomalias musculares peitorais, escores das análises histopatológicas e escore de empenamento), foi empregada análise não paramétrica de Kruskal-Walis, e teste de medias Scott Knott a 5% de significância para cada variável utilizando-se pacotes *easyanova*, *ExpDes.pt*, anova do software estatístico R Code (versão 4.0)<sup>69,70,71</sup>.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Desempenho Zootécnico e uniformidade das aves

Os resultados para as variáveis de desempenho zootécnico (peso médio, ganho de peso por fase, consumo de ração, conversão alimentar e viabilidade) para cada uma das fases estão respectivamente expostos nas Tabelas 4 a 7. Não foram observadas diferenças estatísticas nas variáveis estudadas em nenhum dos períodos avaliados.

Tabela 4. Desempenho zootécnico, peso médio (PM), ganho de peso por fase (GP) (1 a 7 dias), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina na fase de 1 a 7 dias.

Tratamentos	PM (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g/g)
Cl. Colina	164	123	127	0,777
Cl. Colina + Co. V (75/25)	162	120	125	0,772
Cl. Colina + Co. V (50/50)	164	123	134	0,820
Colina Vegetal	163	121	128	0,789
<i>CV(%)</i>	<i>2,64</i>	<i>3,42</i>	<i>5,77</i>	<i>5,40</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,6623</i>	<i>0,6208</i>	<i>0,0949</i>	<i>0,1297</i>

Tabela 5. Desempenho zootécnico, peso médio (PM), ganho de peso por fase (GP) (8 a 21 dias), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina na fase de 1 a 21 dias.

Tratamentos	PM (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g/g)
Cl. Colina	910	749	996	1,094
Cl. Colina + Co. V (75/25)	906	749	997	1,100
Cl. Colina + Co. V (50/50)	920	759	1.000	1,088
Colina Vegetal	911	752	1.010	1,108
<i>CV(%)</i>	<i>2,32</i>	<i>2,72</i>	<i>2,96</i>	<i>1,88</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,6389</i>	<i>0,7678</i>	<i>0,7856</i>	<i>0,2572</i>

Tabela 6. Desempenho zootécnico, peso médio (PM), ganho de peso por fase (GP) (22 a 35 dias), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina na fase de 1 a 35 dias.

Tratamentos	PM (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g/g)
Cl. Colina	2.244	1.361	3.206	1,412
Cl. Colina + Co. V (75/25)	2.232	1.347	3.171	1,421
Cl. Colina + Co. V (50/50)	2.294	1.403	3.243	1,414
Colina Vegetal	2.269	1.384	3.239	1,428
<i>CV(%)</i>	<i>4,19</i>	<i>5,67</i>	<i>4,04</i>	<i>2,42</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,5819</i>	<i>0,5073</i>	<i>0,6649</i>	<i>0,7743</i>

Tabela 7. Desempenho zootécnico, peso médio (PM), ganho de peso por fase (GP) (36 a 42 dias), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e viabilidade criatória de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina na fase de 1 a 42 dias.

Tratamentos	PM (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g/g)	Viabilidade (%)
Cl. Colina	2.949	0.735	4.609	1,563	98,5
Cl. Colina + Co. V (75/25)	2.938	0.731	4.552	1,550	98,9
Cl. Colina + Co. V (50/50)	3.040	0.767	4.722	1,554	98,1
Colina Vegetal	2.970	0.729	4.680	1,576	98,5
<i>CV(%)</i>	<i>4,24</i>	<i>6,75</i>	<i>4,23</i>	<i>2,28</i>	
<i>p-valor</i>	<i>0,3871</i>	<i>0,3955</i>	<i>0,3340</i>	<i>0,4772</i>	

Os resultados de desempenho apresentados nas Tabelas 4 a 7 não demonstraram diferenças significativas. Esses resultados mostram o potencial de substituição do cloreto de colina pela fonte vegetal de colina, sem haver decréscimo no desempenho das aves. Resultado este corroborado pelos encontrados por outros autores, como Calderano et al.<sup>25</sup>, Demattê Filho et al.<sup>26</sup> e Sharma e Ranjan<sup>6</sup>. Bem como uma diminuição no uso dos aditivos para suplementação de colina, em decorrência maior biodisponibilidade de colina, demonstrados pelas fontes vegetais, Calderano et al.<sup>25</sup> avaliou seis vezes menos colina vegetal em comparação com ao cloreto de colina (60%) e os resultados de desempenho (peso médio, ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração) foram semelhantes (600mg de cloreto de colina para 100mg de colina vegetal).

No presente trabalho utilizou-se uma quantidade (volume) 45% menor de colina vegetal em relação ao cloreto de colina, contudo, não houve redução na quantidade de colina (0,10% de suplementação na dieta total), sendo obtidos os mesmos resultados de desempenho em todos os tratamentos. Esses resultados demonstraram que a maior biodisponibilidade presente nas fontes vegetais consegue manter os níveis fornecidos de colina para o animal e consequentemente não impactou o seu desempenho.

Houve maior uniformidade nas aves que receberam o tratamento com 100% da Colina Vegetal, quando comparado aos demais tratamentos a partir dos 28 dias (Tabela 8).

Tabela 8. Uniformidade dos frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina em cada uma das fases.

Tratamentos	1 a 7 dias (%)	1 a 21 dias (%)	1 a 35 dias (%)*	1 a 42 dias (%)*
Cl. Colina	76,21	71,29	66,67b	60,60b
Cl. Colina + Co. V (75/25)	71,52	78,98	71,72b	63,45b
Cl. Colina + Co. V (50/50)	72,01	73,78	69,04b	61,62b
Colina Vegetal	82,48	77,22	77,62a	71,73a
<i>CV(%)</i>	<i>11,71</i>	<i>13,60</i>	<i>10,08</i>	<i>12,75</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,0698</i>	<i>0,4506</i>	<i>0,03</i>	<i>0,0453</i>

\*Médias nas colunas seguidas por mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

A forma como a colina é fornecida no composto vegetal é a fosfatidilcolina, a mesma forma como a colina é utilizada no organismo, no metabolismo lipídico hepático como constituinte de membranas<sup>72,73</sup>. Essa forma tem em sua estrutura uma porção apolar e hidrofóbica, que resulta em um produto final com menor higroscopicidade, sendo mais estável que o cloreto de colina. Podendo estas duas características auxiliarem no entendimento da maior uniformidade vista nas aves que receberam o tratamento com maior utilização de colina vegetal, conforme demonstrado na Tabela 8.

A biodisponibilidade e menor capacidade de reagir com a umidade ambiente possibilitou que as aves do tratamento com 100% de colina vegetal obtivessem melhor uniformidade em relação aos tratamentos com uso de cloreto de colina. Conforme pode ser aferido na Figura 15 e Tabela 18, o cloreto de colina mesmo tendo menor porcentagem de voláteis (água) que a colina vegetal, no pouco tempo que exposto a umidade adquiri grande quantidade de água (25,4% em um dia de exposição), se mostrando um produto instável. Esse fator pode ter influenciado diretamente no fornecimento de colina para as aves a partir dos 21 dias, já que se inicia o uso dos aspersores para controle da temperatura ambiente, o que aumenta em muito a umidade ambiente, que passa facilmente dos 75% de umidade utilizados no ensaio de higroscopicidade (Figura 15).

#### **4.2. Rendimento de carcaça, empenamento e anomalias musculares peitorais**

Para as variáveis de rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa, asa, peito, pé, cabeça, pescoço e dorso expostos na Tabela 9, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para nenhuma dessas variáveis. Na Tabela 10, foram apresentados a porcentagem de rendimento de órgãos comestíveis (coração, fígado e moela) e gordura abdominal, também não foi observado diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as variáveis analisadas.

Tabela 9. Rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa (CS), asa, peito e pé, cabeça, pescoço e dorso (PPCD), em porcentagem, de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.

Tratamentos	Rendimento (%)	CS (%)	Asa (%)	Peito (%)	PPCD (%)
Cl. Colina	71,85	34,10	11,81	33,29	35,63
Cl. Colina + Co. V (75/25)	71,97	32,79	11,86	34,76	34,96
Cl. Colina + Co. V (50/50)	72,33	33,42	12,31	34,46	34,41
Colina Vegetal	71,30	32,73	12,48	33,64	36,09
<i>CV (%)</i>	<i>1,95</i>	<i>4,62</i>	<i>5,55</i>	<i>6,33</i>	<i>5,62</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,5560</i>	<i>0,2676</i>	<i>0,1466</i>	<i>0,4980</i>	<i>0,3610</i>

Tabela 10. Porcentagem de órgãos comestíveis (coração, fígado e moela) e gordura abdominal (GA) de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.

Tratamentos	Coração (%)	Fígado (%)	Moela (%)	GA (%)
Cl. Colina	0,40	1,85	1,57	1,56
Cl. Colina + Co. V (75/25)	0,42	1,92	1,47	1,57
Cl. Colina + Co. V (50/50)	0,41	1,76	1,51	1,43
Colina Vegetal	0,45	1,84	1,61	1,31
<i>CV (%)</i>	<i>10,44</i>	<i>14,69</i>	<i>15,39</i>	<i>35,76</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,1897</i>	<i>0,6897</i>	<i>0,6475</i>	<i>0,7473</i>

Os resultados encontrados tanto em rendimento de carcaça, quanto na porcentagem de órgãos corroboram para evidenciar a eficiência na substituição do cloreto de colina pela colina vegetal, mesmo não havendo melhora no rendimento de carcaça e cortes (tratamentos estatisticamente iguais).

O fígado é o órgão mais influenciado metabolicamente pela colina, e tem seu bom funcionamento intrinsecamente ligado a colina. Um dos principais sinais da deficiência de colina no organismo é a esteatose hepática ou síndrome do fígado gorduroso<sup>8</sup>. No presente trabalho não houve alterações estatisticamente significativas no peso do órgão entre os tratamentos, que poderiam decorrer de problemas hepáticos, como a hipertrofia do órgão ocasionada pela deficiência de colina. No trabalho de Selvam et al.<sup>8</sup> as aves que foram suplementadas com a fonte vegetal de colina também não apresentaram acúmulo de gordura hepática, que caracteriza a esteatose hepática.

Desta forma, pode-se observar a eficiência do produto no fornecimento de colina para a promoção do melhor metabolismo hepático. Os demais órgãos e cortes, conforme outros trabalhos com suplementação de colina, como o de Igwe et al.<sup>4</sup> e Khose et al.<sup>29</sup>, provavelmente não apresentariam alterações decorrente da suplementação de colina, logo esperava-se resultados semelhantes entre os tratamentos.

Khosravinia et al.<sup>74</sup>, avaliaram a suplementação de colina vegetal e observaram efeito significativo na redução de gordura abdominal. No presente trabalho houve redução de 0,26 pontos percentuais na gordura abdominal do tratamento com a colina vegetal em relação ao cloreto de colina, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Para as variáveis de análise de empenamento (Tabela 11), as análises de escore de empenamento não demonstraram diferenças estatísticas, ou seja, pelo escore visual as aves aparentaram mesmo nível de empenamento. Quando foi feita a análise de porcentagem de penas, pode-se aferir uma diferença estatística entre os tratamentos, em que os tratamentos que combinaram as duas fontes de colina proporcionaram maior porcentagem de penas na carcaça das aves.

Tabela 11. Efeito de diferentes fontes de colina aos 28 e 35 dias por meio de escore visual, e aos 42 dias utilizando a porcentagem de penas em frangos de corte.

Tratamentos	Escore de empenamento*			Penas (%)**
	Escore	28 dias Freq. Observada	35 dias Freq. Observada	
Cl. Colina	1	0/50	0/50	3,54b
	2	2/50	0/50	
	3	22/50	1/50	
	4	21/50	7/50	
	5	5/50	42/50	
	<b>Mediana</b>		<b>4</b>	
Cl. Colina + Co. V (75/25)	1	0/50	0/50	4,19a
	2	9/50	0/50	
	3	22/50	0/50	
	4	16/50	7/50	
	5	3/50	43/50	
	<b>Mediana</b>		<b>3</b>	
Cl. Colina + Co. V (50/50)	1	0/50	0/50	4,30a
	2	6/50	0/50	
	3	26/50	2/50	
	4	15/50	7/50	
	5	3/50	41/50	
	<b>Mediana</b>		<b>3</b>	
Colina Vegetal	1	0/50	0/50	3,78b
	2	6/50	0/50	
	3	25/50	0/50	
	4	18/50	2/50	
	5	1/50	48/50	
	<b>Mediana</b>		<b>3</b>	
<i>CV (%)</i>				<i>15,16</i>
<i>p-valor</i>		<i>0,1383</i>	<i>0,1574</i>	<i>0,0858</i>

\*Análise de Kruskal-Walis a 5% de probabilidade.

\*\*Médias nas colunas seguidas por mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott a 10% de probabilidade

Esse resultado pode ser relacionado com a forma de suplementação de colina de cada fonte ofertada, o cloreto de colina disponibiliza colina livre para o organismo animal, que pode ser direcionada para a doação de grupos metil. Esta função da colina é semelhante a metionina, aminoácido fundamental para o bom empenamento das aves. Diversos trabalhos já estudaram essa relação de suplementação de colina e diminuição dos níveis suplementados de metionina, e não conseguiram encontrar uma relação, ou seja, a diminuição de metionina sendo suprida pela oferta de colina<sup>18,20,23</sup>.

Diferente desses estudos, no presente estudo não houve o fornecimento de uma fonte de colina que suprisse as outras demandas da molécula no organismo, como no caso da fosfatidilcolina, fonte de colina presente na colina vegetal. A combinação das duas fontes pode ter suprido de melhor forma as diferentes funções metabólicas da colina no organismo, uma vez que, a fosfatidilcolina é a forma em que a colina entra no metabolismo lipídico e formação de membranas, e assim a colina ofertada na forma de cloreto de colina fica disponível para funções como a doação de grupos metil.

Já quando ofertadas separadamente a porcentagem de penas foi estatisticamente igual, resultado semelhante ao encontrado por Khose et al.<sup>29</sup>, que estudaram com duas fontes de colina (vegetal e cloreto de colina) e não encontraram diferenças estatísticas na porcentagem de penas. Sendo assim pode-se considerar que as fontes utilizadas de forma separada podem não apresentar tanta eficiência na doação de grupos metil, necessitando de maior aporte de metionina nessa função e afetando o empenamento.

Posteriormente ao abate foram realizadas análises para a verificação de anomalias no musculo peitoral das aves abatidas, e os resultados foram dispostos na Tabela 12. Houve uma presença das anomalias musculares peitorais, mas não houve efeito dos tratamentos na incidência dessas anomalias.

Tabela 12. Frequência de observação das anomalias musculares: *wooden breast*, *white striping* e *spaghetti meat* no peito de frangos de corte tratados com diferentes fontes de colina

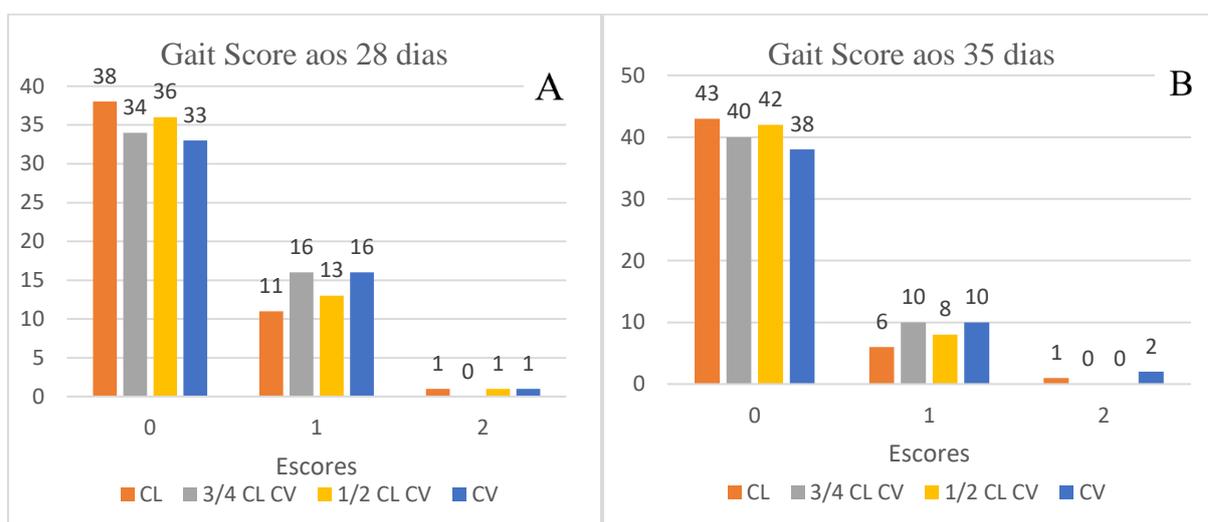
Tratamentos	<i>Wooden Breast</i>		<i>White Striping</i>		<i>Spaghetti meat</i>	
	Escores	Freq. Observada	Escores	Freq. Observada	Presença	Freq. Observada
Cl. Colina	0	3/8	0	1/8	Sim	1/8
	1	4/8	1	4/8	Não	7/8
	2	0/8	2	3/8		
	3	1/8	3	0/8		
	4	0/8				
<b>Mediana</b>		1		1		Não
Cl. Colina + Co. V (75/25)	0	2/8	0	3/8	Sim	2/8
	1	4/8	1	3/8	Não	6/8
	2	1/8	2	1/8		
	3	1/8	3	1/8		
	4	0/8				
<b>Mediana</b>		1		1		Não
Cl. Colina + Co. V (50/50)	0	3/8	0	0/8	Sim	1/8
	1	2/8	1	6/8	Não	7/8
	2	2/8	2	2/8		
	3	0/8	3	0/8		
	4	1/8				
<b>Mediana</b>		1		1		Não
Colina Vegetal	0	1/8	0	2/8	Sim	0/8
	1	3/8	1	4/8	Não	8/8
	2	1/8	2	2/8		
	3	2/8	3	0/8		
	4	1/8				
<b>Mediana</b>		1,5		1		Não
<i>p-valor</i>		0,4373		0,7498		0,5496

O resultado observado nas variáveis peito amadeirado (*Wooden breast*) e *spaghetti meat* já era esperado, visto que a colina não tem influência na formação e desenvolvimento muscular. Os fatores que influenciam diretamente a incidência dessas anomalias musculares não são plenamente conhecidos, mas o que autores como Velleman et al.<sup>50</sup> consideram como responsável por esses problemas a genética de crescimento rápido dessas aves, que afetam o desenvolvimento da fibra muscular, e gera essas anomalias que podem gerar perdas econômicas<sup>72</sup>.

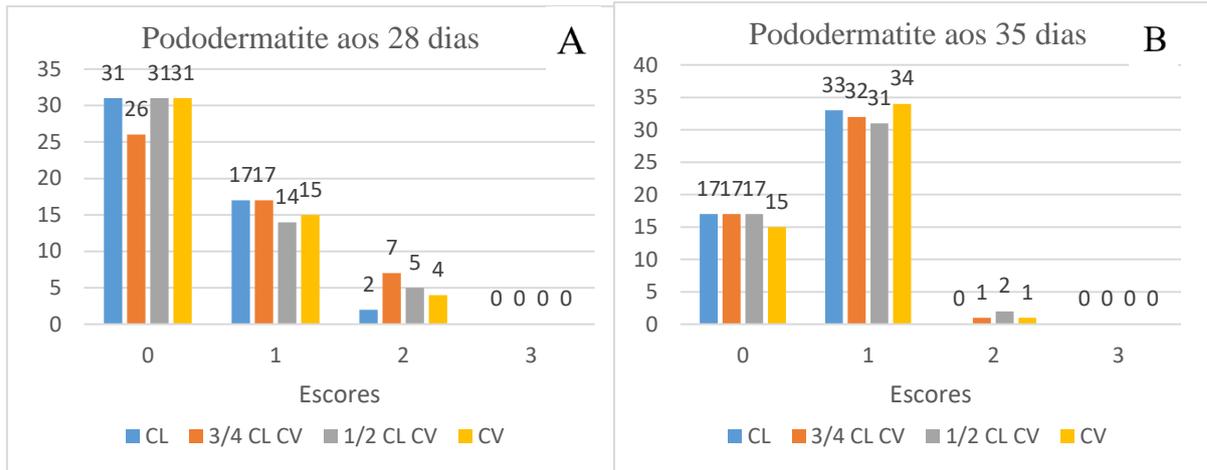
Já para a variável estrias brancas (*White striping*) como essa anomalia peitoral é decorrente dentre diversos fatores do acúmulo lipídico no tecido muscular, poderia ser esperado menor incidência dessa anomalia, o que não visto, já que mais de 50% das aves em todos os tratamentos tiveram algum grau de *White Striping* no musculo peitoral. Esse resultado corrobora com a teoria de que essas anomalias não possuem ligação com a nutrição e sim com a genética da ave.

### 4.3. Análises dos membros locomotores e locomoção

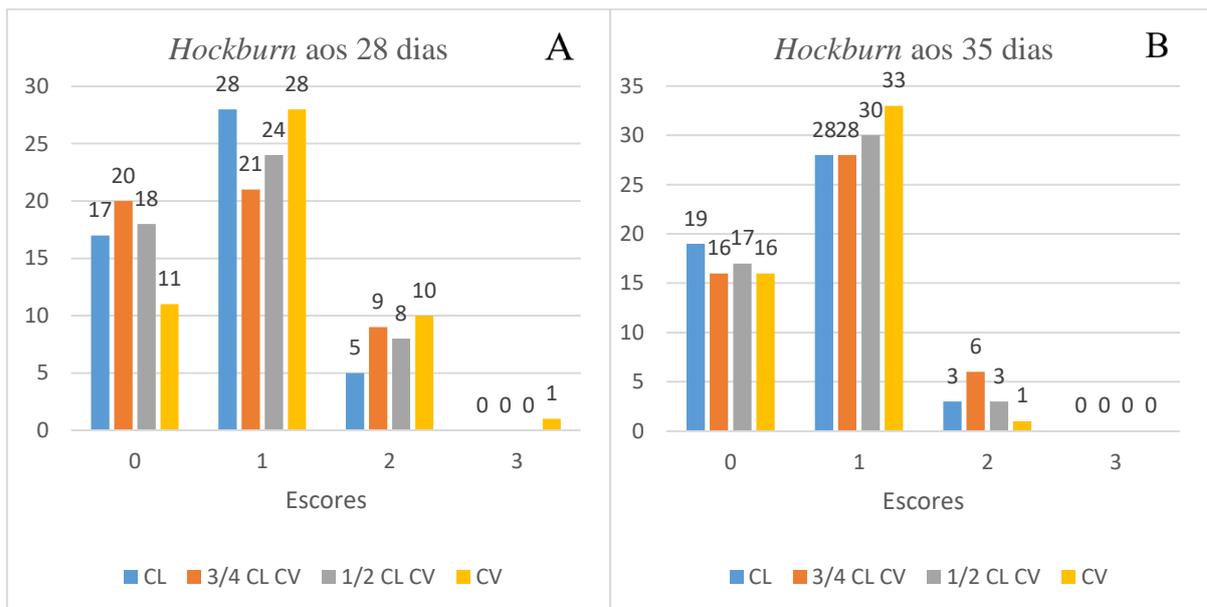
Devido a influência da colina na maturação da cartilagem óssea, e sua deficiência ocasionar problemas locomotores como a perose (discondroplasia tibial), foram feitas análises de problemas locomotores, por meio dos métodos *Gait Score* (Figura 8), *Hockburn* (Figura 9), Pododermatite (Figura 10), *Valgus* e *Varus* (Figura 11 e 12) das aves em duas idades (28 e 35 dias). Nessas análises somente foi verificada diferença estatística na análise de *Valgus* aos 28 dias (Figura 11), em que na perna esquerda houve maior incidência de aves com *Valgus* (angulação da perna que forma um ângulo positivo) no tratamento com uso somente de cloreto de colina e na combinação de 75% de cloreto de colina e 25% de colina vegetal. Nas demais variáveis analisadas não foram obtidas diferenças significativas.



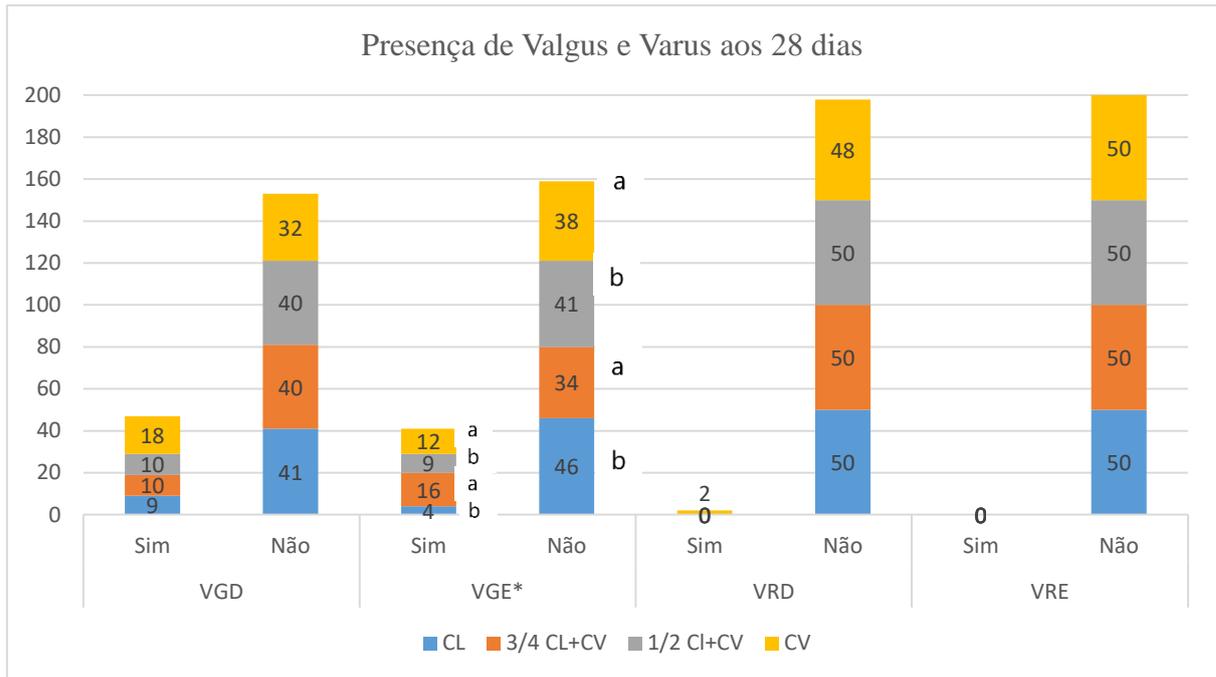
**Figura 8.** Gráfico de frequência de observação do escore locomotor *Gait Score* (0 a 2) em frangos de corte alimentados com duas diferentes fontes de colina (CL – Cloreto de Colina; CV Colina Vegetal). Gráfico A demonstra os resultados encontrados na idade de 28 dias (p-valor 0,7280). Gráfico B demonstra os resultados encontrados na idade de 35 dias (p-valor 0,5597).



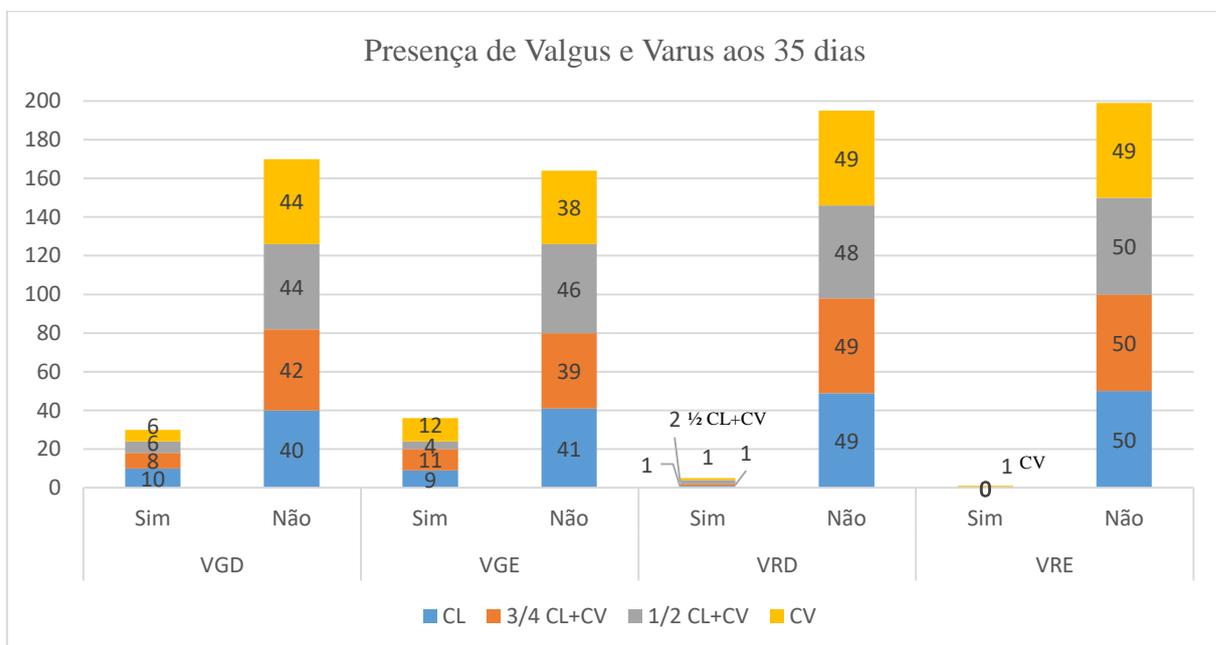
**Figura 9.** Gráfico de frequência de observação do escore de pododermatite (0 a 3) em frangos de corte alimentados com duas diferentes fontes de colina (CL – Cloreto de Colina; CV Colina Vegetal). Gráfico A demonstra os resultados encontrados na idade de 28 dias (p-valor 0,5523). Gráfico B demonstra os resultados encontrados na idade de 35 dias (p-valor 0,9519).



**Figura 10.** Gráfico de frequência de observação do escore de *hockburn* (0 a 3) em frangos de corte alimentados com duas diferentes fontes de colina (CL – Cloreto de Colina; CV Colina Vegetal). Gráfico A demonstra os resultados encontrados na idade de 28 dias (p-valor 0,2469). Gráfico B demonstra os resultados encontrados na idade de 35 dias (p-valor 0,8139).



**Figura 11.** Gráfico de frequência de observação de presença *valgus* (VG) e *varus* (VR) em cada perna (D – direita; E – esquerda) de frangos de corte alimentados com duas diferentes fontes de colina (CL – Cloreto de Colina; CV Colina Vegetal) na idade de 28 dias (p-valor: VGD 0,1238; VGE: 0,0248; VRD – 0,1108). \* Valores seguidos pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott a 5% de significância



**Figura 12.** Gráfico de frequência de observação de presença *valgus* (VG) e *varus* (VR) em cada perna (D – direita; E – esquerda) de frangos de corte alimentados com duas diferentes fontes de colina (CL – Cloreto de Colina; CV Colina Vegetal) na idade de 35 dias (p-valor: VGD 0,6389; VGE: 0,1345; VRD – 0,6555; VRE – 0,3940).

As análises de *Gait Score*, pododermatite, *hockburn* e *valgus* e *varus* foram feitas para analisar possíveis efeitos *in vivo* de deficiência de colina, devido a um dos principais problemas relatados na deficiência de colina ser a discondroplasia tibial<sup>7</sup>. Os sinais que podem ser vistos nas aves seriam os problemas locomotores decorrentes desse problema na maturação da cartilagem, como a dificuldade no andar das aves, avaliado pelo *Gait Score* e que é influenciado diretamente pela conformidade das pernas (*Valgus* e *Varus*)<sup>38</sup>. E a maior incidência de problemas de conformidade e de locomoção potencializam o aparecimento problemas como Pododermatite (edema nos pés, região plantar) e Hockburn (edema nas anterior das pernas, no jarrete)<sup>38</sup>.

Os resultados encontrados evidenciam que não houve deficiência de colina, visto que em média 70% das aves de todos os tratamentos não apresentaram dificuldades no andar, expresso pelo escore 0 de *Gait Score* aos 28 dias, ou seja, não apresentaram dificuldades no andar. O valor aumentou para mais de 80% das aves aos 35 dias, valor esse que mostra que houve um bom desenvolvimento dos membros locomotores das aves. Essa baixa incidência de problemas locomotores é positiva e demonstra que não ocorreram grandes problemas nesse sentido, pode-se citar que a meta estipulada de por países importadores é uma presença de escores de 1 e 2 menores que 30% no lote<sup>38</sup>.

Os resultados de pododermatite e *hockburn* também mostram que não houve grandes problemas locomotores nas aves. A incidência de lesões pequenas (escore 1) pode ser considerada normal para aves, e não ocasiona um problema em si para a locomoção das aves. Como também o material de cama utilizado no experimento era novo e não apresentava pontos de alta umidade e temperatura, fatores que poderiam influenciar e aumentar a incidência de escores mais elevados de Pododermatite e Hockburn.

Para a variável *valgus* e *varus*, pode-se observar maior incidência de desvio lateral *valgus* em relação ao *varus*, o que corrobora com o encontrado por outros autores como Bernardi<sup>75</sup> e Almeida Paz<sup>38</sup>. Em relação a diferença encontrada aos 28 dias de maior incidência de *valgus* no membro esquerdo das aves, segundo Gonzales e Mendonça<sup>76</sup> a respeito dos desvios angulares *valgus* e *varus*, ocorrem devida a influência genética. A maior incidência desse problema de pernas observadas no tratamento com uso somente de colina vegetal e com uso de 75% de cloreto de colina e 25% de colina vegetal, não implicou em caracterização de um problema de pernas, sendo que o andar e a locomoção das aves não foram afetados.

#### 4.4. Análises bioquímica sérica

Para as análises de bioquímica sérica, foi realizado o lipidograma (colesterol, triglicerídeos, HDL, LDL e VLDL) e as enzimas fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) nas idades de 21 e 42 dias, tendo seus resultados demonstrados nas Tabelas 13 e 14. Houve diferença significativa para os níveis de LDL nas duas idades analisadas, em que os tratamentos com maior quantidade de colina vegetal tiveram menores valores para essa característica. Para as demais variáveis não houveram diferenças significativas.

Tabela 13. Resultados das análises do lipidograma do plasma sanguíneo de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina aos 21 e 42 dias.

Tratamentos	Lipidograma				
	Colesterol (g/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL) *	VLDL (mg/dL)
<b>21 dias</b>					
Cl. Colina	126,25a	80,24	97,44	12,76a	16,05
Cl. Colina + Co. V (75/25)	132,96a	73,69	102,22	16,00a	14,74
Cl. Colina + Co. V (50/50)	123,37a	71,45	105,56	3,52b	14,29
Colina Vegetal	110,50b	63,39	94,68	3,14b	12,68
<i>CV (%)</i>	<i>13,90</i>	<i>23,41</i>	<i>13,52</i>	<i>58,01</i>	<i>23,41</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,0876</i>	<i>0,2771</i>	<i>0,3938</i>	<i>&lt;0,001</i>	<i>0,2771</i>
<b>42 dias</b>					
Cl. Colina	166,28	77,80	111,55	39,17ab	15,56
Cl. Colina + Co. V (75/25)	162,86	94,37	105,97	38,07ab	18,88
Cl. Colina + Co. V (50/50)	166,76	92,33	103,41	44,89a	18,46
Colina Vegetal	161,87	93,85	113,06	30,04b	18,77
<i>CV (%)</i>	<i>11,37</i>	<i>28,60</i>	<i>13,06</i>	<i>25,56</i>	<i>28,60</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,9375</i>	<i>0,5253</i>	<i>0,4887</i>	<i>0,0399</i>	<i>0,5253</i>

\*Médias nas colunas seguidas por mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (21 dias) e Tukey (42 dias) a 5% de probabilidade

Tabela 14. Resultados das análises das enzimas fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma sanguíneo de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina aos 21 e 42 dias.

Tratamentos	Enzimas		
	FA (UI/L)	GGT (U/L)	AST (UI/L)
	21 dias		
Cl. Colina	8932,62	13,87	167,92
Cl. Colina + Co. V (75/25)	10007,00	13,62	190,76
Cl. Colina + Co. V (50/50)	8199,62	19,44	174,82
Colina Vegetal	8353,37	17,20	161,09
<i>CV (%)</i>	<i>41,25</i>	<i>36,83</i>	<i>13,47</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,7747</i>	<i>0,1719</i>	<i>0,0926</i>
	42 dias		
Cl. Colina	1726,83	12,93	186,59
Cl. Colina + Co. V (75/25)	2513,75	7,77	177,96
Cl. Colina + Co. V (50/50)	2827,00	10,06	175,70
Colina Vegetal	2452,65	18,93	166,31
<i>CV (%)</i>	<i>55,48</i>	<i>59,11</i>	<i>29,36</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,5230</i>	<i>0,0671</i>	<i>0,8911</i>

A uma das principais funções metabólicas da colina no organismo é a mobilização da gordura hepática. Essa metabolização é feita por meio da participação direta da colina na formação de membranas de carreadores de lipídios na forma de lecitina. Dessa forma, a colina vegetal, fonte direta de acetilcolina (constituente da lecitina e membranas) demonstrou ser mais eficiente e proporcionou uma redução significativa na LDL (Lipoproteína de baixa densidade)<sup>4,72</sup>.

A LDL é responsável pelo transporte e deposição de colesterol nos tecidos extra-hepáticos, e sua diminuição é um indicador da diminuição do colesterol circulante no organismo. O resultado encontrado é semelhante ao encontrado por outros autores como Sharma e Ranjan<sup>6</sup> e Mahmoudi et al.<sup>78</sup> constataram em seus trabalhos a redução da LDL com a suplementação de colina. Os autores caracterizaram o efeito hipocolesterolêmico da suplementação de colina. No presente trabalho, o fato da colina vegetal ser uma fonte direta de fosfatidilcolina apresentou melhor resultado na redução do colesterol no organismo.

Não houve diferenças significativas nos níveis séricos de fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase e aspartato aminotransferase (Tabela 14). Alterações nessas enzimas podem ser indicador de diversos problemas metabólicos, muitas vezes podendo estar relacionados com doenças hepáticas em diversas espécies, com exceção da fosfatase alcalina, que tem maior ligação com o metabolismo de cálcio e fosforo<sup>79,80</sup>.

De maneira geral o valor de AST acima de 275 UI/L é indicador de problemas hepáticos ou musculares, o que evidencia que no presente trabalho não houve problemas neste âmbito em

nenhum dos tratamentos<sup>80</sup>. Para a enzima GGT, os valores de referência segundo Lumeij et al.<sup>81</sup> variam de 0 a 10 UI/L, e é uma enzima indicadora de problemas hepatobiliares. Mas segundo Rezende<sup>80</sup> o aumento da enzima não necessariamente significa um problema hepatobiliar e em seu trabalho os valores normais para frangos de corte foi de  $23,27 \pm 5,31$  UI/L, e possivelmente está mais relacionada a alterações musculares nas aves que problemas hepáticos.

A fosfatase alcalina tem seu metabolismo ligado a maturação e desenvolvimento esquelético, devida a sua atuação no metabolismo de cálcio e fosforo. E os valores elevados indicam um aumento das isoenzimas ósseas circulantes, devido ao crescimento das aves os valores encontrados neste estudo foram superiores aos encontrados por Lumeij et al.<sup>82</sup> e Rezende<sup>80</sup>.

O resultado encontrado para a análise de fosfatase alcalina também corrobora com os resultados encontrados nas análises locomotoras (Figuras 8 a 12), em que podemos afirmar que não houve problemas no desenvolvimento dos membros locomotores.

#### **4.5. Análises histopatológicas**

Foram feitas lâmina histológicas do musculo peitoral, área de proliferação da cartilagem da epífise proximal da tíbia e do tecido hepático dos frangos de corte. Os resultados dessas análises estão dispostos nas Tabelas 15, 16 e 17, em que pode se ver que não houveram diferenças estatísticas em nenhuma das variáveis analisadas.

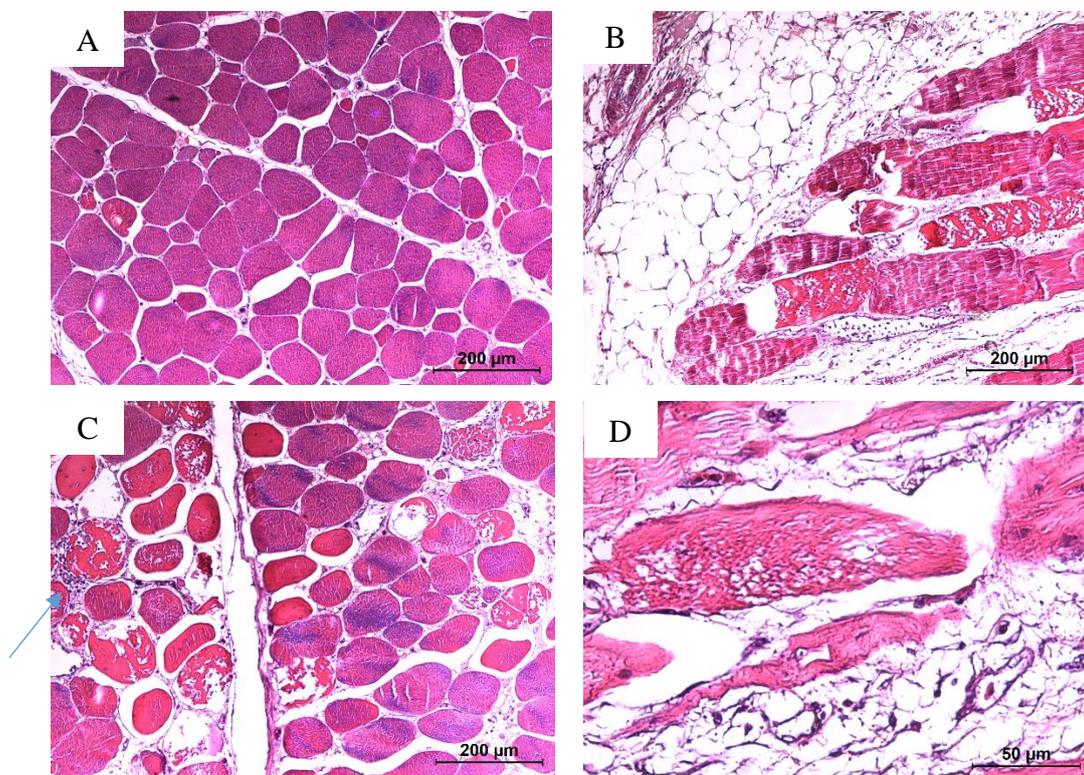
Tabela 15. Frequência Observada dos escores das análises histológicas das lâminas de tecido do musculo peitoral de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.

Tratamentos	Escores	Tecido Adiposo	Inflamação	Degradação	Necrose	Tecido Conjuntivo	Edema
Cl. Colina	0	1/7	1/7	0/7	0/7	1/6	0/6
	1	4/7	5/7	0/7	0/7	3/6	1/6
	2	0/7	1/7	2/7	2/7	0/6	1/6
	3	2/7	0/7	5/7	5/7	2/6	4/6
<b>Mediana</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Cl. Colina + Co. V (75/25)	0	0/8	0/7	0/7	0/7	0/8	0/8
	1	0/8	3/7	2/7	2/7	0/8	3/8
	2	4/8	4/7	1/7	1/7	4/8	0/8
	3	4/8	0/7	4/7	4/7	4/8	5/8
<b>Mediana</b>		<b>2,5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>	<b>3</b>
Cl. Colina + Co. V (50/50)	0	0/7	2/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	1	1/7	3/7	2/7	2/7	1/7	1/7
	2	2/7	2/7	1/7	1/7	2/7	2/7
	3	4/7	0/7	4/7	4/7	4/7	4/7
<b>Mediana</b>		<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Colina Vegetal	0	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	1	1/8	3/8	1/8	1/8	1/8	3/8
	2	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	0/8
	3	5/8	1/8	5/8	5/8	5/8	5/8
<b>Mediana</b>		<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<i>p-valor</i>		<i>0,1451</i>	<i>0,4151</i>	<i>0,8135</i>	<i>0,8135</i>	<i>0,2823</i>	<i>0,9756</i>

\* 0 – Normal; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 - acentuado

Os resultados encontrados na análise histológica de tecido peitoral corroboraram com o visto na análise macroscópica de presença de anomalias musculares peitorais (Tabela 12), em que não foi identificado diferenças estatísticas entre os tratamentos. Assim como na análise da presença das anomalias, foi verificada presença de tecido adiposo nas lâminas, grande degradação tecidual e acúmulo de tecido conjuntivo, o que configura visualmente no musculo as anomalias mais tradicionais, que são a anomalia “estrias brancas” e a anomalia “peito amadeirado”, e podem ser vistos na figura 13.

Os resultados concordam com os vistos em literatura, como citado por Petracci et al.<sup>64</sup>, que relacionam essas anomalias mais ao rápido crescimento das aves que a diferenças nutricionais, visto que a colina atua diretamente no metabolismo lipídico e não provocou alterações na deposição de tecido adiposo no musculo peitoral. Segundo Petracci et al.<sup>64</sup> essas anomalias surgem durante o desenvolvimento muscular dos frangos, consequência de uma hipóxia e inflamação tecidual, que provoca uma miodegeneração e isso leva ao acúmulo de tecido adiposo e conjuntivo, como o que é visto nas lâminas, a degradação do tecido muscular e acúmulo de tecido adiposo e conjuntivo, e com isso os sinais visíveis no musculo demonstrados na Tabela 12.



**Figura 13.** Fotomicrografias (microscopia óptica) de cortes do tecido do musculo peitoral (*p. major*), em que a imagem A – musculatura normal; B – acentuado acúmulo de tecido adiposo em consequência de uma alta degradação tecidual; C – acentuada degeneração tecidual e presença de linfócitos (seta); D – célula em processo de degradação, e acúmulo de tecido conjuntivo.

Tabela 16. Efeito das diferentes fontes de colina na área de cartilagem em proliferação (ACP), área de cartilagem hipertrófica (ACH) e área total (AT) da epífise proximal da tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade e a mediana dos escores visuais da epífise proximal da tíbia dos frangos.

Tratamentos	ACP (mm <sup>2</sup> )	ACH (mm <sup>2</sup> )	AT (mm <sup>2</sup> )	Escore
Cl. Colina	26,74	33,58	102,97	0/8
Cl. Colina + Co. V (75/25)	28,14	29,28	106,87	0/8
Cl. Colina + Co. V (50/50)	31,96	28,52	117,83	0/8
Colina Vegetal	28,58	28,69	108,89	0/8
<i>CV (%)</i>	<i>19,75</i>	<i>20,15</i>	<i>9,78</i>	<i>-</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,6167</i>	<i>0,4827</i>	<i>0,3348</i>	<i>0,4140</i>

A análise das lâminas da epífise proximal da tíbia dos frangos, em que se quantificou as áreas das zonas de crescimento foram em concordância com o resultado do escore de lesão e as análises locomotoras (Figuras 8 a 12), em que não foi verificada presença de problemas locomotores em virtude dos tratamentos. Esses resultados auxiliam a concluir que não houve deficiência de colina em nenhum dos tratamentos, já que a área das zonas da placa de crescimento vem sendo utilizadas para estudar a incidência de discondroplasia tibial em frangos de corte, um dos sinais de deficiência de colina, em que a zona de cartilagem hipertrófica é a principal afeta<sup>59</sup>.

Em comparativo com outros trabalhos como o de Martins et al.<sup>83</sup> e Ospina-Rojas et al.<sup>84</sup>, pode-se notar uma ligeira diminuição da área de cartilagem hipertrófica, que nesses outros trabalhos ficam em valores próximos de 40 mm<sup>2</sup>. Essa diminuição vista, que surtiu efeito na área total, não resultou em problemas locomotores nem em mortalidade, como visto na figura 8 e na Tabela 7, em que a viabilidade foi superior a 97 %, e a incidência de problemas locomotores graves menor que 5% aos 35 dias.

Tabela 17. Frequência Observada dos escores das análises histológicas: padrão trabecular (PT), Inflamação, Degradação celular, necrose celular, congestão de vasos e vasos sinusoidais (VS) das lâminas de tecido hepático de frangos de corte alimentados com diferentes fontes de colina.

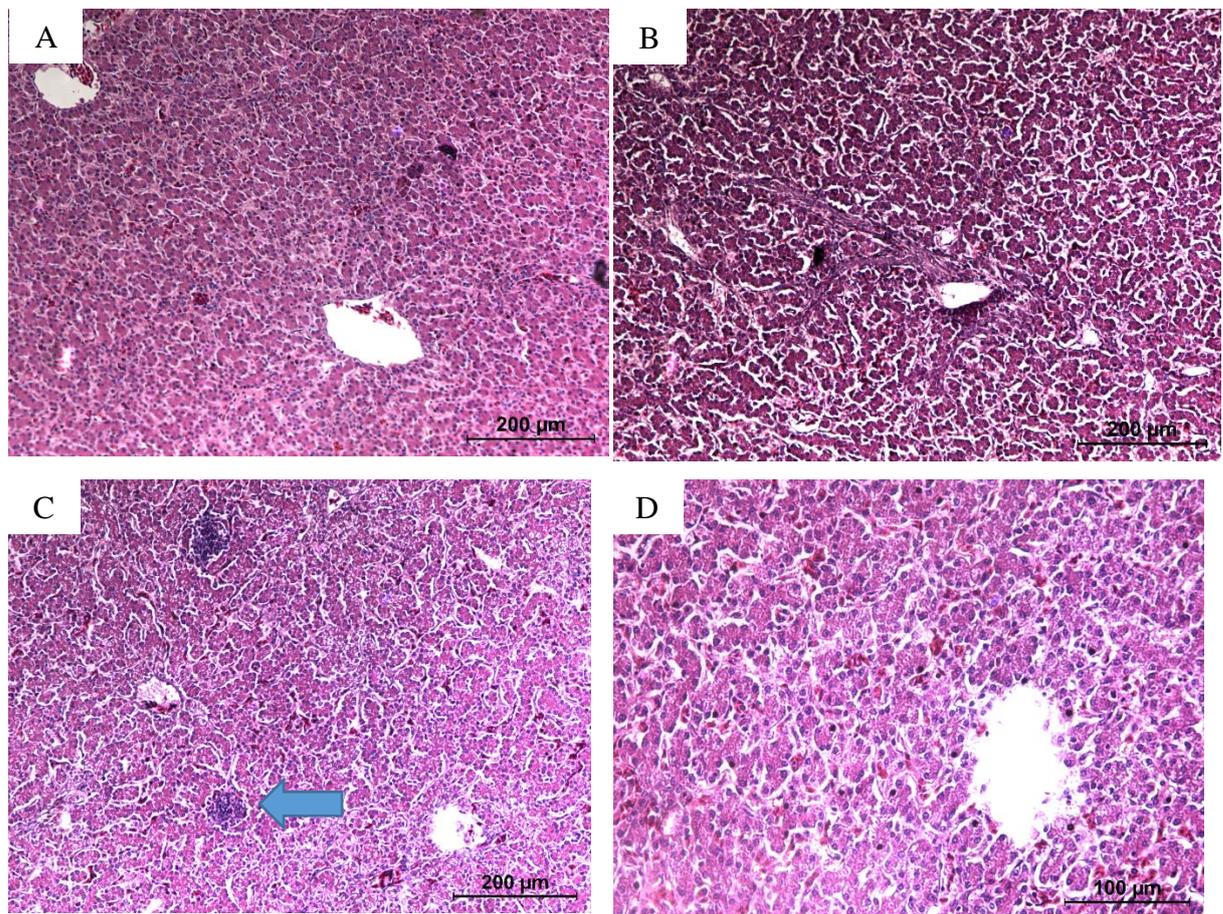
Tratamentos	Escores	PT	Inflamação	Degradação	Necrose	Congestão	VS
Cl. Colina	0	6/7	0/7	1/7	1/7	6/7	2/7
	1	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7	3/7
	2	1/7	0/7	1/7	3/7	1/7	2/7
	3	0/7	0/7	5/7	3/7	0/7	0/7
<b>Mediana</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Cl. Colina + Co. V (75/25)	0	6/8	1/8	0/8	0/8	7/8	0/8
	1	1/8	7/8	0/8	3/8	0/8	4/8
	2	0/8	0/8	3/8	3/8	1/8	4/8
	3	1/8	0/8	5/8	2/8	0/8	0/8
<b>Mediana</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1,5</b>
Cl. Colina + Co. V (50/50)	0	5/8	1/8	0/8	0/8	7/8	0/8
	1	3/8	6/8	1/8	1/8	1/8	5/8
	2	0/8	1/8	0/8	3/8	0/8	3/8
	3	0/8	0/8	7/8	4/8	0/8	0/8
<b>Mediana</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Colina Vegetal	0	5/8	0/8	0/8	0/8	5/8	0/8
	1	2/8	8/8	1/8	3/8	2/8	6/8
	2	1/8	0/8	4/8	3/8	1/8	2/8
	3	0/8	0/8	3/8	2/8	0/8	0/8
<b>Mediana</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<i>p-valor</i>		<i>0,8414</i>	<i>0,8162</i>	<i>0,3336</i>	<i>0,5158</i>	<i>0,5850</i>	<i>0,5081</i>

\* 0 – Normal; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 - acentuado

Conforme a Tabela 17, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, em concordância com os demais resultados encontrados, em que a fonte vegetal de colina foi eficiente na suplementação de colina para os frangos de corte, assim não sendo visto sinais de deficiência de colina. A lesão hepática característica de mal funcionamento do metabolismo lipídico no fígado seria a esteatose hepática, representado pela observação de vacúolos no

parênquima hepático (degeneração vacuolar). Essa lesão não foi encontrada em nenhuma lâmina avaliada. Conforme Selvam et al.<sup>8</sup> em animais com deficiência de colina ocorre uma redução do espaço sinusoidal e degeneração vacuolar, que configura a esteatose hepática. Conforme a análise, foi visualizado um padrão trabecular e vasos sinusoidais normais, que em geral tiveram moderado aumento.

No que diz respeito a degradação celular, foi visualizada uma moderada degradação seguinte de necrose das células, e não um acúmulo de lipídeos, caracterizada pela presença de vacúolos nas células em degradação, que configuraria a esteatose hepática. Esses resultados vêm em concordância de que não houve deficiência de colina em nenhum tratamento, e podem ser visualizados na figura 14.

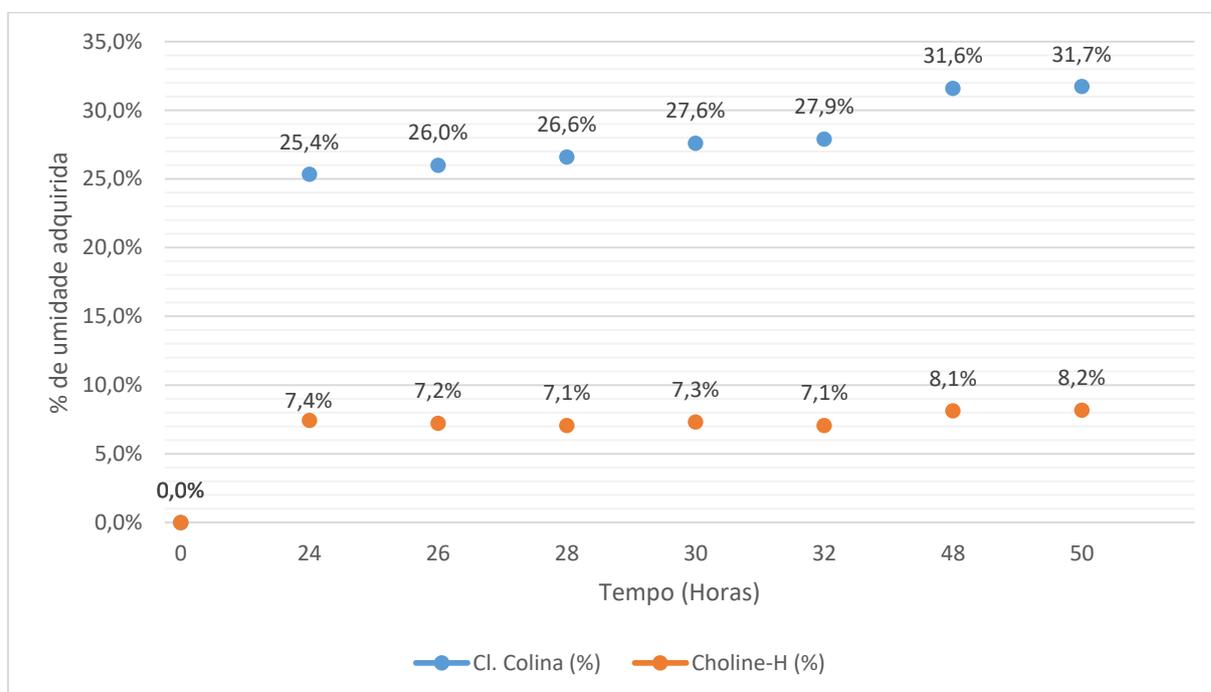


**Figura 14.** Fotomicrografias (microscopia óptica) de cortes de fígado de frangos de corte corados com hematoxilina e eosina, em que as imagens A e D - Vasos sinusoidais e padrão trabecular normais em ampliação de 200μm e 100μm; B – moderada dilatação dos vasos sinusoidais; C – a seta indica a presença de infiltrado (células de defesa).

## 4.6. Análise física das fontes de colina

### 4.6.1. Análise de higroscopicidade, atividade de água e voláteis totais

O teste de higroscopicidade realizado demonstrou diferença de 18% na porcentagem de umidade adquirida entre as duas fontes de colina (Figura 15). A colina vegetal demonstrou maior estabilidade em ambiente controlado a 75% de umidade relativa, chegando a 8,2% de aumento de peso (por meio do aumento de umidade) em 50 horas de análise. Por sua vez o cloreto de colina (60%) teve maior higroscopicidade, o aumento em 50 horas foi de 31,7% de peso adquirido, ou seja, quase 4 vezes maior do que a fonte vegetal.



**Figura 15.** Porcentagem de umidade adquirida das duas fontes de colina testada, durante 50 horas em ambiente de umidade relativa de aproximadamente 75%.

Conforme os testes voláteis totais e atividade de água, demonstrados na Tabela 18, ambos os produtos tem baixa umidade inicial e são estáveis se mantidos em sua embalagem original e ambiente controlado. Os valores de atividade de água encontrados em ambos, demonstram que os produtos se bem armazenados mantem-se livres de contaminantes como fungos e bactérias (AW menor que 0,6 é considerado o valor mínimo para o crescimento da maioria dos microrganismos)<sup>85</sup>. Mas o elevado aumento de umidade do cloreto de colina demonstra ser altamente prejudicial, pois ocorre a formação de grumos que dificultam a mistura do produto, logo o seu armazenamento e manipulação devem ser muito bem controlados.

Tabela 18. Porcentagem de voláteis totais e atividade de água (AW) das fontes de colina utilizadas.

Produtos	VT (%)	AW
Cloreto de Colina	1,72	0,208
Colina Vegetal	5,43	0,414

#### 4.6.2. Determinação da densidade do pó e velocidade de escoamento

Os resultados das análises de densidade do pó e os valores de referência para o índice de Carr e índice de Hausner estão apresentados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente:

Tabela 19. Resultados dos parâmetros físicos (massa, volume, densidade aparente, densidade compactada, Índice de Carr, Índice de Hausner e velocidade de escoamento) do cloreto de colina e da colina vegetal.

Parâmetros de Densidade	Cloreto de colina	Colina Vegetal
Massa (g)	50	30
Volume inicial (mL)	93	76
Volume final (mL)	81	56
Densidade aparente (g/mL)	0,5376	0,3947
Densidade compactada	0,6173	0,5357
Índice de Carr (%)	14,82	35,7
Índice de Hausner	1,15	1,36
Velocidade de escoamento	5,0 s/100 g	Não detectável

Tabela 20. Relação entre fluxibilidade de um pó, percentual da compressibilidade e a razão de Hausner.

Índice de Carr (%)	Tipo de fluxo	Índice de Hausner
1-10	Excelente	1,00-1,11
11-15	Bom	1,12-1,18
16-20	Razoável	1,19-1,25
21-25	Fraco	1,26-1,34
26-31	Fraco	1,35-1,45
32-37	Muito fraco	1,46-1,59
>38	Extremamente deficiente	>1,60

FONTE: Adaptado de Aulton e Taylor<sup>86</sup>.

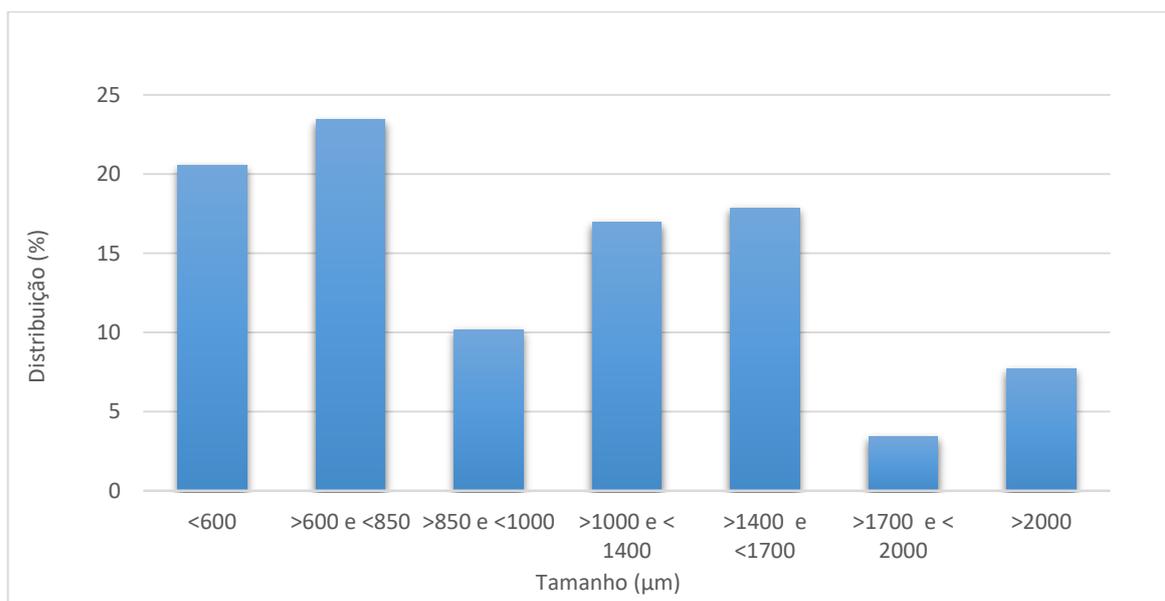
Observou-se que o Cloreto de colina 60% possui um bom fluxo de escoamento, representado através da medição direta pela velocidade de escoamento (5,0s/100g) e

confirmado pelos métodos indiretos baseados na densidade, no caso o Índice de Caar, também conhecido como compressibilidade (14,82%) e Índice de Hausner (1,15).

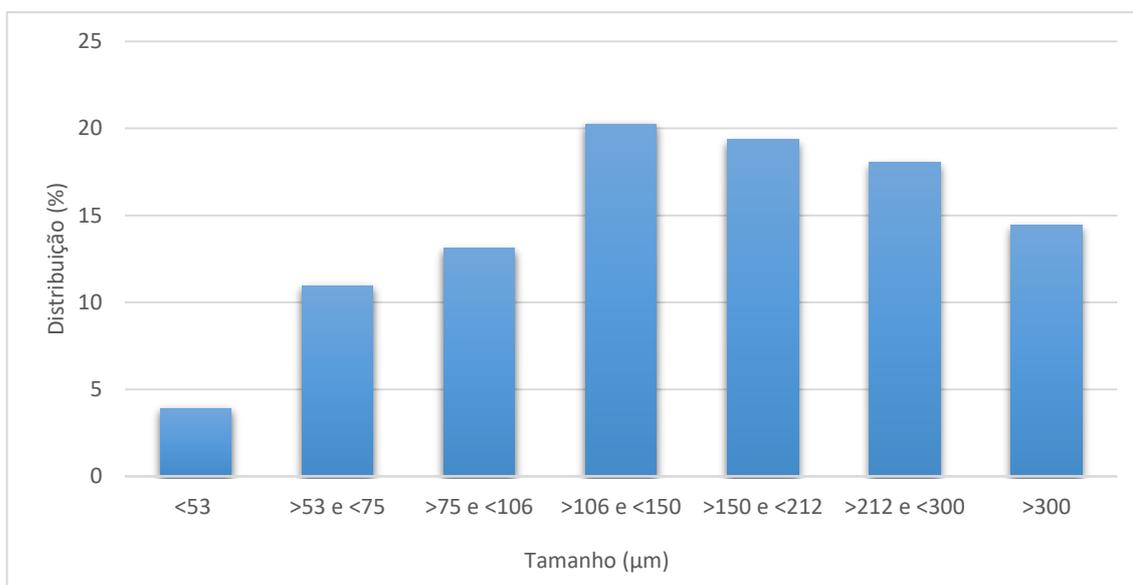
Em relação a Colina Vegetal por ser um pó muito fino apresentou alto índice de compressibilidade (35,7%) e de Hausner (1,36). Por esse motivo, não foi possível fazer a determinação direta da velocidade de escoamento do material, pois a sua alta compressibilidade não permitiu a passagem do pó pelo funil do equipamento. Porém não foram observadas diferenças na mistura da ração em nenhum dos tratamentos, seja utilizando a colina vegetal ou o cloreto de colina.

#### 4.6.3. Determinação do tamanho de partícula/ distribuição de tamanho

Os resultados das análises de tamanho de partícula e distribuição de tamanho para o Cloreto de colina 60% e Colina Vegetal estão apresentados nos histogramas representados nas figuras 16 e 17.



**Figura 16.** Tamanho de partículas e distribuição de tamanho (Cloreto de colina 60% )



**Figura 17.** Tamanho de partículas e distribuição de tamanho (Colina Vegetal)

Ao se observar a distribuição de tamanho dos pós obtidos pelo teste de granulometria, é possível classificá-los de acordo com Farmacopeia Brasileira, que divide as partículas em:

- Pó grosso (aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1700 µm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 µm);
- pó moderadamente grosso (aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 µm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 µm);
- pó semifino (aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de malha de 355 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 180 µm);
- pó fino (aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 180 µm);
- pó finíssimo (aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 125 µm).

Conforme essa classificação, o Cloreto de colina 60% é um pó grosso e heterogêneo (Figura 16). Em contrapartida, a fonte de colina vegetal é um pó finíssimo. Partículas de tamanho grosseiro, geralmente são menos coesivas do que partículas mais finas, apresentando, portanto, melhores propriedades de fluxo, conforme demonstrado anteriormente. Devido à alta coesividade do Cloreto de Colina foi observado oscilação na porcentagem de pós que atravessou os tamises o que pode ser observado pela oscilação das quantidades retidas nos mesmos (Figura 16).

## 5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a fonte vegetal de colina (*Choline-H*) foi eficaz em substituir o cloreto de colina em dietas para frango de corte como fonte da nutriente colina. A colina vegetal manteve os índices zootécnicos (peso médio, ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração) e melhorou a uniformidade das aves, além disso não houve nenhum sinal de deficiência de colina (problemas locomotores, de empenamento ou hepáticos), diminuiu significativamente o LDL sérico e apresentou teor higroscopicidade quase quatro vezes menor que o cloreto de colina.

## REFERENCIAS

1. Maliszewski E. Carne de frango ficou competitiva no ano: Já o poder de compra do avicultor frente aos principais insumos diminuiu. Agrolink, 2020. [acesso em 11 jan 2021]. Disponível em: [https://www.agrolink.com.br/noticias/carne-de-frango-ficou-competitiva-no-ano\\_444375.html](https://www.agrolink.com.br/noticias/carne-de-frango-ficou-competitiva-no-ano_444375.html)
2. EMBRAPA, Icpfrango/Embrapa - Central De Inteligência De Aves E Suínos. [acesso em 15 de fevereiro de 2021] Disponível Em: [Https://Www.Embrapa.Br/Suinos-E-Aves/Cias/Custos/Icpfrango](https://Www.Embrapa.Br/Suinos-E-Aves/Cias/Custos/Icpfrango)
3. Rodrigues PB, Filho STS. Nutrição De Aves: Passado, Presente E Futuro. Anais do XXV Congresso Brasileiro De Zootecnia (ZOOTEC 2015). Fortaleza, 2015.
4. Igwe IR, Okonkwo CJ, Uzoukwu UG, Onyenegecha CO. The Effect of Choline Chloride on the Performance of Broiler Chickens. Annual Research & Review in Biology. 8(3): 1-8, 2015. DOI: 10.9734/ARRB/2015/19372
5. Bertechini AG. Nutrição De Monogástricos. Lavras, P. 107-108. Editora UFLA/FAEPE, 2004
6. Sharma A, Ranjan S. Effect of Herbal and Chemically Synthetic Choline on Physio-Biochemical Characteristics of Chicks. Uttarakhand. Journal of Global Biosciences, v. 4, n. 6, p. 2537-2542. 2015.
7. Lima MB. Modelos matemáticos para predição das exigências nutricionais da colina para frangos de corte. [Dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.
8. Selvam R, Saravanakumar M, Suresh S, Chandrasereran CV, Prashanth D. Evaluation of polyherbal formulation and synthetic choline chloride on choline deficiency model in broilers: implications on zootechnical parameters, serum biochemistry and liver histopathology. Asian-Australas Journal of Animal Science. Vol. 31, No. 11:1795-1806. 2018. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0018>
9. Gholami J, Qotbi AAA, Seidavi A, Meluzzi A, Tavaniello S, Maiorano G. Effects of in ovo administration of betaine and choline on hatchability results, growth and carcass characteristics and immune response of broiler chickens. Italian Journal of Animal Science; volume 14:3694. 2015. DOI: 10.4081/ijas.2015.3694
10. Combs Jr. GF. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. 3ª Ed. Academic Press. San Diego. 455 Pp. 2008.

11. Arele AC, Ricardo VN, Ramalho JBR, Ricardo AC. Animal replacement of choline chloride by a vegetal source of choline in diets for broilers. *Cienc Anim Bras* 2015;16:37-44.
12. Zhang CX, Pan MX, Li B, Wang L, Mo XF, Chen YM, Lin FY and Ho SC. Choline and betaine intake is inversely associated with breast cancer risk: A two stage case control study in china. *Cancer Science*, 104: 250-258. 2013.
13. DSM. Choline: Properties and metabolism. [acesso em 15 de setembro de 2019] Disponível Em: [https://www.dsm.com/markets/anh/en\\_US/Compendium/poultry/choline.html](https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/Compendium/poultry/choline.html)
14. YMDB. Componentes do produto YMDB00227. [acesso em 15 de setembro de 2019] Disponível Em: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00227>
15. Combs Jr. GF. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. 5ª Ed. Academic Press. San Diego. 455 Pp. 2008.
16. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition*, 1994. Washington, DC: The National Academies Press. 1994. <https://doi.org/10.17226/2114>.
17. Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, et al. *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 4 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2017. 439 p.
18. Saeed M, Alagawany M, Arain MA, El-Hack MEA, Dhama K. Beneficial impacts of choline in animal and human with special reference to its role against fatty liver syndrome. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. Volume – 5(5). 2017. DOI: [http://dx.doi.org/10.18006/2017.5\(5\).589.598](http://dx.doi.org/10.18006/2017.5(5).589.598)
19. Swain BK, Johri TS. Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science*, 41:1, 83-88, 2010, DOI: 10.1080/00071660086457
20. Arguelli FAN. *Respuesta productiva y hepática de gallinas lohmann a la adición de colina (Biocholine)*. [Dissertação]. Sangolgui: Centro de Posgrados Maestría en Nutrición y Producción Animal da Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, 2019.

21. Santana MHM, Costa FGP, Ludke JV, Figueiredo Júnior, J.P. Interações Nutricionais Entre Aminoácidos Sulfurosos, Colina E Betaína Para Aves. Arquivo Brasileiro De Zootecnia. Vol. 63. P. 69-83. 2014
22. El-Husseiny, O.M.; El Din, G.; Abdul-Aziz, M. and Mabroke, R.S. 2008. Effect of mixed protein schedules combined with choline and betaine on the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Res*, 39:291:300.
23. Lima MB, Silva EP, Pereira R, Romano GG, Freitas LW, Dias CTS, Menten JFM. Estimate of choline nutritional requirements for chicks from 1 to 21 days of age. *Journal of Animal and Physiology Animal Nutrition*, 1-9. 2018. DOI: 10.1111/jpn.12881
24. Farina G, Kessler AM, Ebling PD, Marx FR, César R, Ribeiro AML. Performance of Broilers Fed Different Dietary Choline Sources and Levels. *Goiânia, Ciência Animal Brasileira* V.18, 1-14, E-37633, 2017. DOI: 10.1590/1089-6891v18e-37633
25. Calderano AA, Nunes RV, Rodrigueiro RJB, César RA. Replacement Of Choline Chloride By A Vegetal Source Of Choline In Diets For Broilers. *Ciência Animal Brasileira*, V.16, N.1, P. 37-44, jan. /Mar. 2015. DOI: 10.1590/1089-6891v16i127404
26. Demattê Filho LC, Pereira DCO, Possamai, E. Dietary Supplementation of Alternative Methionine and Choline Sources In the Organic Broiler Production in Brazil. *Revista Brasileira De Ciência Avícola*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1516-635x1704489-496>
27. Mulji R, Florêncio N, Alves P. Trimetilaminúria ou síndrome do odor de peixe podre – relato de caso e considerações para a prática clínica. *Rev. Port. Med. Geral. Fam.* 30:117-2, 2014
28. FEDNA, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Fuentes de colina. [acesso em 19 de setembro de 2019] Disponível Em: [http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/fuentes-de-colina](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/fuentes-de-colina)
29. Khose K, Manwar S, Gole M, Ingole R, Ratod P. Replacement of Synthetic Choline Chloride by Herbal Choline in Diets on Liver Function Enzymes, Carcass Traits and Economics of Broilers. *Journal of Animal Research*. v.9 n.1, p. 87-93, 2019. DOI: 10.30954/2277-940X.01.2019.12.
30. Santos JL, Pereira MM. Utilização De Colina Em Dietas Para Monogástricos. *Londrina, PUBVET*, V. 4, N. 1, Ed. 106, Art. 716, 2010.
31. Quillin EC, Combs GF, Creek RD, Romoser GL. Effect of choline on the methionine requirements of broiler chickens. *Poultry Science*, 40, 639–645. 1961. <https://doi.org/10.3382/ps.0400639>.

32. Miles RD, Ruiz N, Harms RH. The interrelationship between methionine, choline and sulfate in broiler diets. *Poultry Science*, 62, 495–498. 1983. <https://doi.org/10.3382/ps.0620495>
33. Pourreza J, Smith W. Performance of laying hens fed on low sulphur amino acids diets supplemented with choline and methionine. *British Poultry Science*, 29, 605–611. 1988. <https://doi.org/10.1080/00071668808417087>
34. Repetto MG, Ossani G, Monserrat AJ, Boveris A. Oxidative damage: The biochemical mechanism of cellular injury and necrosis in choline deficiency. *Experimental and Molecular Pathology*. V.88, 143–149. 2010. doi:10.1016/j.yexmp.2009.11.002
35. Waldroup PW, Motl MA, Yan F, Fritts CA. Effects of Betaine and Choline on Response to Methionine Supplementation to Broiler Diets Formulated to Industry Standards. *Journal of Applicate Poultry Research*. 15:58–71, 2006.
36. Navidshad B, Maghsoodi Z, Nikbin S, Hesari AK. Dietary Garlic Powder Supplementation Could Ameliorate Unfavorable Effects of Choline Deficiency on the Liver Health and Immune System of Broiler Chickens. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2019, 9(2), 337-346.
37. Franco JRG, Murakami AE, Sakamoto MI, Martins EN, Moreira I, Pereira MAS. Efeito dos Ionóforos e do Balanço Eletrolítico da Dieta sobre o Desempenho e a Incidência de Discondroplasia Tibial em Frangos de Corte na Fase Inicial. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.1, p.135-145, 2004.
38. Almeida Paz ACL. Problemas Locomotores Em Frangos De Corte - Revisão. *BioEng, Campinas*, v.2.n.3, p.263-272, set/dez.,2008.
39. Dawkins MS, Donnelly CA, Jones TA. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature*, vol. 427, 2004.
40. Kestin SC, Knowles TG, Tinch AE, Gregory NG. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and it relationship with genotype. *The Veterinary Record*, 1992.
41. Nelson DL. Princípios de bioquímica de Lehninger. Parte 1, cap. 10-11, 6. Ed. Porto Alegre 2014.
42. Sakomura NK, Rostagno HS. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. 2a ed. Jaboticabal: Funep; 2016. Capítulo 1, Planejamento dos experimentos com monogástricos; p.1-30.
43. Duarte RR, Carvalho ECQ, Rosa CAR. Aflatoxina em fígados de frangos de corte, com esteatose, abatidos industrialmente no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. bras. ciênc. vet.*, v.4, n.3, 117-120, set./dez. 1997. <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2015.086>
44. Lima GS. Superdosagem de fitase para frangos de corte e poedeiras leves. [Tese] Areia: Universidade Federal da Paraíba, 2018.
45. Silva KN, Nunes TS, Júnior JGV. Tópicos Especiais em Ciência Animal VII. Cap. 4 – Miopatias de Frangos. Dados eletrônicos. Alegre, 2018. Modo de acesso: <http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca>

46. Baldi G, Soglia F, Mazzoni M, Sirri F, Canonico L, Babini E, Laghi L, Cavani C, Petracci M. Implications of white striping and spaghetti meat abnormalities on meat quality and histological features in broilers. *Animal* (2018), 12:1, pp 164–173. doi:10.1017/S1751731117001069
47. Mutryn MF, Brannick EM, Fu W, Lee WR, Abasht B. Characterization of novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNAsequencing. *BMC Genomics*. (2015) 16:399. doi:10.1186/s12864-015-1623-0.
48. Cobb-Vantress. Manual de manejo de frangos de corte. Guapiaçu: Cobb-Vantress Brasil; 2008. 66p.
49. ABPA. Protocolo de Bem-Estar para Frangos de Corte. Associação Brasileira de Proteína Animal; São Paulo. 2016. 19p
50. Velleman SG, Clark DL, Tonniges JR. Fibrillar Collagen Organization Associated with Broiler Wooden Breast Fibrotic Myopathy. *Avian Diseases* 61:481–490, 2017. <https://doi.org/10.1637/11738-080217-Reg.1>
51. Garcia RG, Mendes AA, Garcia EA, Nääs IA, Moreira J, Almeida ICL, Takita TS. Efeito da Densidade de Criação e do Sexo Sobre o Empenamento, Incidência de Lesões na Carcaça e Qualidade da Carne de Peito de Frangos de Corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2002, v.4, n.1, 001.
52. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation Of The Concentration Of Low-Density Lipoprotein Cholesterol In Plasma, Without Use Of The Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
53. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PF, et al. International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine. IFCC Primary Reference Procedures For The Measurement Of Catalytic Activity Concentrations Of Enzymes At 37 Degrees C. International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine. Part 6. Reference Procedure For The Measurement Of Catalytic Concentration Of Gamma-Glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):734-738.
54. Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin Chem*. 1969;15(2):124-136.
55. Bowers GN, McComb RB. A Continuous Spectrophotometric Method For Measuring The Activity Of Serum Alkaline Phosphatase. *Clin Chem*. 1966;12(2):70-89.
56. Almeida Paz ICL, Garcia RG, Bernardi R, Nääs IA, Caldara FR, Freitas LW, Seno LO, Ferreira VMOS, Pereira DF, Cavichiolo F. Selecting Appropriate Bedding to Reduce Locomotion Problems in Broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 2010, v.12, n.3, p. 189 – 195.
57. Soglia F, Gao J, Mazzoni M, Puolanne E, Cavani C, Petracci M, Ertbjerg P. Superficial and deep changes of histology, texture and particle size distribution in broiler wooden breast muscle during refrigerated storage. *Poultry Science*, 2017, 3465–3472. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex115>

58. Rowland GN, Edwards HM. Diagnosing Broiler Leg Problems. University of Georgia. [acesso em 7 de agosto de 2020] Disponível Em: <http://www.uga.edu/poultry/courses/legs>.
59. Thorp BH, Jakowlew SB, Goddard C. Avian dyschondroplasia: local deficiencies in growth factors are integral to the aetiopathogenesis. *Avian Pathol.* 1995;24(1):135-148.
60. Oviedo-Rondón EO, Murakami AE, Furlan AC, Moreira I, Macari M. Sodium and chloride requirements of young broiler chickens fed corn-soybean diets (one to twenty one days of age). *Poult Sci.* 2001;80(5):592-598.
61. Kuttappan VA, Brewer VB, Apple JK, Waldroup PW, Owens CM. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*, 2012, Volume 91, Issue 10, Pages 2677-2685. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02259>
62. Kuttappan VA, Hargis BM, Owens CM. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poultry Science*, 2016, Volume 95, Issue 11, Pages 2724-2733. <https://doi.org/10.3382/ps/pew216>
63. Tijare VV, Yang FL, Kuttapan VA, Alvarado CZ, Coon CN, Owens CM. Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. *Poultry Science* 0:1–7, 2016. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew129>
64. Petracci M, Soglia F, Madruga M, Carvalho L, Ida E, Estévez M. Wooden-Breast, White Striping, and Spaghetti Meat: Causes, Consequences and Consumer Perception of Emerging Broiler Meat Abnormalities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.18, 2019. DOI: 10.1111/1541-4337.12431.
65. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, 5 ed, 2010.
66. Garcia DM. Análise da atividade de água de alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
67. Medeiros UKL, Marciano LA, Nascimento RJA, Medeiros MFD, Passos MLA. Estudo higroscópico e caracterização física do leite de cabra em pó. 60º Congresso Brasileiro de Química, 2007, Natal.
68. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira Volume 1*. 5ª Ed. Brasília: Anvisa; 2010
69. Arnhold E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 2013, v.50, n.6, p.488-492.
70. Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. ExpDes: Experimental Designs. R package version 1.2.0. 2018. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes66>. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

71. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2020, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
72. Amorvet. Choline-H [acesso em 30 de novembro de 2020] Disponível Em: <http://www.amorvet.com/choline-h.html>
73. Nelson, DL. Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] – Capítulo 10: Lipídeos. Artmed, 6. ed., pag. 357-385, 2014.
74. Khosravinia H, Chethen PS, Umakantha B, Nourmohammadi R. Effects of lipotropic products on productive performance, liver lipid and enzymes activity in broiler chickens. 2015. *Poult. Sci. J.*, 3(2): 113-120.
75. Sihvo HK., Immonen K, Puolanne E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. 2014. *Vet. Pathol.* 51:619–623.
76. Bernardi R. Problemas locomotores em frangos de corte. [Dissertação]. Dourados: Universidade Federal da Grande Dourados, 2011.
77. Gonzales E, Mendonça JR. Problemas locomotores em frangos de corte. VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó, SC – Brasil. Anais. 79-94, 2006.
78. Mahmoudi M, Azafar A, Khosravinia H. Partial Replacement of Dietary Methionine with Betaine and Choline in Heat-Stressed Broiler Chickens. *J. Poult. Sci.*, 55: 28-37, 2018.
79. Laboratorio de Análises Clínicas Veterinárias (UFRGS). [acesso em 04 de dezembro de 2020]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/servicos/componentes-do-perfil-bioquimico/fosfatase-alcalina- alp/>
80. Rezende MS. Perfil Bioquímico Sanguíneo De Linhagem Pesada De Frango De Corte. [Tese]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2017.
81. Lumeij JT. Avian clinical biochemistry. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 th 390 ed., Burlington, MA: Academic 391 Press, 2008. p. 839-872. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00030-1>
82. Lumeij JT, Westerhof I. Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in 394 birds. A review. *Vet. Q.*, v.9, p.255-61, 1987. <https://doi.org/10.1080/01652176.1987.9694110>
- 83 . Martins JMS, Neto LDS, Noieto-Mendonça RA, Carvalho GB, Sgavioli S, Carvalho FB, Leandro NSM, Café MB. Dietary supplementation with glycosaminoglycans reduces locomotor problems in broiler chickens. *Poultry Science*, V. 99, I. 12, p6974-6982, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.061>.
84. Ospina-Rojas IC, Murakami AE, Duarte CRA, Sakamoto MI, Aguihe PC, Pozza PC, Santos TC. Tibiotarsus bone characteristics and tibial dyschondroplasia incidence of broilers fed diets supplemented with leucine and valine. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018;102(2):768-776.
85. Beuchat, LR. Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 1981; 26 (7): 348-349.

86. Aulton ME, Taylor KMG. Delineamento de formas farmacêuticas. 4. Ed. Porto Alegre: Elsevier, 2013. 1713 P.