



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

**MODELO MATEMÁTICO PARA ESTIMAR OS NÍVEIS ÓTIMOS DE LISINA,
METIONINA+CISTINA, TREONINA E TRIPTOFANO PARA CODORNAS
JAPONESAS EM PRODUÇÃO**

Miryelle Freire Sarcinelli

Zootecnista

JABOTICABAL – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MODELO MATEMÁTICO PARA ESTIMAR OS NÍVEIS ÓTIMO DE LISINA,
METIONINA+CISTINA, TREONINA E TRIPTOFANO PARA CODORNAS
JAPONESAS EM PRODUÇÃO**

Miryelle Freire Sarcinelli
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilva Kazue Sakomura
Co-orientador: Prof. Dr. Edney Pereira da Silva

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Zootecnia

2017

S243m Sarcinelli, Miryelle Freire
Modelo matemático para estimar os níveis ótimo de lisina, metionina+cistina, treonina e triptofano para codornas japonesas em produção/ Miryelle Freire Sarcinelli. – – Jaboticabal, 2016
Xiii 89 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Nilva Kazue Sakomura
Banca examinadora: Edney Pereira da Silva, Nelson José Peruzzi, Sandra Regina Freitas Pinheiro, Simara Márcia Marcato, Nayara Tavares Ferreira
Bibliografia

1. Aminoácidos. 2. Manutença. 3. Massa de ovos. 4. Reading model. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.6:637.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: MODELO MATEMÁTICO PARA ESTIMAR OS NÍVEIS ÓTIMOS DE LISINA, METIONINA+CISTINA, TREONINA E TRIPTOFANO PARA CODORNAS JAPONESAS EM PRODUÇÃO

AUTORA: MIRYELLE FREIRE SARCINELLI

ORIENTADORA: NILVA KAZUE SAKOMURA

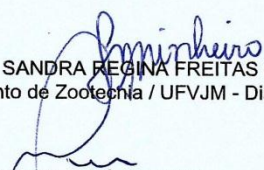
COORIENTADOR: EDNEY PEREIRA DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDNEY PEREIRA DA SILVA

Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal




Profa. Dra. SANDRA REGINA FREITAS PINHEIRO

Departamento de Zootecnia / UFVJM - Diamantina, MG



Prof. Dr. NELSON JOSÉ PERUZZI

Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dra. SIMARA MARCIA MARCATO

Centro de Ciências Biológicas / UEM - Maringá, PR

Participação por Videoconferência



Pós-doutoranda NAYARA TAVARES FERREIRA

Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 21 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MIRYELLE FREIRE SARCINELLI – filha de Eugenio Luiz Sarcinelli e Rutilea Freire Sarcinelli, nasceu no dia 10 de outubro de 1982, na cidade de Vitória, Espírito Santo. Em novembro de 2003 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Espírito Santo – campus de Alegre, graduando-se em agosto de 2008. Durante o ano de 2009 fez estágio na Universidade Estadual do Norte Fluminense. Em março de 2010 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Macari, onde obteve bolsa CNPq, defendendo a dissertação em junho de 2012. Em março de 2013 iniciou o curso de Doutorado na mesma instituição, sob orientação da Prof^a Dr^a Nilva Kazue Sakomura e co-orientação do Prof^o Dr^o Edney Pereira da Silva, defendendo sua tese em novembro de 2016.

"Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore e entender os brotos e as flores, você terá de ir fundo nas raízes, porque o segredo está lá. E, quanto mais fundo vão as raízes, mais alto vai a árvore".

Nietzsche

"Todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus"

Rm 8:28

OFEREÇO

À Deus por nunca me desamparar, pela força direcionada a mim, por toda sua misericórdia nos momentos mais difíceis e de aflições. Nada somos sem a presença de Deus em nossas vidas, pois o Senhor é meu pastor e nada me faltará.

Sl23:1

DEDICO

Aos meus pais,

Eugenio Luiz Sarcinelli e Rutilea Freire Sarcinelli,

pelo amor incondicional, por todas as orações por tudo que sempre fizeram por mim, por nunca me desampararem e por estarem sempre comigo em todas as dificuldades e na superação delas. Nada seria sem vocês. Vocês são a minha base, meu alicerce e dedico a vocês mais essa grande vitória em minha vida. Amo vocês demais, vocês são minha referência, minha inspiração e força.

Aos meus irmãos,

Renata Freire Sarcinelli e Victor Freire Sarcinelli,

por tudo que sempre fizeram por mim, pelo amor fraternal e por sempre aceitarem a minha ausência em datas especiais, por todas as vezes que mesmo de longe se preocuparam comigo. Vocês são muito importantes para mim. Amo vocês do fundo do meu coração, meus eternos nêns.

À minha amiga e irmã escolhida pelo coração,
Katiani Silva Venturini, *por toda amizade, compreensão, conselhos e por ser um anjo enviado por Deus em minha vida. Amo você miga meu!!!*

À todos os meus amigos e familiares por sempre estarem ao meu lado, perto ou mesmo de longe.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS, por me mostrar os caminhos nas horas incertas e por suprir todas as minhas necessidades, pois sem Ele nada somos, nada aprendemos e em nenhum lugar chegamos.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Nilva Kazue Sakomura, pela confiança depositada em mim, por toda oportunidade e até mesmo todos os puxões de orelha, me mostrando o melhor caminho a seguir;

Agradeço ao meu co-orientador Prof^o Dr^o Edney Pereira da Silva, pela amizade pelos ensinamentos e por esta sempre disponível em me ajudar mesmo nos piores momentos.

Agradeço aos membros da banca de defesa, Prof^a Dr^a Simara Marcato, Prof^a Dr^a Sandra Regina Pinheiro, Prof^o Dr^o Nelson José Peruzzi e a Dr^a Nayara Tavares Ferreira por toda contribuição e correção para elaboração do trabalho.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Prof^a Dr^a Sílvana Artoni Martínez, Prof^o Dr^o Euclides Braga Malheiros, Dr^a Nayara Tavares Ferreira e Dr^o Marcos José Bastista dos Santos, pelas sugestões e correções, pois foram de grande valia para melhorar a tese.

Agradeço ao meu amado pai Eugenio Luiz Sarcinelli e minha querida mãe Rutílea Freire Sarcinelli, pois sem vocês eu não conseguiria chegar aqui. Agradeço imensamente a Deus por ter me dado a dádiva de ser filha de vocês. Vocês sempre foram e sempre serão a minha base, o meu alicerce e se hoje estou terminando esse Doutorado, certamente é porque vocês nunca desistiram de mim, em nenhum momento. Sem vocês nada sou. Eu amo vocês demais.

Agradeço aos meus irmãos, Renata Freire Sarcinelli e Victor Freire Sarcinelli, por todo carinho e amor que sempre tiveram por mim e ainda por entenderem minha ausência em momentos importantes na vida de vocês. Vocês sempre foram minhas crianças, meus nêns. Espero que uma dia possam sentir orgulho de mim. Agradeço também a minha cunhada Vanusa de Oliveira Sarcinelli, por todo apoio e carinho.

Agradeço aos meus sobrinhos, João Victor de Oliveira Sarcinelli e Jônatas de Oliveira Sarcinelli por todo carinho e amor dedicado a mim e por entenderem a minha ausência. A tia é completamente louca por vocês e sente falta de vocês todos os dias. Meus pequenos amores.

Agradeço a minha querida amiga-irmã, Dr^a Katiani Silva Venturini, pelos quase 15 anos de amizade, por toda compreensão, por sempre acreditar em mim, mostrando sempre o caminho, fazendo parte da minha vida nos momentos bons e ruins. Miga meu, você me enche de orgulho e peço a Deus que te sustente nessa nova etapa da sua vida. E lembre-se eu estarei sempre com você, não importa a distância. Você está realizando seu sonho de trabalhar com pesquisa em uma ótima empresa. Deus é perfeito, e pode ter certeza se Ele te deu um cargo de confiança é porque está te honrando, pois ninguém mais do que Ele, sabe tudo que você passou para chegar onde chegou. Amo Você Miga Meu Forever!! Meu Orgulho.

Agradeço a toda minha família e a família da Katy por todo apoio em todos os momentos.

Agradeço ao amigo e companheiro de equipe Juliano de César Paula Dorigam, por todas as risadas e ajuda na elaboração dos artigos. Sempre teve muita paciência em me ajudar. Obrigada Kaka!!!

Agradeço imensamente aos meus queridos amigos que Jaboticabal me deu: Ana Carolina Tozzo Guimarães (Carol); Bruno Balbino Leme (Bruu), Camila Angélica Gonçalves (Cá), Daniella Donato (Dani), Fabrício Hada (Japonês), Gabriel Caetano Ferreira (Covi), Joyce Sato (Joy), Leticia Soares (Pombii), Leticia Pacheco (Lê), Marcela Bergamo (Má), Rafael Massami Suzuki (Kuki), Paulo Matsumura Júnior (Cookie), saiba que vocês me proporcionaram várias risadas e momentos incríveis em Jabuka, onde estiver sempre lembrarei de vocês com muito carinho.

Agradeço aos meus queridos estagiários: Bruno, Cookie, Danilo dos Santos, Felipe Fabbri (Torcido), Felipe Galetti (Celulari), Fernando Rodrigues (Kunutoko), Guilherme Henrique Silva (Espiga), Isabela Trevizani (Isa), Larissa Vargas (Pioia), Mateus Roberto (Distrutor^{VIII}), Maria Soban (Garrafinha) e Thaísa (Lorota). Vocês fizeram parte de minha trajetória em Jabuka e sem vocês não seria possível a realização desse trabalho, pois vocês estavam sempre ali, dispostos. Obrigada por tudo Meninos!!!

Agradeço a equipe de trabalho: Allan Reis Troni, Camila, Dani, Fernando Andres, Gabriel Villela, Katy, Karla Matinez, Kuki-dá, Lê, Mariana Quintino, Michele Bernardino, Nayara Tavares, Pomba,

Raian Malta, Vinicius Duarte, Warley Junior e a todos estagiários que fizeram parte desse trabalho. Obrigada!!!

Agradeço aos meus amigos da República Amoribunda: Cookie, Covi, Kuki, Rafael Henrique Marques (Passivo), Rafael Sato (Chupeta), Rodrigo Gravena (Bago) e aos meus amigos queridos de Jabuka: Annita Girardi, Fernando Alari (Gracinha), Marcos Monteiro (Chileno), Mayara Peixoto, Thaila Putarov, obrigada a cada um de vocês pela amizade, risadas e churras!! Vocês fizeram meus dias melhores em Jaboticabal.

Agradeço aos funcionários do Aviário: Izildinho, Robson e Vicente por toda amizade, disponibilidade e ajuda.

Agradeço aos funcionários da fábrica de ração Helinho e Lucas por toda amizade e ajuda.

Agradeço ao pessoal da Pós-graduação: Branca, Diego, Hugo, Márcia e Moyses, por toda a disponibilidade e atenção.

Aos meus professores do CCA-UFES pois sempre me lembro de cada ensinamento, aprendizado e conselhos destinados a mim e só estou terminando mais uma etapa, vocês tem grande responsabilidade nisso.

A Granja VICAMI pela doação dos ovos, viabilizando o experimento.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPESP pela concessão do auxílio financeiro para execução do projeto.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para realização do meu trabalho.

Muito obrigada a cada um de vocês!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.INTRODUÇÃO	1
2.CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2- MODELLING QUAIL RESPONSES TO LYSINE INTAKE	16
ABSTRACT	16
INTRODUCTION.....	17
MATERIAL AND METHODS.....	18
RESULTS.....	24
DISCUSSION	28
REFERENCES.....	32
CAPÍTULO 3 – RESPONSES OF JAPANESE QUAILS TO THREONINE, TRYPTOPHAN AND METHIONINE+CYSTINE INTAKES	35
ABSTRACT	35
INTRODUCTION.....	37
MATERIAL AND METHODS.....	38
RESULTS.....	45
DISCUSSION	56
REFERENCES.....	60
CAPÍTULO 4 – INGESTÃO ÓTIMA ECONÔMICA DE LISINA, TREONINA, METIONINA + CISTINA E TRIPTOFANO PARA CODORNAS JAPONESAS.....	67
RESUMO	67
INTRODUÇÃO.....	69
MATERIAL E METODOS.....	70
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO	86
REFERÊNCIAS.....	89

MODELO MATEMÁTICO PARA ESTIMAR OS NÍVEIS ÓTIMO DE LISINA, METIONINA+CISTINA, TREONINA E TRIPTOFANO PARA CODORNAS JAPONESAS EM PRODUÇÃO

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa determinar as respostas de codornas japonesas e a elaboração de modelos matemáticos para determinar o nível ótimo dessas aves à ingestão de lisina, metionina+cistina, treonina e triptofano com base no modelo fatorial. Foram realizados quatro ensaios experimentais, utilizando 392 codornas japonesas no pico de postura em cada ensaio. Os ensaios foram delineados inteiramente ao acaso, com sete tratamentos e sete repetições compostas por sete aves. Os tratamentos consistiram de níveis crescentes de cada aminoácido teste. Os níveis propostos de lisina variaram de 0,402 a 1,409%, met+cis de 0,347 a 1,155%, treonina de 0,254 a 0,845% e triptofano de 0,089 a 0,296% dos aminoácidos teste. Esses níveis foram estabelecidos para compreender todas as exigências (manutenção, resposta e estabilidade ou platô de resposta). Para cada aminoácido foi estudado um nível controle com objetivo de confirmar a limitação do respectivo aminoácido teste. O período experimental foi de sete semanas, sendo três de adaptação e as outras quatro para elaboração do modelo fatorial. Nesse período foram acompanhados o consumo de ração, a produção de ovos, o peso de ovos e o peso corporal. As variáveis estudadas foram, consumo de ração (g), consumo do aminoácido teste (g/ave/dia), peso médio do ovo (g), massa de ovos (g) e peso das aves (g). As respostas de produção foram ajustadas pelo modelo broken line e modelo fatorial para fracionar as exigências em manutenção e produção de ovos, bem como calcular o nível para otimizar a massa de ovos da população. Além disso foi estimado as exigências dos aminoácidos pelo Reading Model. O modelo broken line estimou a máxima resposta para massa de ovos de 9,67; 9,31; 9,49 e 10,37 g / d

para Lis, Thr, Met + Cys e Trp, respectivamente. Os valores de m determinados pela função monomolecular foram de 156, 64, 176 e 47 mg / BWkg^{0,75} por dia e os valores de a determinados pela linha tracejada com duas inclinações foram de 21, 17, 15 e 4 mg / g para Lis, Thr, Met + Cys e Trp. A ingestão de aminoácidos, a produção de massa de ovos (**EO**) e peso corporal (**PC**) foram utilizadas para ajustar os parâmetros do Reading Model. Com base nos parâmetros foi aplicado o método da equação exata e de simulação considerando, 10.000 aves. A recomendação de ótimo econômico baseada na equação exata foi 308, 231, 189 e 65 mg de Lys, MetCys, Thr e Trp por ave.dia, respectivamente. Aplicando a simulação a recomendação para Lys, MetCys, Thr e Trp foi de 287, 219, 181 e 63 mg por ave.dia, respectivamente.

Palavras- chaves: aminoácidos, manutenção, massa de ovos, reading model

MATHEMATICAL MODEL TO ESTIMATE THE OPTIMUM LEVELS OF LYSINE, METHIONINE + CYSTINE, THREONINE AND TRYPTOPHAN FOR JAPANESE QUAILS IN PRODUCTION

SUMMARY

The objective of this research was to determine the responses to Japanese quails and the elaboration of mathematical models for the determination of the levels of lysine, threonine, tryptophan and methionine + cystine water intake. Four experimental trials were carried out using 392 Japanese quails Posture peak in each test. The trials were designed entirely at random, with seven treatments and seven replicates composed of seven birds. Treatments consisted of increasing levels of each amino acid test. Proposed lysine levels ranged from 0.402 to 1.409%, met + cis from 0.347 to 1.155%, threonine from 0.254 to 0.845% and tryptophan from 0.089 to 0.296% of the test amino acids. These levels were established to understand all requirements (maintenance, response and stability or response plateau). For each amino acid a control level was studied in order to confirm the limitation of the respective amino acid test. The experimental period was seven weeks, three of them being adapted and the other four for elaboration of the factorial model. In this period, the consumption of feed, egg production, egg weight and body weight were monitored. The variables studied were feed intake (g), test amino acid consumption (g / bird / day), mean egg weight (g), egg mass (g) and bird weight (g). The production responses were adjusted by the broken line model and factorial model to fractionate the maintenance and egg production requirements, as well as to calculate the level to optimize the egg mass of the population. In addition, the amino acid requirements of the Reading Model were estimated. The broken line model estimated the maximum response for egg mass of 9.67; 9.31; 9.49 and 10.37 g / d for Lys, Thr, Met + Cys and Trp, respectively. The values of m determined by the monomolecular

function were 156, 64, 176 and 47 mg / Bwkg^{0.75} per day and the values of a determined by the dashed line with two slopes were 21, 17, 15 and 4 mg / g for Lys , Thr, Met + Cys and Trp. Amino acid intake, egg mass (EO) and body weight (BW) were used to adjust the Reading Model parameters. Based on the parameters, the exact and simulation equation method was applied considering 10,000 birds. The optimum economic recommendation based on the exact equation was 308, 231, 189 and 65 mg Lys, MetCys, Thr and Trp per day, respectively. Applying the simulation the recommendation for Lys, MetCys, Thr and Trp was 287, 219, 181 and 63 mg per day, respectively.

Keywords: amino acids, egg mass, maintainance, reading model

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Dos 20 aminoácidos que as codornas exigem apenas nove são considerados essenciais (D'Mello, 2003) e destes, apenas as exigências de lisina e dos aminoácidos sulfurosos foram avaliadas na maioria dos estudos. Contudo, estudos com treonina e triptofano são escassos. Entre as pesquisas com codornas, predominam aquelas realizadas com as japonesas (Murakami et al., 2002), no entanto, ainda há carência de informações quanto às exigências nutricionais dos aminoácidos essenciais para definição de um perfil adequado para essas aves. Para melhorar este cenário são necessários estudos sobre as exigências dos aminoácidos essenciais, sobretudo, com novas abordagens que possibilitem maior entendimento da exigência dos aminoácidos e flexibilidade no estabelecimento das exigências nas diferentes condições de produção.

As exigências aminoacídicas das aves podem ser determinadas pelo método fatorial, no qual permite maior flexibilidade no estabelecimento do nível ótimo para os animais. Além disso, este método possibilita estudar e conhecer a variação da população e a forma em que afeta a exigência da ave, permitindo determinar os níveis de aminoácidos de acordo com a variabilidade, que é específica de cada granja, bem como coincidir uma dose ótima para melhorar a resposta de desempenho com o ótimo econômico.

O Modelo de Reading (Curnow, 1973; Fisher et al., 1973; Pilbrow e Morris, 1974) tem como base o método fatorial e permite aos nutricionistas estabelecer critérios técnicos econômicos para determinar as exigências de aminoácidos. Curnow (1973) afirma que este modelo pode ser aplicado para explicar as relações entre estímulo e respostas dos animais.

Tendo em vista a importância de determinar as respostas dos aminoácidos e a escassez de trabalhos neste tema para codornas japonesas é imprescindível à realização de estudos, empregando novas abordagens para maior entendimento das respostas das aves. Sendo possível, portanto, oferecer alternativas para produtores e nutricionistas determinarem com maiores precisões as exigências de lisina, metionina+cistina, treonina e triptofano para codornas embasadas no nível ótimo.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 Origem da espécie

As codornas são aves originárias do norte da África, da Europa e da Ásia. Elas pertencem à família dos Fasianídeos (Fasianidae) e da subfamília dos Perdicionidae, fazendo parte da mesma família das galinhas e perdizes. No século XII, foram registradas as primeiras exemplares dessas aves que inicialmente eram criadas pelo seu canto. Dentre as espécies de codornas mais conhecidas, destaque-se a europeia, americana e japonesa. No ano de 1910 foram feitos pelos japoneses cruzamentos entre as espécies europeia e as selvagens. Esse cruzamento deu origem a *Coturnix coturnix japonica*, uma espécie domesticada, destinada a produção de ovos, com alta produtividade e grande precocidade (Baungartner, 1994).

As espécies mais conhecidas no Brasil são as *Coturnix coturnix coturnix* (codornas europeias ou selvagens) e as *Coturnix Coturnix japonica* (codornas japonesas ou domésticas). No entanto, existem outras espécies difundidas no mundo como as codornas americanas (*Colinus Virginianus*), sendo a mais

conhecida a Bobwhite, as chinesas (*Coturnix adansonii*) e as africanas (*Coturnix delegorguei*).

As codornas foram disseminadas no Brasil a partir da chegada dos imigrantes, mas especificamente os europeus e os japoneses. Independente de sua origem, as codornas são criadas para produção de ovos e carne (esta considerada exótica).

A precocidade sexual, rusticidade, baixo consumo alimentar, alta postura e manejo fácil tem aumentado o interesse de avicultores *pela criação dessas espécies*.

2.2 Nutrição de codornas japonesas

As informações existentes sobre a nutrição correta de codornas japonesas são escassas. Com isso, é necessário que sejam feitas pesquisas específicas com essas aves, para que possa verificar as reais necessidades das codornas japonesas em todas as suas fases de vida. Até pouco tempo atrás, as exigências nutricionais para codornas japonesas eram baseadas em galinhas poedeiras. Hoje, seguindo a tendência de outras aves, são feitos estudos para que seja possível verificar as exigências nutricionais dessas aves. Neste contexto, algumas pesquisas tem sido realizadas com aminoácidos industriais de forma que o perfil da proteína e os aminoácidos sejam supridos. Para tanto, deve-se também buscar o desenvolvimento de técnicas específicas e adaptadas para a determinação da digestibilidade dos aminoácidos dos ingredientes para codornas.

Com isso, é necessário que sejam realizadas pesquisas com nutrição para codornas japonesas, pois a maior parte do custo da criação é sobre o ração, que em

grande parte esse custo é aumentado em virtude dos ingredientes proteicos. Com a facilidade do uso de aminoácidos industriais a preços acessíveis no mercado, a redução dos níveis protéicos das rações, com a suplementação de aminoácidos industriais, passou a ser utilizado de forma a reduzir as quantidades de ingredientes protéicos e óleo de soja e, portanto, reduzir os custos das rações (Silva & Costa, 2009).

2.3 Aminoácidos limitantes na dieta de codornas japonesas

Os aminoácidos exercem importantes funções como componentes das proteínas, são essenciais para manutenção e apresentam papel essencial em vários processos metabólicos e de produção (Sakomura e Rostango, 2007)

De acordo com Andriguetto (2003), as aves não são auto-suficientes na síntese de todos os aminoácidos. A lisina, metionina, triptofano, treonina, arginina, histidina, leucina, isoleucina, fenilalanina e valina não são sintetizados pelo organismo animal, devendo ser adquiridas pela alimentação.

A ordem dos aminoácidos essenciais limitantes nas dietas para aves tem sido fonte estudada por várias décadas, existindo considerável número de publicações que afirmam que os primeiros aminoácidos limitantes para a maioria das dietas das aves são os aminoácidos sulfurosos (metionina e cistina), seguidos da lisina e da treonina (Vieira & Berres, 2007).

A lisina é o segundo aminoácido limitante em rações para aves e o interesse por estudos com esse aminoácido na alimentação de codornas se justifica principalmente pelo fato de que a lisina tem baixo custo de suplementação e pode afetar o desempenho das codornas.

Em virtude do metabolismo da lisina formar um acetoacetato, esse aminoácido é classificado como cetogênico (Stryer, 1996). Dentre as principais funções da lisina destaca-se a formação de tecidos ósseos, musculares e na síntese de carnitina, que atua no transporte de ácidos graxos para a α -oxidação na mitocôndria. O excesso de lisina pode ocasionar prejuízos metabólicos como o antagonismo com outros aminoácidos, como a arginina, uma vez que disputam o mesmo sítio de absorção.

Além disso, a lisina é um aminoácido importante na composição dos ovos, sendo portanto, que níveis inadequados de lisina podem afetar diretamente no peso e na qualidade dos ovos (Cozzolino, 1982).

Considerado aminoácido padrão no conceito de proteína ideal, a lisina tem sido utilizada como referência para estimativa das exigências dos demais aminoácidos (Barreto et al., 2006), pois, alterando seus níveis na dieta, concomitantemente, modificam-se os níveis dos outros aminoácidos (Pinto et al., 2003).

Existem alguns autores que avaliaram as exigências de lisina (Oliveira et al. 1999; Ribeiro et al. 2003; Pinto et al. 2003; Moura et al. 2007 e Perazzo et al. 2010) na dieta de codornas japonesas, no entanto, os resultados obtidos são conflitantes, variando de 0,90% (Moura et al. 2007) a 1,117% (Pinto et al. 2003).

Ribeiro et al. (2013) avaliaram a exigência de lisina digestível (0,95; 1,00; 1,05; 1,10; 1,15 e 1,20%) para codornas japonesas em postura e concluíram que para proporcionar bom desempenho e qualidade de ovos as rações de codornas devem conter 1,12% de lisina digestível ou essas aves devem consumir cerca de 272,2 mg desse aminoácido.

Demuner (2009) estudando as necessidades nutricionais de lisina digestível, sem valorização (SVal) e com a valorização (CVal) dos primeiros aminoácidos limitantes (0,83; 0,93; 1,03; 1,13; 1,23; 0,83%+CVal e 0,93%+CVal de lisina digestível), para codornas japonesas em postura conclui que o nível de 1,30%, com consumo de 309,41 mg de lisina digestível potencializa a produção das aves. Entretanto, quando utilizado a valorização dos primeiros aminoácidos limitantes, os níveis de lisina digestível aferidos não foram suficientes para maximizar a produção.

Os aminoácidos sulfurosos, met+cis, são os primeiros aminoácidos limitantes em rações para aves. A metionina caracteriza-se como um aminoácido sulfuroso, essencial e limitante para a produção de aves. Ela desempenha funções como a deposição protéica, desenvolvimento de penas, produção de ovos e atuação no metabolismo de lipídeos (Kalinowski et al., 2003). A metionina, no organismo apresenta uma relação com a cistina e, em condições normais a metionina pode ser catabolizada e convertida em cistina. Entretanto, esta conversão não é reversível, pois a cistina não pode ser convertida em metionina e por esse motivo é necessário determinar os níveis adequados destes aminoácidos, com a finalidade de manter os níveis ideais do aminoácidos (Barbosa et al., 2000).

Ainda tem a função de doar grupos metil para reações de transmetilação, especialmente na biossíntese de lipídeos e outros compostos e está envolvida no transporte de lipídeos no sangue (Patterson & Kung, 1988). A metionina é o primeiro aminoácido limitante em rações a base de milho e farelo de soja para codornas (Mandal et al., 2005).

Apesar da grande importância deste aminoácido para o adequado desenvolvimento e bom desempenho da codornas, quase não há trabalhos na literatura sobre suas exigências para essas aves. Alguns estudos foram feitos com

esses aminoácidos, Allen & Young (1980), utilizando uma dieta de farelo de soja e de caseína suplementadas com aminoácidos essenciais e ácido glutâmico, procurando determinar as exigências de proteína e aminoácidos essenciais totais para codornas, visando à máxima produção, concluíram que a exigência de 0,68% de met+cis, enquanto o NRC (1994) recomenda o nível de 0,70% de met+cis digestível para codornas japonesas e Silva & Costa (2009) recomendam níveis de 0,78 a 0,80% de met +cis digestível.

Pinto et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes relações metionina+cistina digestível: 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80 e 0,85 de metionina+cistina digestível: lisina digestível, estimaram que a relação de 0,80 melhorou a produção de massa de ovo, recomendando 0,727% de metionina+cistina digestível para dietas contendo 0,910% de lisina digestível.

A treonina é considerada o terceiro aminoácido limitante em rações a base de milho e farelo de soja para frangos e perus. A treonina não possui precursores intermediários, e o isômero D não pode ser convertido no organismo para o isômero L (D'Mello, 2003), logo, é necessário que a dieta contenha 100% das necessidades das aves. A treonina ainda está envolvida na síntese e secreção de mucina, amilase e crescimento da mucosa intestinal.

Shim & Lee (1993) reportaram que para ótima produção de ovos e eficiência alimentar, as dietas de codornas japonesas em postura devem contar 0,63% de treonina total, enquanto o NRC (1994) preconiza 0,74% de treonina total e 0,72% de treonina digestível. Em estudos mais recentes, Silva & Costa (2009) encontraram a exigência de 0,67% de treonina digestível para codornas japonesas.

O triptofano pertence à classe dos aminoácidos ditos como essenciais, ou seja, não são produzidos pelo animal, ou ainda quando produzidos é em velocidade

muito lenta, não satisfazendo as suas necessidades. Dependendo da dieta ele pode ser considerado como terceiro aminoácido limitante para aves, seguido da metionina e da lisina. Shrivstav & Panda (1990) quando determinaram a exigência de 0,18% de triptofano total para codornas japonesas. Entretanto, Leeson & Summers (1991), recomendaram 0,22% de triptofano total na dieta de codornas japonesas na fase de produção. Shim & Lee (1993) reportaram que para ótima produção de ovos e eficiência alimentar, as dietas de codornas japonesas em postura devem conter 0,18% de triptofano total. Segundo a tabela do INRA (1999), as dietas para codornas japonesas na fase de produção formuladas com 2.800 e 3.000 Kcal de EM/kg, devem conter 0,21 e 0,22% de triptofano total, respectivamente. Pinheiro et al. (2008) em estudo com codornas japonesas em postura, recomendaram o nível de 0,21% de triptofano digestível.

2.4 Métodos utilizados para determinação das exigências de aminoácidos

Na literatura são conhecidos dois métodos para estudar as respostas das aves em função da ingestão dos aminoácidos, sendo eles: dose-resposta e fatorial.

No método dose resposta, por meio de estudos com níveis do aminoácido em teste, é possível obter as respostas das aves com base no desempenho (Sakomura e Rostagno, 2016). Além disso, trata-se de um método de fácil execução e prático, no qual as exigências estudadas são utilizadas para elaboração de tabelas nutricionais, tais como: *Nutrient Requirements of Poultry* (NRC, 1994) e Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno et al. 2000; Rostagno et al. 2005; Rostagno et al. 2011).

A resposta encontrada no método dose-resposta, devido às diferenças entre os animais (manutenção e potencial de crescimento), é curvilínea (Curnow, 1973; Fisher et al., 1973; Pesti; Miller, 1997). O formato da curva pode variar de acordo com critérios de respostas adotados e com a variabilidade entre os animais.

O método fatorial é baseado que a exigência dos nutrientes deve ser fracionada para manutenção, crescimento e/ou produção. Além disso, é uma alternativa para pesquisadores e nutricionistas calcular a ingestão do aminoácido, bem como estudar o padrão de resposta da população em questão, além de possibilitar estimativas da ingestão do aminoácido de acordo com cenário econômico da cada granja.

A abordagem fatorial permite que sejam feitos modelos capazes de prever as exigências nutricionais de aves de diferentes linhagens e idades, criadas em condições climáticas e ambientais diferentes, pois a elaboração desses modelos levam em consideração as diferenças existentes no peso das aves, na composição corporal e no potencial de crescimento e produção das aves (Sakomura e Rostagno, 2007).

2.5 Modelos matemáticos para prever as exigências nutricionais das aves

Os primeiros modelos de predição das exigências de aminoácidos para aves foram desenvolvidos por Hurwitz & Bornstein (1973) para aves de postura. As exigências totais de aminoácidos foram obtidas a partir da soma das necessidades para manutenção, crescimento e produção de ovos, sendo os coeficientes que expressam cada uma destas frações determinados de maneira independente. Os autores concluíram que os modelos proporcionaram estimativas menores que os

valores recomendados na literatura, e atribuíram este resultado ao fato dos modelos considerarem a ineficiência de conversão dos aminoácidos dietéticos em proteínas do ovo.

O broken line é um modelo utilizado para interpretar resultados de experimentos com base no método dose-resposta (Siqueira et al., 2009). Robbins et al. (1979) e Pack et al. (2003) afirmaram que esse modelo proporciona uma interpretação simplificada da curva-resposta, assumindo que a utilização de um nutriente limitante é constante até que sua exigência seja suprida e que não há respostas adicionais no desempenho acima deste ponto.

O modelo de Reading, preconizado por Fisher et al. (1973), descreve a resposta da população considerando a média integrada dos indivíduos da população. As respostas dos indivíduos são obtidas a partir de modelo fatorial simples invertido. A simulação da população torna-se possível pela parametrização do modelo de Reading considerar o desvio da resposta (produção) e peso corporal. Os parâmetros deste modelo permitem simular uma população com distribuição normal para produção e peso corporal. A curva média que representa a média dos indivíduos da população tem formato sigmóidal. Este modelo tem sido largamente utilizado para prever a ingestão de aminoácido para poedeiras comerciais, de acordo com variabilidade de cada sistema produtivo e cenário econômico (Silva et al. 2015).

O modelo pode ser aplicado a qualquer situação nutricional em que o nutriente ingerido pode estar relacionado às características observáveis (resposta da ave).

2.6 Técnica da diluição como ferramenta para obter níveis crescentes das dietas experimentais

Em ensaios dose-resposta, existem duas técnicas de formulação de rações capazes de indicar o nível do aminoácido teste nas rações experimentais, sendo elas: a técnica da suplementação (D'Mello, 1982) e a técnica da diluição (Fisher e Morris, 1970).

A técnica da suplementação consiste na formulação de uma ração basal, no qual são atendidas as exigências de energia e todos os nutrientes necessários aos animais, com exceção do nutriente a ser testado. O nutriente teste é suplementado na dieta basal em diferentes níveis crescentes pela adição do aminoácido industrial.

A técnica da diluição consiste em diluir sequencialmente uma dieta alta em proteína e deficiente no aminoácido teste, com uma dieta isoenergética livre de proteína, obtendo-se os níveis intermediários do aminoácido. Esta técnica envolve a formulação de duas rações, sendo uma a base de milho farelo de soja, atendendo todos os aminoácidos exceto aquele a ser testado; e outra isenta de aminoácidos, mas atendendo todos os demais nutrientes da ração. Por meio de sucessivas diluições obtêm-se as diferentes concentrações do aminoácido a ser testado. Um diferencial desta técnica, além da amplitude dos níveis a ser testado é o perfil aminoácido inalterado entre os níveis crescentes, e isto possibilita verificar a resposta da ave à ingestão do aminoácido teste, e não ao balanço de aminoácidos da ração.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, N.K., YOUNG, R.J. Studies on the amino acid requirements of laying Japanese quail. **Poultry Science.**, v.59, n9, p.2029-2037, 1980.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMING, J. S.; GEMAEL, A.; SOUZA, G.A.; BONA FILHO, A. *Nutrição Animal*, Editora Nobel, V. 1 e 2, 2003.
- BARBOSA, R.J.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; POZZA, P.C.; NEME, R. Exigência de metionina + cistina para frangos de corte na fase de crescimento e acabamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.2, p.507-517, 2000.
- BARRETO, S.L.T.; ARAUJO, M.S.; UMIGI, R.T.; DONZELE, J.L.; ROCHA, T.C.; PINHEIRO, S.R.F.; TEIXEIRA, R.B.; ABREU, V.S.A.; SILVA R.F. Exigência nutricional de lisina para codornas européias machos de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.750-753, 2006.
- CORZO, A.; KIDD, M.T.; DOZIER, W.A.; PHAN,T.; KOUTSON, E.. Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. **The Journal of Applied Poultry Science**, v.16, p.574-582, 2007.
- COZZOLINO, S.M.F. **Valor nutricional de biomassa de *Sacharomyces cerevisiae*. Estudo em gerações sucessivas de ratos.** São Paulo, 1982. 147p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, 1982.
- CURNOW, R.N. A smooth population response curve based on an abrupt threshold and plateau model for individuals. *Biometrics*, 29(1):1-10, 1973.
- DEMUNER, L.F.; VARGAS, J.G.; SCOTTA, B.A. et al. Níveis nutricionais de lisina digestível para codornas japonesas alimentadas com rações contendo 19,5% de proteína bruta. In: ZOOTECA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ZOOTECA, 20, 2009, Águas de Lindóia-SP. Anais... Águas de Lindóia: ZOOTECA 2009.

- D'MELLO, J.P.F. Responses of growing poultry to amino acids. In: D'MELLO, J.P.F. **Amino acid in animal nutrition**. 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003. p.237-264.
- FISHER, C.; MORRIS, T. R. The determination of the methionine requirements of laying pullets by a diet dilution technique. **British Poultry Science**, v. 11, p. 67-82, 1970.
- FISHER, C. et al. A model for the description and prediction of the response of laying hens to amino acid intake. **British Poultry Science**, v.14, p.469-484, 1973.
- HAN, Y., SUZUKI, H., PARSONS, C.M.; BAKER, D.H. Amino acid fortification of low protein corn and soybean meal diet for chicks. **Poultry Science**. V.71, p.1168-1178, 1992.
- HURWITZ, S.; BORNSTEIN, S. The protein and amino acid requirement of laying hens: suggest models for calculations. **Poultry Science**, Savoy, v.52, p.1124-1134, 1973.
- INRA En: **L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles**. 2^aed. INRA, Paris, Cedex, Francia.1989.
- KALINOWSKI, A.; MORAN JR., E.T.; WYATT, C. Methionine and cystine requirements of slow-and fast-feathering male broilers from three to six weeks of age. **Poultry Science**, v.82, p.1428-1437, 2003.
- KLASING, K. **Comparative avian nutrition**. Wallingford: CABI Publishing, 1998. 350p. LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. 4th ed. Guelph: University Books, 2001. 591p.
- KESHAVARZ, K. Investigation on the possibility of reducing protein phosphorus and calcium requirements of laying hens by manipulation of time of access to these nutrients. **Poultry Science**, v.77, p.1320-1332, 1998.

- MANDAL, A.B.; ELANGO VAN, A.V.; TYAGI, P.K.; TYAGI, P.K.; TYAGI, A.K.J.; KAUR, S. Effect of enzyme supplementation on the metabolizable energy content of solvent-extracted rapeseed and sunflower seed meals for chicken, guinea fowl and quail. **British Poultry Science**, v. 46, p.75-79. 2005.
- MURAKAMI, A.E.; MORAES, V.M.B.; ARIKI, J.; JUNQUEIRA, O.M.; KRONKA, S.N. Níveis de proteína e energia de rações para codornas japonesas em postura. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.22, n4, p.541-551, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of poultry**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1994. p.44-45.
- OLIVEIRA, A.M.; FURLAN, A.C.; MURAKAMI, A.E.; SCAPINELLO, I.M.; MARTINS, E.N. Exigência nutricional de lisina para codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.5, p.1050-1053, 1999.
- PATTERSON, J. A.; KUNG Jr., L. Metabolism of DL-methionine and methionine analogues by rumen microorganisms. **Journal of Dairy Science**, 71: 3292-3301, 1988.
- PERAZZO, F.G. Relação entre exigências nutricionais x qualidade de ovos em dietas de codornas japonesas. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL E III CONGRESSO BRASILEIRO DE COTURNICULTURA, 2010, Lavras **Anais...** Lavras: Universidade federal de Lavras, 235 p., 2010.
- PILBROW, P. J.; MORRIS, T. R. Comparison of lysine requirements amongst eight stocks of laying fowl. **British Poultry Science**, v.15, p.51-73, 1974.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; DONZELE, J.L.; SILVA, M.A.; SOARES, R.T.R.N.; CUSTÓDIO, G.S.; PENA, K.S. Exigência de lisina para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1182-1189, 2003.

RIBEIRO, C.L.N.; BARRETO, S.L.T.; REIS, R.S. et al. Digestible lysine levels in diets for laying Japanese quails. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.42, n.7, p. 489- 485, 2013.

ROBEL, E.J.A. Featherabnormality in chicks fed diets deficient in certain amino acids. **Poultry Science**, v.56, p.1968-1971, 1977.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.M.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011.

Shim KF, Lee TK. Effect of dietary essential amino acids on egg production of laying Japanese quail. *Singapore Journal of Primary Industries* 1993; 21:72-5.

SHRIVASTAV, A.K., PAMDA, B. Review of quail nutrition research in India. **World's Poultry Science**. V.55, n.1, p.73-81, 1990.

SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. **Tabelas para codornas japonesas e europeias**. Editora: Funep, 2009, 107 p.

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed. 1000p, 1996.

THRONTON, S.A., CORZO, A., PHARR, G.T. et al. Valine requirements for immune and growth responses in broilers from 3 to 6 weeks of age. **British Poultry Science**, v.47, p.190-199, 2006.

VIEIRA, S.L.; BERRES, J. El Cuarto Aminoácido Limitante para Pollos de Engorde.

In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA, 20. 2007, Porto Alegre.

Anais... Porto Alegre, RS, 2007. p. 143-152.

Capítulo 2 - Modeling Quail Responses to Lysine Intake

ABSTRACT. Studies on Japanese quails have been carried out using the dose response method and to date there are few studies about the response of quails to intake of amino acids, such as lysine (Lys). Thus, the objectives of this study were to: (1) determine an optimal adaptation period for Lys requirement studies with quails, (2) estimate Lys maintenance requirements, (3) determine Lys utilization efficiency, and (4) develop a factorial model for quail. The trial was conducted in a completely random design, with eight concentrations of Lys and seven replicates with seven quail chicks per experimental unit. The experiment began at 14 weeks of age, with birds at peak production, and finished after 10 weeks of data collection. The variables analyzed were feed intake, Lys intake, body weight (BW), egg production, egg weight, weight gain, and egg output (EO). The responses of quails to Lys intake were evaluated using broken line equation, and Lys requirements for maintenance and for EO were estimated using monomolecular function. The results confirmed that three weeks of adaptation and a four-week data collection period were enough for quails to adapt and stabilize their responses to experimental diets. The Lys requirements for maintenance and for egg output were estimated to be $156 \text{ mg/BWkg}^{0.75}$ per day and 21 mg/g, respectively. These results were used to develop the following model: $\text{Lys} = 21 \cdot \text{EO} + 156 \cdot \text{BW}^{0.75}$. The current study provides procedures and methods designed for quail as well as a simple and flexible model that can be quickly adopted by technicians and poultry companies. Future studies should refine the coefficients proposed here, especially with regard to maintenance requirements.

Keywords: egg production; factor model; maintenance, adaptation period

INTRODUCTION

Quail production has assumed worldwide importance in the last decade due to the potential of these birds for egg production. Currently, large farms house more than 100,000 birds in automated low-cost production systems that provide a regular supply of eggs with good quality to the market (Bertechini, 2012). On the other hand, researchers have often neglected studies on quail nutritional requirements. This lack of technical knowledge results in low-efficiency nutrient utilization, increasing production costs and decreasing potential revenues.

The “ideal protein” concept represents the most commonly used method for the determination of amino acid requirements in several farm animals, including birds. It uses lysine (Lys) as the reference amino acid and yields ideal ratios between other amino acids and the reference (i.e., AA:Lys ratio). Naturally, models based on this concept will only function starting from an accurate estimate of Lys requirements.

Previous studies estimated quail Lys requirements at 275 mg/bird (Garcia *et al.*, 2005) and 272 mg/bird (Ribeiro *et al.*, 2013). However, these studies used simple Lys supplementation methods that yield a dose-response curve, with little flexibility for changes in input or desired output variables. Models that are more complete must include, as a starting point, estimates of maintenance requirements and amino acid utilization efficiency to predict average body weight gain and egg output in population with different Lys intakes.

Additionally, in previous studies with Japanese quail, data collection spanned long periods ranging from 84 to 140 days (Garcia *et al.*, 2005, Ribeiro *et al.*, 2013). However, no research efforts have focused on determining the length of time that quails require to adapt to the experimental diets, to stabilize responses and support

statistical analysis with appropriate inferences. In short, there is no evidence to support such long studies.

In order to improve a methodological procedure, we investigated and determined an optimal adaptation period for amino acid studies with quails. Additionally, following the newly established adaptation protocol, we used a serial dilution technique to estimate Lys maintenance requirements and utilization efficiency to develop a factorial model for Japanese quails.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Committee approval

The experiment was conducted at the Poultry Science Laboratory of Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences (FCAV) of the Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), Jaboticabal, Brazil. The objectives of this study were to determine an optimal adaptation period for amino acid studies with quails and to estimate Lys maintenance requirements and utilization efficiency to develop a factorial model. The Ethics Committee on Animal Use of UNESP (CEUA) approved all experimental procedures used in this study under the protocol number n^o 9999/14.

Birds and experimental design

The Japanese quails were housed in a conventional shed with experimental units composed of cages with seven birds (density of 239 cm²/bird). Prior to the start of the experiment, the birds were fed a standard diet to meet the nutritional requirements of quails (Rostagno *et al.*, 2011). Three hundred ninety-two Japanese quails in laying phase were distributed in a completely randomized design with eight treatments (Lys concentrations) and seven replications of seven birds per

experimental unit. The experiment started with birds at 14 weeks of age and data were collected for 10 weeks, thus ending at 24 weeks of age. The lighting program adopted was 16 hours of light and eight hours of dark. The maximum and minimum temperature recorded were 32 ± 0.46 °C and 15 ± 0.36 °C, respectively. In addition, the maximum and minimum relative humidity recorded were $58 \pm 1.59\%$ and $21 \pm 0.66\%$, respectively.

Experimental diets

The experimental diets were formulated by dilution technique as described by Fisher and Morris (1970). Initially, two diets were formulated: one summit diet with high protein content (L7) and another diet free of protein (L0). The L7 diet was formulated to contain respectively 1.20 and 1.4 times the recommendation of lysine and other amino acids based on recommendations of Rostagno *et al.* (2011). For vitamins, minerals, and energy, the minimum recommendations of Rostagno *et al.* (2011) were considered. This procedure was used to ensure that lysine was the first limiting amino acid in the dietary protein with a relative deficiency of 20% as recommended by Fisher and Morris (1970). The amino acid content of the ingredients used in the formulation was analyzed by Evonik Industries using a Near Infrared Spectrometer (NIRS). The values were converted into digestible basis using digestibility coefficients from Rostagno *et al.* (2011). The L0 diet was formulated to contain the same concentrations of energy, minerals, and vitamins as the L7 diet, except for protein and amino acids (Table 1).

Table 1. Composition (g/kg) of the summit and protein free diets

Ingredients	Summit (L7)	Protein free (L0)
Soybean Meal	344.00	
Corn	473.00	
Corn Gluten 60%	53.40	
Soybean Oil	25.00	40.70
Dicalcium Phosphate	10.90	16.40
Limestone	67.60	63.00
Salt	3.20	3.20
Choline Chloride (60%)	1.00	
Mineral And Vitamin Premix ⁽¹⁾	4.00	4.00
DL- Methionine (99%) (4)	6.10	
L-Lysine HCl (78%)	3.60	
L-Threonine	1.20	
L-Valine	1.50	
L-Isoleucine	0.60	
L-Arginine	4.00	
L-Tryptophan	0.80	
Potassium Chloride		17.60
Corn Starch		517.00
Sugar		150.00
Rice Husk		150.00
Inert filler ⁽²⁾		38.00
Antioxidant ⁽³⁾	0.10	0.10
Nutritional composition ⁽⁴⁾		
Metabolizable energy (kcal/kg)	2800	2800
Crude Protein	257.50	0.10
Digestible methionine + cystine	12.40	
Digestible methionine	9.20	
Digestible lysine	13.00	
Digestible tryptophan	3.20	
Digestible threonine	9.10	
Digestible arginine	17.50	
Digestible valine	11.30	
Digestible isoleucine	9.80	
Digestible phenylalanine	11.20	

(1) Content (per kg of the diet)- Vit. A 1.750.000 U.I.; Vit. D3 500.000 U.I.; Vit. E 2.000 U.I.; Vit. K3 500 mg; Vit. B1 250 mg; Vit. B2 875 mg; Vit. B6 500 mg; Vit. B12 1.250 mcg/kg; Niacin 6.250 mg; Chlorine 65 g; pantothenate acid 2.500 mg; Copper 2.000 mg/kg; iron 12,500 g; Manganese 17,500 g; Zinc 12,500 g; Iodine 300 mg; Selenium 50 mg. (2) Inert filler - Washed sand ; (3)-butyl hydroxy toluene. BHT; (4) Analyzed amino acid composition and digestible content calculated using coefficients from Rostagno et al. (2011).

Intermediate concentrations of digestible lysine were obtained by properly mixing the L7 and L0 diets in the following proportions: 19:81 for L1, 37:63 for L2, 46:54 for L3, 56:44 for L4, 74:26 for L5, 84:16 for L6, 100:0 for L7, and 19:81 for L8 (control diet). Thus, the resulting digestible lysine concentrations obtained were: 2.6 g/kg for L1, 5.2 g/kg for L2, 6.5 g/kg for L3, 7.8 g/kg for L4, 10.4 g/kg for L5, 11.17 g/kg for L6, and 13.0 g/kg for L7. The L8 concentration was included to confirm that lysine was actually the first limiting amino acid in the dietary protein of the diets L1–7. This diet was obtained by adding 1.61 g of L-Lysine HCl (78%) per kg of L1 diet (L1 + 1.61 g/kg of L-Lysine HCl (78%). Data obtained for L8 diet were used only to validate the limitation of lysine and were excluded from statistical analyses.

Management and data collection

During the experimental period, water was provided *ad libitum* and the experimental diets were provided twice a day. The leftovers were weighed to measure weekly feed intake. The lysine intake was estimated by multiplying feed intake data by the concentration of digestible lysine in the diets. The egg production was recorded daily and the egg weight was measured three times a week. The body weight of the quails was measured at the first, third, sixth, and tenth week of experiment. The egg output was obtained by multiplying egg production by egg weight. At the end of the experiment, the variables obtained for analysis were lysine intake, feed intake (FI), body weight (BW), weight gain (WG), egg production (EP), egg weight (EW), and egg output (EO).

Analysis of the adaptation period and the stabilization of quail responses to experimental diets

In order to standardize the minimum period for data collection, the different periods of adaptation for quails to the experimental diets were analyzed by fixing the collection period in four weeks. Thus, data were grouped considering three, four, five, and six weeks of adaptation. This data analysis considered the relationship between lysine intake and egg output. The egg output was used in the analysis because it is one of the most important production parameters, considering both egg production and egg weight.

In order to define in which period the quails stabilized their responses, the broken line function was adjusted (Robbins *et al.*, 2006), considering the relationship between lysine intake and egg output. The broken line function used was:

$$Y=L+U\times(R-X), \quad [\text{Eq 1.}]$$

where Y is the egg output response; X is the digestible lysine intake (mg/bird per day) and L is the response plateau; R is the break point; and U is the slope of the function. The period was chosen by the best fit of the function to the data based on statistical criteria (AIC and BIC).

Evaluation of the responses of quails to lysine intake

After defining the best adaptation period for quails, the optimal lysine intake for feed intake, egg production, egg weight, body weight, and weight gain were also estimated using Equation 1.

Estimate of lysine requirement for maintenance

The lysine intake and egg output were related to the metabolic body weight of quails ($BW_{\text{kg}}^{0.75}$), and thus were converted into $\text{mg}/BW_{\text{kg}}^{0.75}$ per day for lysine intake and $\text{g}/BW_{\text{kg}}^{0.75}$ per day for egg output. The maintenance requirement was obtained

by exponential relationship using the monomolecular function as described by Kebreab *et al.* (2008):

$$Y = a \times [1 - e^{-b \times (X - m)}], \quad [\text{Eq. 2}]$$

where Y is the egg output ($\text{g/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day); X is the lysine intake ($\text{mg/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day); a is the maximum response for egg output or E_{max} ($\text{g/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day); b is the slope of the function; and m is the maintenance requirement ($\text{mg/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day). The Lys requirement for maintenance was obtained by calculating the monomolecular function for $EO=0$.

Efficiency of utilization of lysine and the lysine requirement per unit of egg output

The efficiency of utilization (k) and lysine requirement per unit of egg output (a) were calculated as follows: $k = D/I_c$, where D is the lysine deposition obtained by multiplying egg output by the concentration of lysine in the egg (1.71%; Genchev, 2012) according to the expression $D = EO \times (1.17/100)$, and I_c is the lysine intake corrected for maintenance obtained by the difference between the total intake of Lys (I) minus the amount calculated for the maintenance (m), i.e., $I_c = I - m$. The a value was obtained by dividing the mg of I_c by the g of egg output ($a = I_c/EO$). The k and a values calculated for each experimental unit were regressed as a function of I , using the broken line function with two inclinations (Robbins *et al.*, 2006) to explain the relationship between the variables, as follows:

$$Y = L + U \times (R - X) + V \times (X - R), \quad [\text{Eq. 3}]$$

where Y is the response (a or k); X is the digestible lysine intake (mg/bird per day) and L is the response plateau; R is the breakpoint; U and V are the function's slopes.

Developing a factorial model to calculate the lysine intake for quail

Based on the coefficients a and m determined, a model was parameterized to calculate the lysine intake. The model design to calculate Lys intake is:

$$I = axEO + mxBW, \quad [\text{Eq. 4}]$$

where egg output (EO) and body weight (BW) are the input variables. Assigning EO as the response variable in equation 4 allows calculating the EO response in function of lysine intake as follows:

$$EO = (I - (m \cdot BW)) / a, \quad [\text{Eq. 5}]$$

RESULTS

We used egg output response to define an optimal adaptation period for the experiment. Table 2 shows equation 1 parameters and the statistical adjustment for adaptation periods ranging from 3 to 6 weeks. The lowest AIC and BIC values were obtained for the three-week adaptation period, which was thus employed in the current study.

Table 2. Feed intake, egg weight and rate of lay adjusted by the broken-line; and fat composition adjusted by the linear regression methods, as a function of digestible lysine intake for quails

	Adaptation period, weeks			
	Three	Four	Five	Six
	$\mu \pm SE$	$\mu \pm SE$	$\mu \pm SE$	$\mu \pm SE$
L	8.90±0.160	8.49±0.150	8.04±0.020	7.80±0.020
U	-0.0521±0.003	-0.0492±0.003	-0.0456±0.003	-0.0444±0.003
R	201±7.0	203±8	204±10.58	206±10.00
<i>P-value</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
R ²	0.98	0.98	0.99	0.98
AIC	114.9	131.7	144.3	152.7
BIC	124.4	141.2	153.8	162.7

μ = Means

SE= standard error

L is the maximum response

U is the slope of the broken line function

R is the breakpoint of the broken line function

R² is the coefficient of determination

Quail responses to different dietary lysine concentrations during the experimental period, which followed the three-week adaptation period, are shown in Table 3. The L8 diet was included to validate the technique used and, based on quail responses (Lys intake, FI, EP, EW, BW, and WG), it was verified that Lys was, in fact, the first limiting amino acid. When compared to birds on the L1 diet, those on the L8 diet consumed an additional 37.5 mg/bird per day of Lys, another 2.5 g/bird per day of total FI, had 3.5% higher EP, laid eggs that were on average 0.2 g heavier, and gained an additional 17 g of BW. These responses confirmed that quails required lysine to respond to the imposed dietary restriction.

The FI, EP, EW, BW, and WG were affected ($P < 0.01$) by dietary Lys concentrations (Table 2). The Lys concentrations in L1, L2, L3, L4, L6, and L7 diets corresponded to a change in amino acid concentration of, respectively -75%, -50%, -38%, -25%, + 8%, and + 25% in comparison to the L5 diet (10.4 g/kg) which resulted in 0 weight gain. The FI reduced by 57%, 29%, 12%, and 0.05% for the first four Lys concentrations and increased by 0.03% and 0.05% for the last two concentrations. Japanese quails were especially sensitive regarding EP, which was reduced by 96%, 67%, 25%, and 0.03% in the first four concentrations, and increased by 0.10% and 0.05% with L6 and L7, respectively. The EW ranged from 7.2 to 11.1 g, between L1 and L7, a 54% increase in response to dietary Lys.

The relation between each response evaluated and Lys intake was adjusted by equation 1 and generated breaks at the following points for each response: 24.071 g/bird per day for FI; 84.663% for EP; 11.107 g for EW; 0.173 kg for BW; and 0.009 kg for WG. These values were obtained with Lys intakes between 174–261 mg/bird per day.

1 **Table 3.** Mean (\pm standard error) and model broken line lysine intake, feed intake, egg production, egg weight, body weight and weight gain of
 2 quails submitted to different digestible lysine levels in the diet

Die t	Digestible lysine content (g/kg)	Lysine Intake (mg/d)	Feed Intake (g/bird/d)	Egg production (%)	Egg weight (g)	Body weight (kg)	Weight gain (Kg)
L1	2.6	30.02 \pm 3,22	11.1 \pm 1.4	2.5 \pm 0.42	7.20 \pm 0.08	0.106 \pm 0.019	-0.061 \pm 0.007
L2	5.2	83.70 \pm 2,00	16.5 \pm 0.4	33.88 \pm 3.35	8.20 \pm 0.17	0.134 \pm 0.008	-0.031 \pm 0.003
L3	6.5	120.93 \pm 1.83	20.4 \pm 0.3	58.83 \pm 3.23	8.70 \pm 0.14	0.147 \pm 0.004	-0.019 \pm 0.001
L4	7.8	162.70 \pm 4.16	22.1 \pm 0.8	75.43 \pm 3.36	9.42 \pm 0.10	0.164 \pm 0.014	-0.002 \pm 0.005
L5	10.4	238.65 \pm 5.22	23.3 \pm 0.8	85.47 \pm 2.52	10.70 \pm 0.12	0.166 \pm 0.014	0.000 \pm 0.006
L6	11.2	268.10 \pm 3.80	24.0 \pm 0.3	86.37 \pm 1.89	11.20 \pm 0.30	0.175 \pm 0.05	0.006 \pm 0.001
L7	13.0	307.96 \pm 5.84	24.5 \pm 0.9	86.82 \pm 1.69	11.03 \pm 0.12	0.178 \pm 0.020	0.012 \pm 0.007
L8 ¹	5.2	67.53 \pm 6.45	13.6 \pm 1.0	6.02 \pm 2.20	7.67 \pm 0.15	0.123 \pm 0.014	-0.053 \pm 0.001
Broken line							
L			24.071 \pm 0.228	84.6638 \pm 1.401	11.1071 \pm 0.122	0.173 \pm 0.020	0.009 \pm 0.003
U			-0.0782 \pm 0.004	-0.5797 \pm 0.026	0.0169 \pm 0.0107	-0.4327 \pm 0.003	-0.0004 \pm 0.002
R			192 \pm 6.870	174 \pm 4.819	261 \pm 11.092	182 \pm 9.340	190 \pm 0.940
R ²			0.96	0.96	0.94	0.98	0.98
P		<0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001

3 Control diet. ¹ N8_{Lys}=1,61g Lysina HCl 78%/kg N1_{Lys}

4

5

6

7

8

9

10

11

The Lys requirement for maintenance of $156 \text{ mg/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day was obtained by calculating equation 2 for $\text{EO}=0$ (Figure 1).

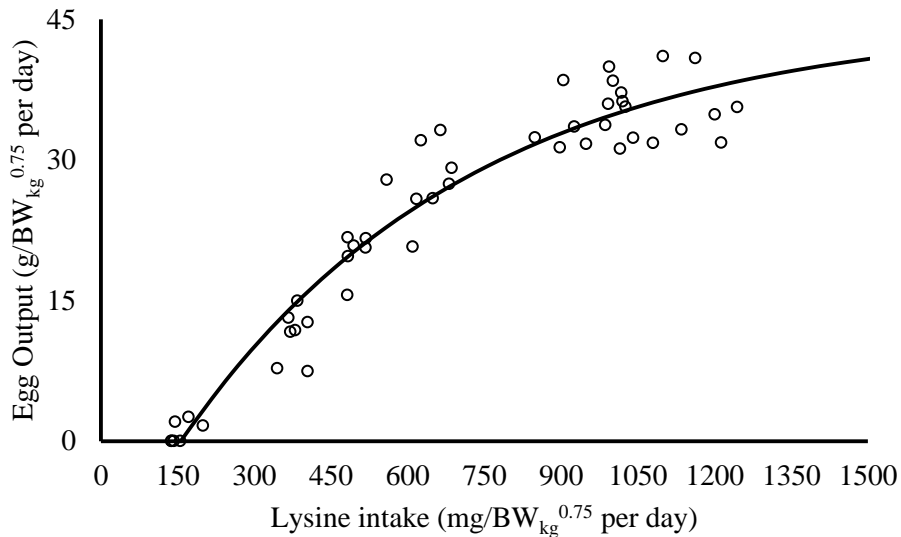


Figure 1. Lysine for maintenance estimated as a function of intake lysine

The efficiency (k) and requirement (a) values were regressed as a function of Lys intake using equation 3 (Figure 2). The estimated values for L , U , V , and R were 80, 0.27, 0.35, and 150, respectively for variable k as a function of Lys intake. For variable a , the parameters L , U , V , and R were 21, 0.1915, 0.08, and 150, respectively. Results show that the break points for k and a were 80% and 21 mg per g of EO, respectively, obtained with a Lys intake of 150 mg/bird per day.

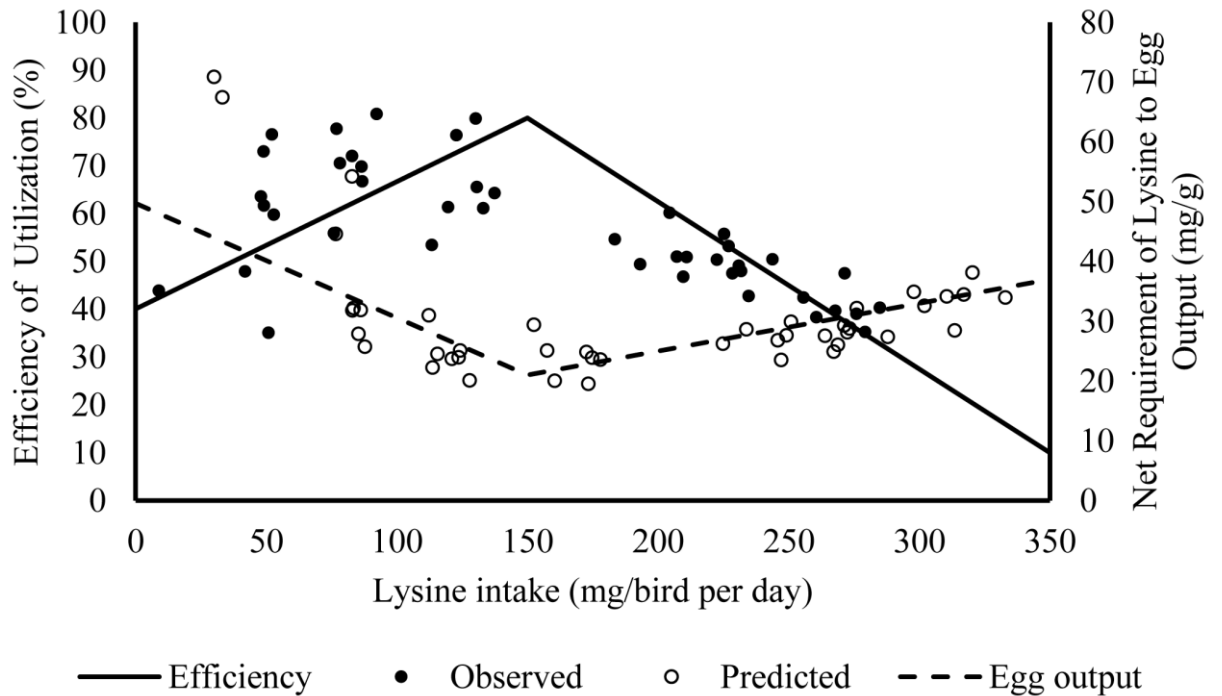


Figure 2. Efficiency of use and lysine requirement for egg mass a function of intake lysine

Based on a and m coefficients estimated here, we developed a factorial model to estimate Lys intake (I_{Lys}) as follows:

$$I_{Lys} = 21 \times EO + 156 \times BW, \quad [\text{Eq. 6}]$$

Placing EO as the response variable in equation 6 resulted in the equation that predicts EO response in function of lysine intake as follows:

$$EO = (I_{Lys} - (156 \times BW)) / 21, \quad [\text{Eq. 7}]$$

DISCUSSION

In this study, we determined an optimal adaptation period for Lys requirement studies with quails. Additionally, following a short adaptation protocol, we estimated Lys maintenance requirements and utilization efficiency to develop a factorial model for quail.

Previous works regarding quail nutritional requirements adopted long adaptation periods, but provided no evidence that such periods were optimal. Thus, we started by defining a new adaptation protocol for quails. Results obtained for EO were fitted and analyzed for optimal period selection (AIC, BIC, R^2 – Table 2). According to our analysis, an adaptation period of 3 weeks followed by 4 weeks of experimentation provides the best fitting model. This reduction in total experimental period, compared to previous studies, reduces costs. Moreover, because the serial dilution includes very low concentrations of amino acids that lie below minimum requirements, longer periods will inevitably result in animal health problems that might distort data.

A control diet (L8) was included in the experimental design to validate Lys as the first limiting amino acid. This control diet exactly replicated L1, except regarding Lys content, which was identical to L2. Indeed, L8 improved all output parameters in comparison to L1. Thus, the methodology appropriately isolated Lys as the first limiting amino acid. This validation technique has been extensively used in the past (Fisher and Morris, 1970; Gous and Morris, 1985; Morris *et al.*, 1987).

The dilution technique (Fisher and Morris, 1970) allowed us to evaluate responses in Japanese quails producing from 2.5% to 86% of their total egg-laying potential (Table 3). Previous work on Lys requirements did not obtain this wide range of responses (Garcia *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2013).

Lys intakes representing the break points in the line functions ranged from 172 to 261 mg/bird per day. Specifically regarding EO and WG, these values were 201 and 190 mg/bird per day, respectively, which were lower than previously reported (Ribeiro *et al.*, 2013). These differences may result from the mathematical models adopted. The polynomial quadratic model applied by Ribeiro *et al.*, 2013

overestimates nutritional requirements when tested nutrient concentrations are not equally distributed above and below the requirements (Lamberson & Firman, 2002). Moreover, it does not represent a physiological response because the curve yields a decrease in response after the maximum point that symmetrically corresponds to the increase. The polynomial quadratic model is also very sensitive to treatment interval variations and, in some situations, it does not favor a good fit for the data (Morris, 1983; Runho *et al.*, 2001). Finally, the broken line model predicts minimal requirement values for best performance, a desirable output for many producers (Baker, 2003).

Overall, animal weight increased by almost 70% when we compare the L1 to the L7 diets. Although we did not analyze body composition, previous studies suggest that weight variation results from increased protein catabolism, which maintains amino acid concentrations to sustain EW (Bowmaker and Gous, 1991). Moreover, Japanese quails have low tissue deposition capacity and react to low amino acid intake with rapid weight loss (Shin and Vorha, 1984).

The estimated maintenance Lys requirement, assuming $EO=0$, was 156 mg/BW_{kg}^{0.75} per day (Figure 1). Previous studies have applied the monomolecular function to determine Lys requirements for broilers (Kebreab *et al.*, 2008; Darmani Kuhl *et al.*, 2009). However, no studies have established quail maintenance Lys requirements. Other criteria for the determination of maintenance requirements exist, including nitrogen balance, however these procedures have yet to be standardized for use with quail. The value we found (156 mg / BW_{kg}^{0.75} per day) was approximately 3.5 times higher than values found for roosters (Siqueira *et al.*, 2009), and 1.7 times higher than values determined for broilers (Edwards *et al.*, 1999). These differences

indicate that, as expected, quails respond differently and need a proper nutrition system.

Physiological state of the animal, growth (protein deposition), and egg production represent some of the main variables affecting maintenance, and controlling them is critical for a good estimate (Burnham and Gous, 1992). In this sense, adult males may provide an excellent model for maintenance estimates (Burnham and Gous, 1992). In our study, healthy female quails reached a mature body protein weight, i.e., with zero growth and protein deposition. Moreover, a wide range of egg production responses, starting below 3%, allowed us to accurately approximate the maintenance state by setting $EO=0$.

The broken line model with two slopes assists in the interpretation of efficiency and requirement per unit of EO (Fig. 2). In first segment of the curve, low dietary Lys concentration draws the amino acid towards metabolic processes competing with Lys deposition in the egg. At a Lys diet concentration of 150 mg/bird per day, we found a maximum efficiency of Lys utilization at 80% and a minimum requirement of 21 mg of Lys per g of EO. After this point, efficiency decreased and, consequently, the demand per unit of EO increased, forming the second segment of the curve. The Lys intake that provided BW maintenance was 156 mg/bird per day. This intake is consistent with the break points in the efficiency and requirement curves (Fig. 2), further lending support to our findings and model. In light of the lack of data for quails, a comparison with results can be obtained by back-calculating from the previously estimated value of Lys requirement of 24.8 mg of Lys per g of EO for quail (Rostagno *et al.*, 2011). Based on this number and on a Lys egg concentration of 1.71% (Genchev, 2012), we find that, in the previous work, Lys efficiency reached 47%. This lower efficiency was expected since this coefficient of 24.8 mg of Lys per g

of EO for quail was adapted from laying hens. Moreover, the equation provided by Rostagno *et al.* (2011) ($I_{Lys} = 24.8 \times EO + 70 \times BW^{0.75}$) used for quails included lysine maintenance requirements from several studies using broilers and roosters (Fisher, 1998; Edwards *et al.*, 1999; Siqueira *et al.*, 2011) and lysine requirements for egg output using laying hens; therefore, the model probably could not provide the most accurate lysine estimate for quail. On the other hand, the model proposed here only received the inputs from our experiment with quails, except for the Lys egg concentration of 1.71% based on previous work with quails (Genchev, 2012). The current study provides procedures and methods designed for quail as well as a simple and flexible model that can be quickly adopted by technicians and poultry companies. Future studies should refine the coefficients proposed here, especially with regard to maintenance requirements.

REFERENCES

- BAKER, D. H. (2003). Ideal amino acid patterns for broilers chicks. In *Amino acids in animal nutrition* 2nd ed. (Ed J. P. F. D'Mello), pp.223-235. Wallingford, Oxon, UK:CAB International.
- BERTECHINI, A. G. (2012) *Nutrição de monogástricos*. 2nd ed., 129 p. Lavras:UFLA.
- BOWMAKER, J. E. & GOUS, R. M. (1991). The response of broiler breeder hens to dietary lysine and methionine. *British Poultry Science, Pietermaritzburg* **32**, 1069-1088.
- BURNHAM, D. & GOUS, R. M. (1992). Isoleucine requirements of chicken: Requirement for maintenance. *British Poultry Science, Pietermaritzburg* **33**, 59-69.
- DARMANI KUHI, H., KEBREAB, E., LOPES, S. & FRANCE, J. (2009). Application of the law of diminishing returns to estimate maintenance requirement for amino acids and their efficiency of utilization for accretion in young chicks. *The Journal of Agricultural Science, León* **147**, 383-390.
- EDWARDS, H. M., FERNANDEZ, S. R. & BAKER, D. H. (1999). Maintenance lysine requirement and efficiency of using lysine for accretion of whole-body lysine and protein in young chicks. *Poultry Science, Illinois* **78**, 1412-1417.

FISHER, C. (1998). Amino Acid requirements of broiler breeders. *Poultry Science, Scotland* **77**, 124-133.

FISHER, C., MORRIS, T. R. (1970). The determination of the methionine requirements of laying pullets by a diet dilution technique. *British Poultry Science, Liverpool* **11**, 67-82.

GARCIA, E. A., MENDES, A. A., PIZZOLANTE, C. C., SALDANHA, E. S. P. B., MOREIRA, J., MORI, C & PAVAN, A. C. (2005). Protein, methione+cystine and lysine levels for Japanese quails during the production phase. *Revista Brasileira de Ciência Avícola, Botucatu* **7(1)**, 11-18.

GENCHEV, A. (2012). Quality and composition of Japanese quails eggs (*Coturnix japonica*). *Trakia Journal of Sciences, Stara Zagora* **10(2)**, 91-101. In: 10 years – Anniversary edition Trakia Journal of Sciences.

GOUS, R. M. & MORRIS, T. R. (1985). Evaluation of a diet dilution technique for measuring the response of broiler chickens to increasing concentrations of lysine. *British Poultry Science Pietermaritzburg* **26**, 147-161.

LAMBERSON, W. R. & FIRMAN, J. D. (2002). A comparison of quadratic versus segmented regression procedures for estimating nutrient requirements. *Poultry Science Missouri* **81**, 481-484.

KEBREAB, E., FRANCE, J., KUHI, H. D. & LOPEZ, S. (2008). A comparative evaluation of functions for portioning nitrogen and amino acid intake between maintenance and growth in broilers. *The Journal of Agricultural Science, Manitoba* **146**, 163-170.

MORRIS, T. R., AL-AZZAWI, K., GOUS, R. M. & SIMPSON., G. L. (1987). Effects of protein concentrations on responses to dietary lysine by chicks. *British Poultry Science, Pietermaritzburg* **28**, 185-195.

MORRIS, C. N. (1983) Parametric empirical Bayes inference: theory and applications. *Journal of the American Statistical Association, Texas* **78**, 47-55.

RIBEIRO, C. L. N., BARRETO, S. L. T., REIS, R. S., MUNIZ, J. C. L., DONZELE, J. L., GOMES, P. C., JÚNIOR, J. G. V. & ALBINO, L. F. T. (2013). Digestible lysine levels in diets for laying Japanese quails. *Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa* **42(7)**, 489-495.

ROBBINS, K. R., SAXTON, A. M. & SOUTHERN, L. L. (2006). Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *Journal of Animal Science, Knoxville* **84(13)**, E155-E165.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., DONZELE, J. L., GOMES, P. C., OLIVEIRA, R. F. de, LOPES, D. C., FERREIRA, A. S., BARRETO, S. L. de T. & EUCLIDES, R. F. (2011). Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: MG:UFV, DZO.

RUNHO, R. C., GOMES, P. C., ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., LOPES, P. S. & POZZA, P. C. (2001). Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 a 21 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa* **30(1)**, 187-196.

SHIM, K. F. & VORHA, P. (1984). A review of the nutrition of Japanese quail. *World's Poltry Science Journal, Davis* **40(3)**, 261-274.

SIQUEIRA, J. C., SAKOMURA, N. K., GOUS, R. M., TEIXEIRA, I. A. M. A., FERNANDES, J. B. K. & MALHEIROS, E. B. (2011). *Model to estimate lysine requirements of broilers. Modelling nutriente digestion and utilisation in farm animals* (D. Sauvant et al. (eds), 306-314.

SIQUEIRA, J. C., SAKOMURA, N. K., NASCIMENTO, D. C. N. & FERNANDES, J. B. K. (2009). Modelos matemáticos para estimar as exigências de lisina digestível para aves de corte ISA Label. *Revista Brasileira de Zootecnia, Jaboticabal* **38(9)**, 1732-1737.

ST-PIERRE, N. R. R. (2003). *Reassessment of biases in predicted nitrogen flows to the duodenum by NRC 2001. Journal of Dairy Science, Columbus* **86**, 344-350.

CAPÍTULO 3- RESPONSES OF JAPANESE QUAILS TO THREONINE, TRYPTOPHAN AND METHIONINE+CYSTINE INTAKES

ABSTRACT. The objective of this study was to evaluate the responses of Japanese quails to threonine (**Thr**), methionine+cystine (**Met+Cys**) and tryptophan (**Trp**) intakes, and develop factorial models to estimate the requirements of these amino acids (**AA**) based on the maintenance and egg output coefficients determined by mathematical models. For this purpose, three trials (one for each AA) were conducted using a completely randomized design, with seven levels of each AA test, seven replicates of seven birds per experimental unit. For each treatment, it was added a control treatment to confirm the limitation of the AA tested. The trials started when the birds reached 16 weeks of age. The experiments lasted seven weeks, with the first three weeks for adaptation of birds to the experimental diets and the last four to collect data. The variables obtained were feed intake (**FI**), amino acid intake (**I**), body weight (**BW**), egg production (**EP**), egg weight (**EW**) and egg output (**EO**). To evaluate the quail's responses, it was adjusted the broken-line, with one slope, for each dependent variable in function of **I**. To determine the AA requirements for maintenance (**m**), it was adjusted a monomolecular model for **EO** in function of **I**, in which maintenance was calculated when **EO**=0. To determine the **AA** requirement for **EO** (**a**) it was used the broken-line with two slopes. The maximum **EO** responses obtained using the broken-line model were 9.31; 9.49 and 10.37 g/d for **Thr**, **Met+Cys** and **Trp**, respectively. The **m** values determined by the monomolecular function were 64, 176 and 47 mg/BW_{kg}^{0.75} per day and the **a** values determined by the broken line with two slopes were 17, 15 and 4 mg/g for **Thr**, **Met+Cys** and **Trp**, respectively. Using the **a** and **m** coefficients, resulted in the following models: I_{Thr}

$=17 \times \text{EO} + 64 \times \text{BW}$; $I_{\text{Met+Cys}} = 15 \times \text{EO} + 176 \times \text{BW}$ and $I_{\text{Trp}} = 4 \times \text{EO} + 47 \times \text{BW}$. Based on these models, it is recommended the amino acid intakes of 180 (BW=0.178 kg, EO=9.99 g/d), 202 (BW=0.175 kg, EO=10.98 g/d) e 53 mg/d (BW=0.159 kg, EO=11.56 g/d) for Thr, Met+Cys and Trp, respectively.

Keywords: amino acid, egg output, factorial approach, quail

INTRODUCTION

The correct determination of the nutritional requirements is important to all avian species, which allows them to develop their maximum genetic potential for both growth and/or egg production. The supplementation of industrial amino acids in poultry diets allowed to meet the requirements more accurately, especially when the diets are formulated based on digestible amino acids, improving thereby, the utilization efficiency of dietary protein. When it comes to Japanese quail, the nutritional requirements of amino acids for growth, maintenance and egg production are still poorly studied (Siyadati et al., 2011). It is known that these nutrients play an important role in the development and maintenance of the body and they are essential for protein synthesis of albumen and yolk (Leeson and Summers, 2001).

Some studies have been done to evaluate the responses of Japanese quails submitted to different levels of threonine (Canogullari et al., 2009; Umigi et al., 2012; Lima et al., 2013) and the results vary widely, with intakes from 144 mg/d (Umigi et al., 2012) to 165 mg/d of threonine (Lima et al., 2013). For optimum recommendations of methionine+cystine, Allen and Young (1980) estimated that the intake of 150 mg/d of methionine+cystine maximized egg production. Pinto et al. (2003) observed that birds who ingested 164 mg/day of methionine plus cystine expressed the maximum egg output (9.55 g/d). In recent research, Scottá et al. (2011) assumed that the maximum egg production was achieved with the intake of 223 mg/d of methionine plus cystine. Regarding tryptophan, Leeson and Summers (1991), estimated that the maximum response of Japanese quails was obtained with the dietary level of 0.22% of total tryptophan. Pinheiro et al (2008) states that the intake of 45 mg/d of digestible tryptophan is sufficient to obtain the maximum egg output for quails. Rizzo et al., (2008) observed that the maximal response of quails is

achieved with the intake of 61 mg/d of digestible tryptophan. As noted in the literature, the maximum response obtained by several authors is variable; requiring constant updating of the amino acid requirements to meet the needs of these birds and optimize production performance.

An alternative to define more precisely the amino acid intake is the use of mathematical models based on coefficients that relate the maintenance of body weight and egg production (Sakomura et al., 2011). In this context, despite the importance of the correct definition of the amino acid intake for poultry, few studies determine the optimum amino acid intake of Japanese quails and the coefficients are obtained from studies with commercial layers. Thus, the aim of this study was to evaluate the response of Japanese quails and develop factorial models to estimate the requirements of threonine, methionine+cystine and tryptophan, based on coefficients determined for maintenance and egg output.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Committee approval

The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP) approved all experimental procedures used in this study under the Protocol number 9999/14.

Housing, birds and experimental design

Three studies with Japanese quails were conducted at the Poultry Science Laboratory of the Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences (FCAV) of the Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), Jaboticabal, Brazil. The Japanese quails were housed in a conventional shed with experimental

units composed by cages. Three hundred ninety-two Japanese quails in laying phase were used in each experiment. In each study, the quails were distributed in a completely randomized design with seven treatments (amino acid levels), seven replicates and seven quails per experimental unit. The experiments started with quails at 16 weeks of age and data were collected during seven weeks. Prior to the start of the experiments, the birds were fed a standard diet to meet the nutritional requirements of quails (Rostagno et al., 2011). The light program adopted was 16 hours of light and eight hours of dark. The maximum and minimum temperature recorded in the experimental period were 32.7 ± 0.76 °C and 17.0 ± 0.48 °C, respectively. In addition, the maximum and minimum relative humidity recorded were $78.0\pm 1.67\%$ and $21.0\pm 0.57\%$, respectively.

Experimental diets

In each amino acid trial, a high protein (summit) diet was formulated using corn, corn gluten meal, soybean meal and a mixture crystalline amino acids to obtain diets with 7.80 g/kg of threonine, 10.79 g/kg of methionine+cystine and 2.76 g/kg of tryptophan. Those amino acid levels corresponds to 1.2 times the requirement of threonine, tryptophan and methionine+cystine recommended by Rostagno et al. (2011) and, for each other amino acid, it was considered 1.4 times the recommendation. This procedure was used to ensure that amino acid were the first limiting amino acid in the dietary protein with a relative deficiency of 20% as recommended by Fisher and Morris (1970). In addition, a nitrogen-free diet was formulated to meet the same nutritional levels as the summit diets, except for protein and amino acids (Table 1).

Table 1. Composition (g/kg) of the summit (high protein) and nitrogen-free diets used in the methionine+cystine, tryptophan and threonine response trials

Ingredients	1 st trial		2 nd trial		3 rd trial	
	Summit Tryptophan	N- free	Summit Met+cys	N- free	Summit Threonine	N-free
Soybean Meal	275.7	--	275.6	--	307.8	--
Corn	470.7	--	471.8	--	488.6	--
Corn Gluten meal	101.7	--	101.6	--	80.8	--
Soybean Oil	37.2	68.0	37.5	68.0	15.6	40.7
Dicalcium Phosphate	6.8	16.4	6.5	16.4	10.9	16.4
Limestone	68.6	62.1	68.7	62.1	67.7	63.0
Salt	2.6	3.3	2.6	3.3	3.2	3.2
Choline Chloride (60%)	1.0	--	1.0	--	1.0	--
Mineral and Vitamin mix ⁽¹⁾	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
DL- Methionine (990g/kg)	6.0	--	4.1	--	5.7	--
L-Lysine HCl (507g/kg)	8.8	--	8.8	--	7.2	--
L-Threonine	2.6	--	2.5	--	--	--
L-Valine	2.4	--	2.4	--	1.4	--
L-Isoleucine	1.7	--	1.7	--	0.6	--
L-Arginine	6.6	--	6.7	--	4.6	--
L-Tryptophan	0.9	--	1.4	--	0.9	--
Potassium Chloride	2.6	13.3	2.6	13.3	--	17.6
Corn Starch	--	500.0	--	500.0	--	517.0
Sugar	--	150.0	--	150.0	--	150.0
Rice Husk	--	142.7	--	142.7	--	150.0
Inert ⁽²⁾	--	40.0	--	40.0	--	38.0
Antioxidant ⁽³⁾	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Nutritional composition						
AMEn (kcal/kg)	3025	3025	3025	3025	2800	2800
Crude Protein	238.7	0.10	238.1	0.10	263.0	0.10
Calcium	29.2	--	29.2	--	29.2	--
Dig. methionine + cysteine	12.6	--	10.8	--	12.4	--
Dig. Methionine	9.5	--	7.7	--	9.2	--
Dig. Lysine	15.4	--	15.4	--	15.2	--
Dig. Tryptophan	2.8	--	3.2	--	3.2	--
Dig. Threonine	9.2	--	9.2	--	7.8	--
Dig. Arginine	17.8	--	17.8	--	17.9	--
Dig. Valine	11.5	--	11.5	--	13.7	--
Dig. Isoleucine	10.0	--	10.0	--	13.7	--

¹ Content (per kg of the diet)- Vit. A 1.750.000 U.I; Vit. D3 500.000 U.I; Vit. E 2.000 U.I; Vit. K3 500 mg; Vit. B1 250 mg; Vit. B2 875 mg; Vit. B6 500 mg; Vit. B12 1.250 mcg/kg; Niacin 6.250 mg; Chlorine 65 g; pantothenate acid 2.500 mg; Copper 2.000 mg/kg; iron 12,500 g; Manganese 17,500 g; Zinc 12,500 g; Iodine 300 mg; Selenium 50 mg.

² Inert - Washed sand ;

³ butyl hydroxy toluene. BHT

The nitrogen-free diets were used to dilute the summit diets, in suitable proportions, to obtain the range of threonine, methionine+cystine and tryptophan intakes (Table 2) necessary to fit a dose response curve (Fisher and Morris, 1970).

Table 2. Proportions of the summit diet diluted with the corresponding nitrogen-free diet in the tryptophan (TRP), methionine plus cysteine (MC) and threonine (THR) trials and the resulting concentrations of the limiting amino acids in the diets

Diets	Tryptophan			Met+Cis			Threonine		
	Summit	N-free	TRP	Summit	N-free	MC	Summit	N-free	THR
	%		g/kg	%		g/kg	%		g/kg
D1	25	75	0.69	25	75	2.70	20	80	1.56
D2	36	64	1.00	40	60	4.32	40	60	3.12
D3	50	50	1.38	50	50	5.40	50	50	3.90
D4	65	35	1.80	63	37	6.80	70	30	5.46
D5	77	23	2.13	75	25	8.10	80	20	6.24
D6	89	11	2.45	88	12	9.50	90	10	7.02
D7	100	0	2.76	100	0	10.79	100	0	7.80
D8	25	75 ^a	1.00	25	75 ^b	4.32	20	80 ^c	3.12

^a Added 0.013g of L-tryptophan/kg of diet; ^b Added 1.560 g DL-Methionine/kg of diet; ^c Added 1.520 g LThreonine/kg of diet

^{a, b, c} Control diet.

To confirm that the response of the quails to each dilution series was in function of the limiting amino acid studied, a control diet was included for each amino acid trial. To prepare the control diet, a small quantity of the respective crystalline amino acid was added to the diet with the lowest level (D8_{Thr}= 1.52 g L-Threonine/kg D1_{Thr}; D8_{Met+Cys} = 1.56 g DL-Methionine/kg D1_{Met+Cys}; D8_{Trp} = 0.013 g L-Tryptophan/kg D1_{Trp}) of the amino acid tested (D1) sufficient to meet the level of the amino acid in the second-lowest level tested (D2) in the dilution series (Table 2). Posteriorly, the diets were analyzed for the amino acid content using high performance liquid chromatography (HPLC) procedure and the values were converted into digestible basis using digestibility coefficients from Rostagno et al. (2011).

Data collection

During the experimental period, water was provided *ad libitum* and the experimental diets were provided twice a day. The leftovers were weighed weekly to measure feed intake. The threonine, methionine+cystine and tryptophan intakes were calculated by multiplying feed intake by the digestible amino acid content in the diets. The egg production was recorded daily and the egg weight were measured three times per week. The body weight of the quails was measured at the first, four and seventh week of experiment. The egg output was obtained by multiplying egg production by egg weight. At the end of the experiment, the variables obtained for analysis were amino acid intake, feed intake (**FI**), weight gain (**WG**), egg production (**EP**), egg weight (**EW**), and egg output (**EO**).

Evaluation of the responses of quails to amino acid intake

The optimal threonine, methionine and tryptophan intakes to maximize **FI**, **EP**, **EW**, **EO** and **WG** were determined using the broken line model (Robbins et al., 2006) as follows:

$$Y = L + U \times (R - X) \text{ Equation (1),}$$

where **Y** is the response variable; **X** is the digestible amino acid intake (mg/d), **L** is the response plateau; **R** is the break point or the optimal amino acid intake (mg/d); and **U** is the slope of the function.

Estimate of amino acid requirement for maintenance

The maintenance requirement was obtained by exponential relationship between amino acid intake and egg output using the monomolecular function as described by Kebreab *et al.* (2008):

$$Y = Y_{\max} \times [1 - e^{-b(X - m)}] \text{ Equation (2),}$$

Where **Y** is the egg output (g/BW_{kg}^{0.75} per day); **X** is the amino acid intake (mg/BW_{kg}^{0.75} per day); **Y_{max}** is the maximum response for egg output (g/BW_{kg}^{0.75} per day); **b** is the slope of the function; and **m** is the maintenance requirement (mg/BW_{kg}^{0.75} per day). The amino acid requirement for maintenance (**m**) was obtained by calculating the monomolecular function for **EO=0**.

Amino acid required per unit mass of egg (a)

The conversion of amino acids in **EO** (a) were calculated as follows: **D = EO × (AA/100)**, where **D** is the deposition of amino acid obtained by multiplying the EO value by the amino acid concentration in the egg, i.e. 0.73% for threonine, 1.01% for methionine+cystine, and 0.33% for tryptophan (Genchev, 2012). To obtain the parameter **a**, it was used the **Ic** which is the amino acid intake corrected for maintenance, calculated by the difference between the total amino acid intake (**I**) minus the requirement for maintenance (**m**) determined previously by the monomolecular equation (in BW_{kg}^{0.75}). The **a** value was calculated by dividing **Ic** (in mg) by **EO** (in g), i.e., **a = Ic/EO**. The **a** values were calculated for each experimental unit and were regressed as a function of **I**, using the broken line model with two slopes (Robbins *et al.*, 2006) to explain the relationship between the variables, as follows:

$$Y = L + U \times (R-X) \times V + (X-R), \text{ Equation (3)}$$

When **Y** is the response (**a**), considering the conditions $X > R$ ($R-X$) = 0 and $X < R$ ($X-R$) = 0; **X** is the digestible amino acid intake (mg/bird per day); **L** is the response plateau; **R** is the breaking point; **U** and **V** are the slopes of the model.

Developing a factorial model to determine the optimum threonine, methionine+cystine and tryptophan intakes for quails

Based on **a** and **m** coefficients, it was parametrized models to calculate threonine, methionine+cystine, and tryptophan intakes and, by inversion of the equation, it was possible to estimate the quail's response (EO) to these amino acid intakes. The design used to construct the models to calculate the amino acid intakes was:

$$I = a \times EO + m \times BW \quad \text{Equation (4),}$$

where **EO** and **BW** are the egg output and body weight, respectively; **a** and **m** are constants that represents the amino acid requirements per unit of **EO** (mg/g) and per unit of metabolic body weight ($BW_{kg}^{0.75}$), respectively. The inversion of the equation (4) was utilized to calculate the **EO** response for amino acid intake (**I**):

$$EO = (I - (m \times BW)) / a \quad \text{Equation (5),}$$

Evaluation of the factorial models

The factorial models developed from equation (4) were subjected to analysis of the errors as described by St-Pierre (2003). The errors ($I_{\text{observed}} - I_{\text{predicted}}$) were regressed as a function of the predicted values according to the following model: $e_i = b_0 + b_1 \times (I_i - I_\mu)$, where e_i is the residual value for all observation i ; b_0 and b_1 are the coefficients of the linear regression; I_i is the predicted amino acid intake for all observation i ; I_μ is the mean amino acid intake for all predicted values. The decision rule is based on the assumption that the model to be impartial the correlation is close to 1, when R^2 is close to 0, i.e. the residuals are not correlated with the predictions, and the b_1 of the e_i in function of I_i is zero if the model is impartial.

RESULTS

In the Tables 3, 4 and 5 are shown the results of the adjusted broken-line models for feed intake (**FI**), amino acid intake (**I**), egg production (**EP**), egg weight (**EW**), egg output (**EO**) and weight gain (**WG**) of Japanese quails depending on the levels of tryptophan, methionine+cystine and threonine, respectively.

Table 3. Mean (\pm standard deviation) responses and the adjusted parameters of the broken line model for tryptophan intake, feed intake, egg production, egg weight, egg output and weight gain of quails submitted to different digestible tryptophan levels in the diet

Diet	Tryptophan level (g/kg)	Tryptophan Intake (mg/d)	Feed Intake (g/d)	Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg output (g/d)	Weight gain (kg/d)
D1	0.69	11.24 \pm 0.98	16.29 \pm 1.42	14.97 \pm 2.38	8.41 \pm 1.04	0.47 \pm 0.34	-0.021 \pm 0.009
D2	1.00	19.71 \pm 2.55	19.71 \pm 2.55	44.23 \pm 12.51	8.59 \pm 0.40	3.62 \pm 1.04	-0.009 \pm 0.006
D3	1.38	28.99 \pm 1.69	21.01 \pm 1.13	73.24 \pm 11.56	9.30 \pm 0.38	6.57 \pm 1.05	0.002 \pm 0.005
D4	1.80	40.67 \pm 3.51	23.37 \pm 2.02	90.11 \pm 8.29	10.16 \pm 0.6	8.84 \pm 1.30	0.014 \pm 0.005
D5	2.13	51.54 \pm 3.08	24.20 \pm 1.45	91.98 \pm 4.45	11.03 \pm 0.25	10.14 \pm 0.55	0.018 \pm 0.002
D6	2.45	60.85 \pm 1.96	24.44 \pm 0.79	93.67 \pm 4.91	11.32 \pm 0.35	10.62 \pm 0.83	0.027 \pm 0.011
D7	2.76	68.47 \pm 4.75	24.81 \pm 1.72	92.58 \pm 6.12	11.14 \pm 0.34	10.31 \pm 0.73	0.024 \pm 0.007
D8 ¹	1.00	15.15 \pm 1.32	15.15 \pm 1.32	17.41 \pm 3.31	8.35 \pm 0.48	0.55 \pm 0.44	-0.021 \pm 0.005
Broken line parameters							
L			24.724 \pm 0.315	92.084 \pm 1.447	11.178 \pm 0.117	10.379 \pm 0.165	0.022 \pm 0.001
U			-0.2155 \pm 0.024	-3.2379 \pm 0.224	-0.0732 \pm 0.006	-0.2888 \pm 0.014	-1.2309 \pm 0.1366
R			68.0 \pm 0.005	56.0 \pm 1.234	61.0 \pm 2.892	53.0 \pm 1.265	56.0 \pm 2.125
R ²			0.90	0.91	0.91	0.94	0.93
P-value			<0.0001	0.0001	<0.0001	0.0001	0.0001

μ = Mean; SE= standard error; L is the maximum response; U is the slope of the broken line function; R is the breakpoint of the broken line function; R² is the coefficient of determination.

¹Control diet for tryptophan trial: T8 = 0.013 g L-Tryptophan /kg T1.

Table 4. Mean (\pm standard deviation) responses and the adjusted parameters of the broken line model for methionine+cystine intake, feed intake, egg production, egg weight, egg output and weight gain of quails submitted to different digestible methionine+cystine levels in the diet

Diet	Met+cys level (g/kg)	Met+cys Intake (mg/d)	Feed Intake (g/d)	Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg output (g/d)	Weight gain (kg/d)
D1	2.70	40.72 \pm 4.21	15.08 \pm 1.56	13.69 \pm 4.94	8.02 \pm 0.41	0.52 \pm 0.28	-0.030 \pm 0.006
D2	4.32	78.95 \pm 6.81	18.28 \pm 1.58	43.68 \pm 8.49	8.59 \pm 0.47	3.46 \pm 0.84	-0.012 \pm 0.004
D3	5.40	104.52 \pm 9.78	19.35 \pm 1.81	61.22 \pm 12.63	9.25 \pm 0.52	5.30 \pm 1.67	0.001 \pm 0.007
D4	6.80	153.47 \pm 9.02	22.57 \pm 1.33	79.84 \pm 5.88	10.24 \pm 0.32	7.93 \pm 1.23	0.003 \pm 0.004
D5	8.10	186.85 \pm 7.80	23.07 \pm 0.96	89.36 \pm 7.94	10.70 \pm 0.30	9.55 \pm 0.79	0.023 \pm 0.011
D6	9.50	230.08 \pm 14.94	24.22 \pm 1.57	89.68 \pm 10.70	11.13 \pm 0.21	9.98 \pm 1.29	0.018 \pm 0.010
D7	10.79	267.91 \pm 10.89	24.83 \pm 1.01	88.12 \pm 4.18	10.93 \pm 0.57	8.93 \pm 1.36	0.021 \pm 0.014
D8 ¹	4.32	60.55 \pm 5.97	14.02 \pm 1.38	20.38 \pm 3.71	8.30 \pm 0.85	1.53 \pm 0.28	-0.034 \pm 0.007
Broken line parameters							
L			24.763 \pm 0.335	87.301 \pm 1.401	11.098 \pm 0.109	9.489 \pm 0.250	0.019 \pm 0.002
U			-0.0548 \pm 0.003	-0.6782 \pm 0.053	-0.0190 \pm 0.001	-0.0648 \pm 0.005	-0.3305 \pm 0.039
R			247.0 \pm 6.870	180.0 \pm 8.8719	201.0 \pm 9.092	232.0 \pm 16.819	180.0 \pm 12.095
R ²			0.92	0.96	0.90	0.96	0.94
P-value			<0.0001	0.0001	<0.0001	0.0001	0.0001

μ = Mean; SE= standard error; L is the maximum response; U is the slope of the broken line function; R is the breakpoint of the broken line function; R² is the coefficient of determination.

¹Control diet for methionine+cystine trial: T8 = 1.56 g DL-Methionine/kg T1.

Table 5. Mean (\pm standard deviation) responses and the adjusted parameters of the broken line model for threonine intake, feed intake, egg production, egg weight, egg output and weight gain of quails submitted to different digestible threonine levels in the diet

Diet	Threonine level (g/kg)	Threonine Intake (mg/d)	Feed Intake (g/d)	Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg output (g/d)	Weight gain (kg/d)
D1	1.56	15.688 \pm 1.88	11.625 \pm 1.59	6.309 \pm 2.29	8.032 \pm 0.90	0.540 \pm 0.15	-0.064 \pm 0.010
D2	3.12	45.288 \pm 2.13	14.267 \pm 0.50	26.933 \pm 2.52	8.616 \pm 0.71	2.305 \pm 0.19	-0.027 \pm 0.002
D3	3.90	78.031 \pm 2.26	19.574 \pm 0.61	54.208 \pm 3.10	9.25 \pm 0.69	4.988 \pm 0.28	-0.022 \pm 0.006
D4	5.46	131.039 \pm 3.56	23.360 \pm 0.92	82.703 \pm 2.13	10.376 \pm 0.39	8.535 \pm 0.32	-0.021 \pm 0.002
D5	6.24	154.431 \pm 3.14	24.257 \pm 0.67	84.703 \pm 2.13	10.742 \pm 0.49	9.094 \pm 0.16	0.000 \pm 0.001
D6	7.02	178.921 \pm 1.98	24.268 \pm 0.22	87.536 \pm 2.15	11.019 \pm 0.50	9.651 \pm 0.24	0.006 \pm 0.001
D7	7.80	194.138 \pm 2.71	24.169 \pm 0.24	85.131 \pm 2.90	10.804 \pm 0.48	9.210 \pm 0.40	0.005 \pm 0.001
D8 ¹	3.12	32.052 \pm 2.16	12.588 \pm 1.61	12.489 \pm 2.16	8.140 \pm 0.84	0.911 \pm 0.19	-0.049 \pm 0.013
Broken line parameters							
L			24.3260 \pm 0.43	85.7781 \pm 1.33	10.9111 \pm 0.11	9.3088 \pm 0.14	0.00634 \pm 0.008
U			-0.1170 \pm 0.01	-0.7308 \pm 0.04	-0.0207 \pm 0.001	-0.0742 \pm 0.003	-0.00037 \pm 0.00
R			128.4 \pm 9.56	126.5 \pm 4.62	158.8 \pm 8.81	139.1 \pm 4.15	177.2 \pm 32.20
R ²			0.86	0.96	0.88	0.97	0.51
P-value			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

μ = Mean; SE= standard error; L is the maximum response; U is the slope of the broken line function; R is the breakpoint of the broken line function; R² is the coefficient of determination.

¹Control diet for threonine trial: T8 = 1.52g L-Threonine/kg T1.

The levels studied of the three amino acids affected all variables ($P < 0.01$). Comparing the EO responses in D8 treatment, it was confirmed that the amino acids studied were nutritionally limiting in the quail's responses because the values were in-between the responses provided by D1 and D2 levels. The results obtained with the D8 diet was used only to confirm the limitation of the test AAs, thus, the data was not used in further evaluation or statistical analysis.

The summarized results from tryptophan trial are presented in Table 3, where was possible to observe a reduction in feed intake of 34%, 21%, 15%, 6%, 2% and 1%, for D1, D2, D3, D4, D5 and D6 diets, respectively, when compared with the highest feed intake of 24.81 g/d (D7). The quails fed diets containing lower levels of tryptophan reduced EP by 84%, 53%, 22%, 4% and 2% in the first five levels compared to D6 and a decrease of 1% in D7 treatment. In relation to EW, there was a reduction of 26%, 24%, 18%, 10% and 3% in the first five levels compared to D6 and a slight decrease of 2% thereafter. The quails were more sensitive to tryptophan limitation with respect to EO with a reduction in EO of 96%, 66%, 38%, 17% and 5% in the first five levels compared to D6 and a slight decrease of 3% thereafter. The quail lose weight when they were fed the first two levels of digestible tryptophan, but they increased the WG from 9 g/d consuming 1.38 g/kg Trp to a maximum of 27 g/d consuming 2.45 g/kg Trp and then decreased WG to 24 g/d when those quail fed 2.76g/kg of Trp

In the case of methionine+cystine (Table 4), the FI decreased of 39%, 26%, 22%, 9%, 7% and 2%, for D1, D2, D3, D4, D5 and D6 diets, respectively, when compared with the highest feed intake of 24.83 g/d (D7). Within the experimental levels of methionine+cysteine, there was a reduction in EP of 85%, 51%, 32%, 11%

and 0.36% in the first five levels in relation to D6 treatment, where the higher EP was observed (89.68%). On the other hand, when the quail received levels above 9.50g/kg of Met+Cys there was a decrease of approximately 2% in EP. Analyzing EW results it was possible to observe a reduction of 28%, 23%, 17%, 8% and 4% in the first five levels compared to D6 and a slight decrease of 2% thereafter. The impact in these differences in EP and WG resulted in a reduction in EO of 95%, 65%, 47%, 21% and 4% in the first five levels compared to D6 and a decrease of 11% with the D7 diet. The quail lose weight when they were fed the first two levels of digestible methionine+cystine, but they increased the WG from 1g/d consuming 5.40 g/kg Met+Cys to a maximum of 21g/d consuming 10.79 g/kg Met+Cys (D7).

Analyzing the results in threonine trial (Table 5) it was observed that FI was reduced by 52%, 41%, 19%, 4% and 0.04% for the first five-threonine levels in comparison to D6 treatment, but in levels above 7.02g/kg of Thr there was a slight decrease of 0.41%. The quail lose weight when they were fed the first four levels of digestible threonine, stabilized the weight gain at 6.24g/kg of threonine and increased the weight gain at a maximum of 6 g/d when they received 7.02g/kg of threonine and decreased WG when received 7.80g/kg of Thr. For EP, there was reduced by 93%, 69%, 38%, 6% and 3% in the first five levels compared to D6 and a decrease of 3% in D7 treatment. In relation to EW, there was a reduction of 27%, 22%, 16%, 6% and 3% in the first five levels compared to D6 and a slight decrease of 2% thereafter. The quails were less sensitive to threonine limitation with respect to EO, which was reduced by 94%, 76%, 48%, 12% and 6% in the first five levels compared to D6 and a slight decrease of 5% thereafter.

The responses obtained with the amino acid intakes (Threonine, Methionine+cystine and Tryptophan) were adjusted by the broken line model and the estimated parameters of maximum response to threonine were 24.33 g/d for FI; 85.78% for EP; 10.911 g for EW; 9.309 g/d for EO; and 0.006 kg/d for WG (Table 5). These values were obtained with threonine intakes between 15.69-194.14 mg/d. For methionine+cysteine the maximum responses obtained were 24.76 g/day for FI; 87.30% for EP; 11.10 g for EW; 9.49 g/d for EO and 19.91g/d for WG (Table 4). These results were obtained with intake of quails that ranged 40.72-267.91 mg/d. For Tryptophan, the optimal responses were 24.72 g/d for FI; 92.08% for EP; 11.18 g for EW; 10.38 g for EO and 22.63g/d for WG, which were estimated with tryptophan intakes ranging from 11.24 to 68.47 mg/d.

The threonine intake for maintenance was obtained by the monomolecular equation (2), estimated as $64 \text{ mg/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day (**Figure 1a**). The other model parameters of EO_{max} and b were estimated at $54 \text{ g/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day and 0.00167, respectively. For Methionine+cystine, the estimated maintenance requirement was $176 \text{ mg/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day (**Figure 1b**). The other model parameters of EO_{max} and b were estimated at $39 \text{ g/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day and 0.00368, respectively. Regarding the intake of tryptophan, the estimated maintenance requirement was $47 \text{ mg/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day for maintenance of Japanese quails (**Figure 1c**). The other model parameters of EO_{max} and b were estimated at $41 \text{ g/BW}_{\text{kg}}^{0.75}$ per day and 0.0144, respectively.

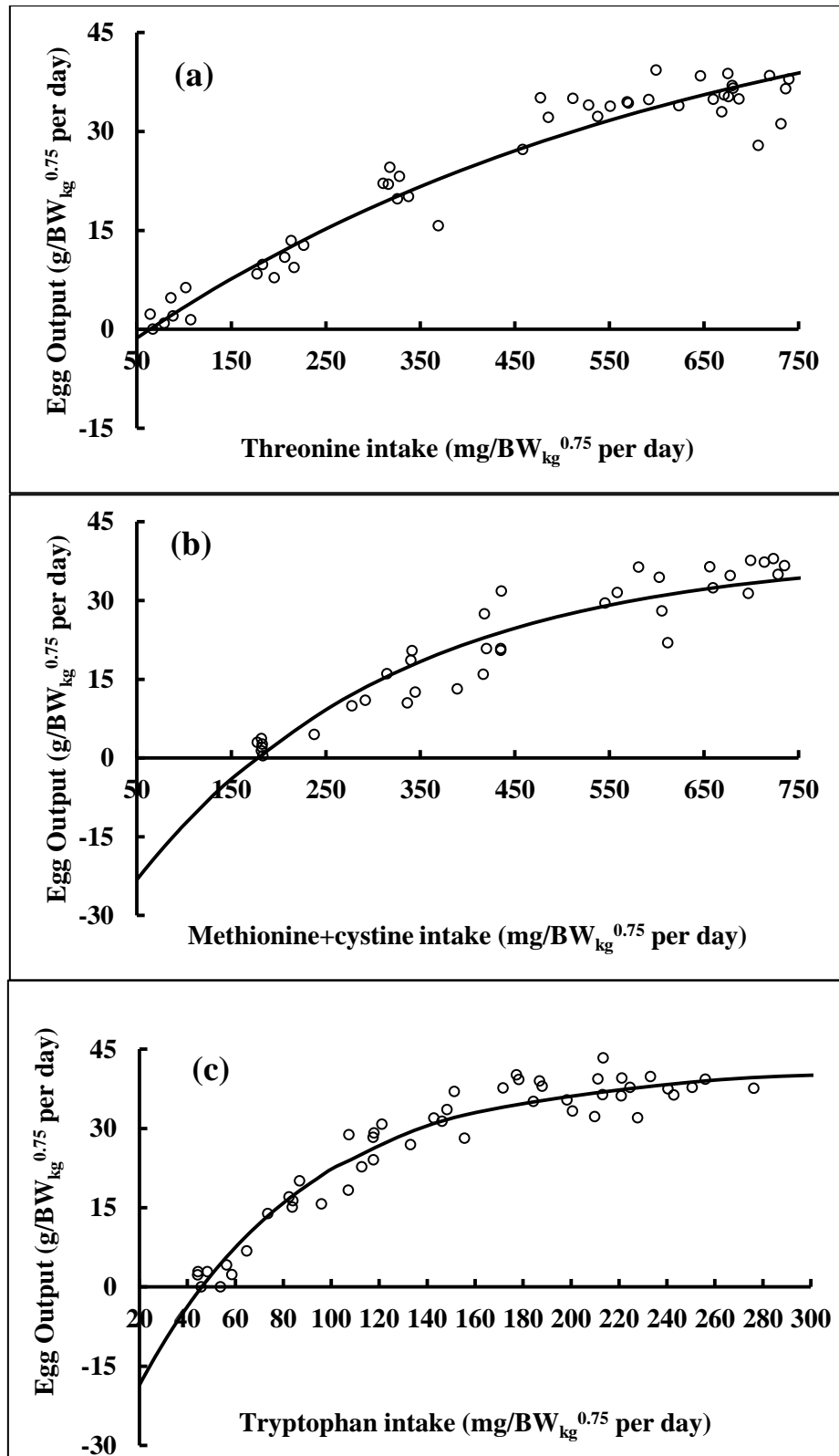


Figure 1. Monomolecular function fitted between threonine (a), methionine+cystine (b), and tryptophan (c) intakes and egg output.

The **a** values were regressed against amino acid intake using the broken-line model with two slopes. The estimated values for the variable were estimated to be 17, 15, and 4 mg of Thr, Met+Cys and Trp per g of EO, respectively, and the resulting equations (Equations 5, 6 and 7) are presented as follows:

$$Y=17+0.1035 \times (140 - I_{\text{THR}}) \times 0.0145 + (I_{\text{THR}} - 140); R^2 = 0.87 \quad (\text{Equation 5})$$

$$Y=15+0.0244 \times (180 - I_{\text{MET+CYS}}) \times 0.005 + (I_{\text{MET+CYS}} - 180); R^2 = 0.89 \quad (\text{Equation 6})$$

$$Y=4+0.3939 \times (52 - I_{\text{TRP}}) \times 0.0305 + (I_{\text{TRP}} - 52); R^2 = 0.82 \quad (\text{Equation 7})$$

The factorial models obtained for each amino acid were developed based on **a** and **m** coefficients resulting in equations 8, 9 and 10, as follows:

$$I_{\text{THR}} = 17 \times \text{EO} + 64 \times \text{BW} \quad (\text{Equation 8})$$

$$I_{\text{MET+CYS}} = 15 \times \text{EO} + 176 \times \text{BW} \quad (\text{Equation 9})$$

$$I_{\text{TRP}} = 4 \times \text{EO} + 47 \times \text{BW} \quad (\text{Equation 10})$$

To estimate the responses for EO, the equations 8, 9 and 10 were inverted resulting in the following equations:

$$\text{EO}_{\text{THR}} = (I - (64 \times \text{BW})) / 17 \quad (\text{Equation 11})$$

$$\text{EO}_{\text{MET+CYS}} = (I - (176 \times \text{BW})) / 15 \quad (\text{Equation 12})$$

$$\text{EO}_{\text{TRP}} = (I - (47 \times \text{BW})) / 4 \quad (\text{Equation 13})$$

The models were evaluated by its impartiality using the association of the errors with the prediction (Figure 2). The equations that explain the relationship between e_i due to the intake of the amino acids predicted to elaborate models in these studies were respectively for tryptophan, methionine, cystine and threonine the following:

$$e_i = 4.3555(\pm 2.446^{NS}) - 0.7610(\pm 0.014^{NS}) \times (I_{TRP}^{\text{predicted}} - 54) \quad R^2 = 0.0177$$

$$e_i = 25.0276(\pm 11.43^{NS}) - 0.0335(\pm 0.007^{NS}) \times (I_{MET+CYS}^{\text{predicted}} - 210) \quad R^2 = 0.0040$$

$$e_i = 2.9413(\pm 11.229^{NS}) - 0.0872(\pm 0.104^{NS}) \times (I_{THR}^{\text{predicted}} - 175) \quad R^2 = 0.0149$$

After obtaining the above-described, it was estimated the intake 180 mg/d of threonine, considering the EO of 9.99g/d and BW of 178g. For Methionine+cysteine it was estimated the intake of 202 mg/d for a quail with EO of 10.98g/d and BW of 175g. Finally, it was estimated the intake of 53 mg/d of tryptophan for quails with EO of 11.56g/d and BW of 159g.

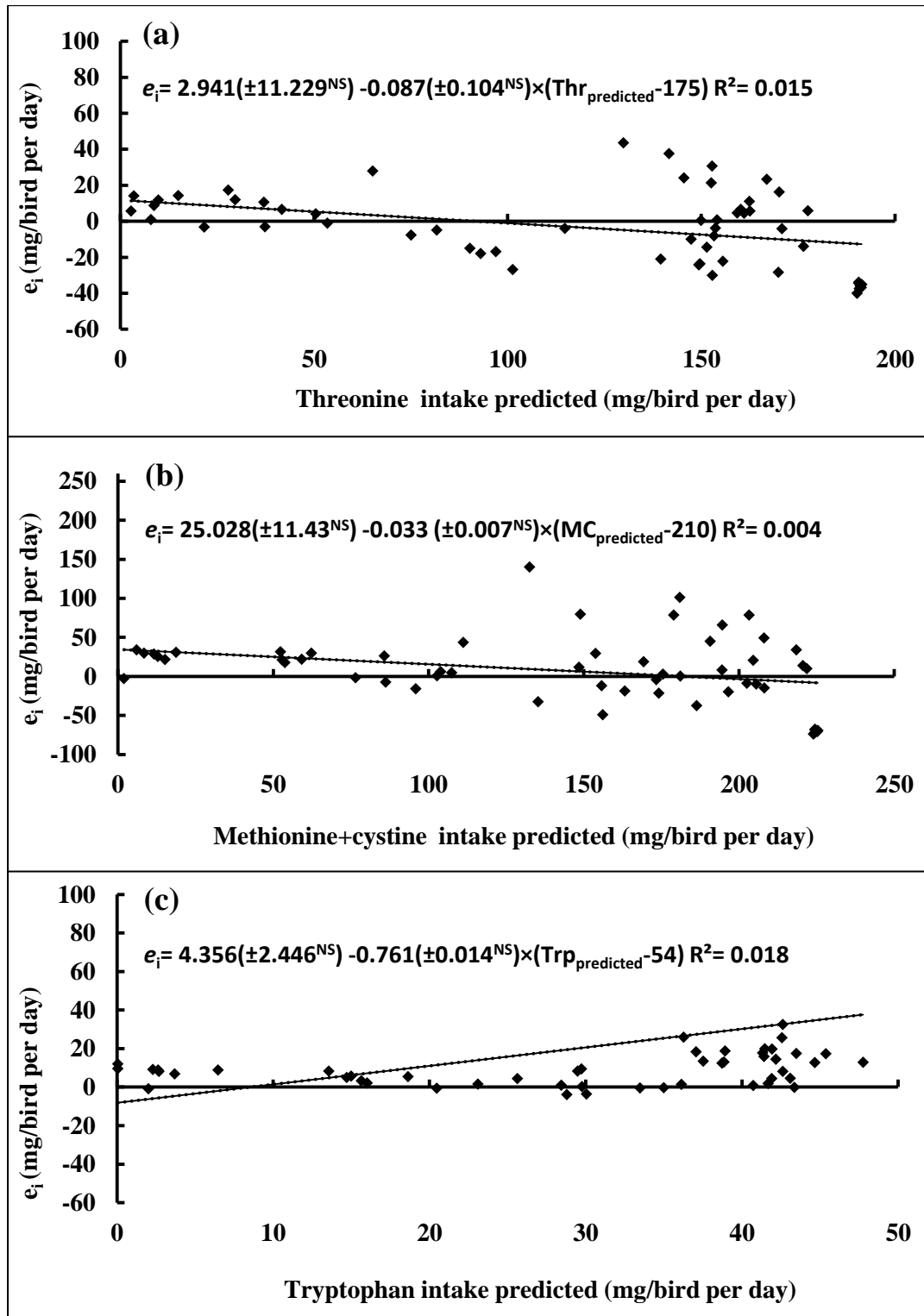


Figure 2. Relationship between residuals of the prediction (e_i) and the predicted threonine (a), methionine+cystine (b), and tryptophan (c) intakes from the developed models.

DISCUSSION

In the results obtained with the threonine, methionine+cystine and tryptophan levels, it was observed an increase in the responses close to zero until the maximum egg output. These wide responses were possible due to the dilution technique, which allows more wide levels of deficiency and an excess of the test amino acid when compared with other feed formulation techniques. The limitation of the amino acids in the study were confirmed by the technique mentioned above.

Significant effects were observed between the responses of quails that fed different levels of amino acids in the studies. Canogullari et al. (2009), working with different levels of threonine, found no significant differences in the Japanese quails responses. It is important to note that these authors worked with supplementation technique and with only four threonine levels (from 0.74 to 1.04%), showing that the obtained differences may be due to the use of threonine levels below the recommendation for these species, thus, limiting the responses. Therefore, the responses obtained in our study have significance and greater extent between them, since we work with levels below and above the recommendation and keeping the ideal ratio of amino acids due to the dilution technique.

The increase in FI verified with the increase of methionine+cystine intake was similar to the results found by Belo et al. (2000) and Pinto et al. (2003). These authors also observed an increase in feed intake with increased levels of sulfur amino acids in the diet. Once there is a change in energy:protein ratio there is proportionally higher energy intake than needed to maintain egg production at the lowest levels (Bowmaker and Gous, 1991) of threonine, methionine+cystine and tryptophan. Thus, the reduction in the FI at lower levels of amino acids studied can

be related to the physiological mechanism of the quails to avoid energy imbalance if they continue fed diets with low concentration of amino acids (Bowmaker and Gous, 1991).

There is a positive correlation between EW and EP variables with EO, i.e. as the EP and EW increases; the EO also increases (Tables 3, 4 and 5). The increase, however small, in the intake of protein or amino acid reflects directly in the responses of birds such as the egg production and egg weight (Morris and Gous, 1988).

The use of low amino acid levels allows a lower performance of the birds. As the deficiency in amino acids results in limited protein synthesis, consequently, there is a reduction in bird's weight, that is aggravated in Japanese quail due to its low tissue deposition capacity (Shin and Vorha, 1984) and the lower intake ultimately results in weight loss proportion.

The broken-line model adjusted well to the data ($P < 0.001$). The broken-line model is extremely easy to use, with good estimates of the optimal responses with the amino acids intakes. This model explains linearly the individual response; however, the response in a population is generally curvilinear (Silva, 2012). Thus, some authors agree that the choice of a curvilinear model is better suited to represent the responses for a population of birds (Pesti et al., 2009). According to Robbins et al. (1979) and Pack et al. (2003), this model states that the nutrient utilization is constant until the point where the animal's maximal response is reached, from this point, there is no further response in the animal's performance, i.e., the model allows to estimate concisely the needs of the amino acids of birds. Therefore, it was used the monomolecular function in this study to obtain maintenance and

maximum EO coefficients in the factorial model to determine the optimum amino acid intakes.

The estimates of maintenance requirements obtained for threonine, methionine+cystine and tryptophan were 64, 176 and 46 mg/BW_{kg}^{0.75} per day, respectively. Previous studies have applied the monomolecular function to determine the maintenance requirements for some amino acids for broilers (Kebreab et al., 2008; Darmani Kuhi et al., 2009). However, no studies determined amino acid requirements for maintenance of quails. The value found for threonine is about three times higher than the values found for roosters by Bonato et al. (2011). In this study, the estimated maintenance requirement of methionine+cystine for quails (176 mg/BW_{kg}^{0.75} per day) is about six times higher than the values found for roosters by Bonato et al. (2011) and is closer to the value obtained by Leveille et al. (1960). These authors worked with sexually mature roosters and determined that the methionine+cysteine requirements for maintenance is 142.8 mg/BW_{kg}^{0.75} per day. The estimated tryptophan requirement for maintenance found in the study is 47 mg/BW_{kg}^{0.75} per day for Japanese quails. This estimate is almost three times that obtained by Leveille et al. (1960). These authors worked with sexually mature roosters and determined that the requirement for maintenance of tryptophan is 19 mg/BW_{kg}^{0.75} per day. The estimates of the threonine, tryptophan, and methionine+cystine requirements for maintenance found in our studies indicate that quails respond differently from roosters, for example, requiring adequate nutrition, which allows meet their maintenance requirements. Thus, we can say that it is important to determine the requirements for maintenance in every species of bird (chickens, roosters, quails, laying hens). Studying these nutrients in animal

metabolism is of great value to determine the maintenance requirements and amino acid deposition needed for egg production, to obtain thereby the maximum animal performance.

According to McNamara (2006), the advance in the knowledge has allowed generate models that can more accurately estimate the amino acid deposition at different stages of life of the animal. Furthermore, according to Pomar et al. (2007), determining the requirement for maintenance and amino acid deposition has enabled the development of models that can describe the relationship between the amino acid intakes and their use for maintenance and protein deposition, allowing different breeding conditions to simulate the animals' responses.

The models were assessed for its impartiality by the association of the errors with the predicted values according to St-Pierre (2003), where the composition analysis of errors allowed the accuracy of 98.2%; 99.6% and 85.10% in the models developed for Trp, Met+Cys and Thr respectively. According to the accuracy obtained after the analysis in the residual errors, it is possible to say that the models obtained in this study show good ability to predict the intake of the amino acids studied for Japanese quails. It is interesting to point out that every model has random errors from measurements and estimates of the parameters (St-Pierre, 2005).

The intake obtained after the simulation for threonine, methionine+cysteine, and tryptophan are in accordance with the intake observed in literature. For digestible threonine, NRC (2004) estimates the intake of 178 mg of threonine, while Umigi et al. (2007) recommends that the intake of 150 mg of digestible threonine is sufficient to obtain maximum response of Japanese quails (EO = 10.84 g and BW = 0.173 kg). Rostagno et al. (2011) and Pinto et al. (2003) estimate, respectively, the intake of

213 (EO = 10.00g and BW = 0.165 Kg) and 164 mg (EO = 9.58 g and BW = 0.146 kg) of digestible Methionine+cystine for Japanese quails. For the amino acid tryptophan, the intakes found in literature ranged from 45 to 54 mg of digestible tryptophan, and Rostagno et al. (2011) recommends a daily intake of 54 mg (EO = 10.00g and BW = 0.156 kg) of digestible tryptophan for maximum performance of the birds.

In conclusion, it is important to note that the estimates of the threonine, tryptophan, and methionine+cystine requirements for quails are well elaborated, because the closer the animal's requirement, there will be increases in protein utilization efficiency and because of this, enabling to maximize the use of amino acids for protein synthesis, so that the animal will enhance their performance and still be able to meet their needs maintenance.

REFERENCES

- ALLEN, N.K., YOUNG, R.J. Studies on the amino acid requirements of laying Japanese quail. **Poultry Science**, v.59, n9, p.2029-2037, 1980.
- BELO, M.T.S.; COTTA, J.T.B.; OLIVEIRA, A.I.G. Níveis de metionina em rações de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) na fase inicial de postura. **Ciências Agrotecnicas**, v.24, n.4, p.1068-1078, 2000.
- BONATO, M. A.; SAKOMURA, N. K.; SIQUEIRA, J. C.; FERNANDES, J. B. K.; GOUS, R. M. Maintenance requirements for methionine and cysteine, and threonine for poultry. **South African Journal of Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 209-222, 2011

- BOWMAKER, J. E.; GOUS, R. M. The response of broiler breeder hens to dietary lysine and methionine. **British Poultry Science**, v. 32, n.5, p.1069-1088, 1991.
- Canogullari S, Baylan M, Sahinler N, Sahin A. Effects of propolis and pollen supplementations on growth performance and body components of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Archive fur Geflügelkunde**. 73:173–178, 2009.
- DARMANI KUHI, H., KEBREAB, E., LOPES, S. & FRANCE, J. Application of the law of diminishing returns to estimate maintenance requirement for amino acids and their efficiency of utilization for accretion in young chicks. **The Journal of Agricultural Science**, León 147, 383-390, 2009.
- FISHER, C.; MORRIS, T.R. The determination of the methionine requirement of laying pullets by a diet dilution technique. **British Poultry Science**, v.11, n.1, p.67-82, 1970.
- GENCHEV, A. Quality and composition of Japanese quails eggs (*Coturnix japonica*). **Trakia Journal of Sciences**, Stara Zagora 10(2), 91-101, 2012. In: 10 years – Anniversary edition Trakia Journal of Sciences.
- KEBREAB, E., FRANCE, J., KUHI, H. D. & LOPEZ, S. (2008). A comparative evaluation of functions for portioning nitrogen and amino acid intake between maintenance and growth in broilers. **The Journal of Agricultural Science**, Manitoba 146, 163-170.
- LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. 4th ed. Guelph: University Books, 2001. 591p.
- Leveille, G. A. and Fisher, H. 1960. Amino acid requirements for maintenance in the adult rooster III. The requirements for leucine, isoleucine, valine and threonine,

with reference also to the utilization of the d-isomers of valine, threonine and isoleucine. *The Journal of Nutrition*. 70:135-140.

Lima, M. R., F. G. P. Costa, R. R. Guerra, J. H. da Silva, C. B.-V. Rabello, M. A. Miglino, G. B. V. Lobato, S. B. S. Netto, and L. da Silva Dantas. 2013. Threonine:lysine ratio for Japanese quail hen diets. *J. Appl. Poult. Res.* 22:260–268.

MORRIS, T.R.; GOUS, R.M. Partitioning of the response to protein between egg number and egg weight. **British Poultry Science**, v.29, n.1, p.93-99, 1988.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of poultry**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1994. p.44-45.

PESTI, G.M. et al. A comparison of methods to estimate nutritional requirements from experimental data. **British Poultry Science**, v.50, n.1, p.16-32, 2009.

PINHEIRO, S.R.F. Níveis de Triptofano em dietas de codornas japonesas em postura. Dissertação de mestrado, Viçosa, 2006.

PINTO, R.; FERREIRA, A.S.; DONZELE, J.L.; SILVA, M.A.; SOARES, R.T.R.N.; CUSTÓDIO, G.S.; PENA, K.S. Exigência de lisina para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1182-1189, 2003.

POMAR, C. Predicting responses and nutrient requirements in growing animal populations: the case of the growing-finishing pig. In: HANIGAN, M.D.; NOVOTNY, J.A.; MARSTALLER, C.L. (Eds.) **Mathematical modeling in nutrition and agriculture** . Blacksburg: Virginia Polytechnic and State University, 2007. p.309-330.

- Rizzo, P. V.; Guandolin, G. C.; Amoroso, L.; Malheiros, R. D.; Moraes, V. M. B. Triptofano na alimentação de codornas japonesas nas fase de cria e postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1017-1022, 2008.
- ROBBINS, K. R., SAXTON, A. M. & SOUTHERN, L. L. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. **Journal of Animal Science**, Knoxville 84(13), E155-E165, 2006
- ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: UFV, DZO, 2005. (UFV, DZO).
- SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, 2007, 283p.
- SAKOMURA, N.K.; HAUSCHILD, L.; SILVA, E.P. et al. Factorial model to estimate Poultry nutritional requirements. In.: ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; DONZELE, J.L. et al. III International Symposium on Nutritional requirements of Poultry and Swine. Viçosa, MG, p. 45-75, 2011.
- SCOTTÁ, B.A.; VARGAS JR, J.G.; PETRUCCI, F.B.; DEMUNER, L.F.; COSTA, F.G.P.; BARBOSA, W.A.; MARIN, J.F.V. Metionina mais cistina digestível e relação metionina mais cistina digestível: lisina para codornas japonesas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal[Online]**, v.12, n.3, p.729-738, 2011.
- SHIM, K. F. & VORHA, P. (1984). A review of the nutrition of Japanese quail. *World's Poltry Science Journal, Davis* **40(3)**, 261-274.
- SILVA, E.P. **Modelos de crescimento e das respostas de frangas de postura submetidas a diferentes ingestões de aminoácidos sulfurados**. 2012. 207f. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", SP.

Siyadati, S. A., M. Irani, K. Ghazvinian, A. Mirzaei-Aghsaghali, V. Rezaipoor, H. Fathi, K. Alipoor, and S. Zamanzad-Ghavidel. 2011. Effect of varying dietary energy to protein ratio on productive performance and carcass characteristics of Japanese quail. *Ann. Biol. Res.* 2:149–155

ST-PIERRE, N. R. R. (2003). *Reassessment of biases in predicted nitrogen flows to the duodenum by NRC 2001. Journal of Dairy Science*, Columbus **86**, 344-350.

UMIGI, R.T.; BARRETO, S.L.T.; DONZELE, J.L. et al. Níveis de treonina digestível em dietas para codornas japonesa em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1868-1874, 2007.

Umigi, R. T.; Barreto, S. L. T.; Reis, R. S.; Mesquita Filho, R. M. Araújo, M. S. Níveis de treonina digestível para codornas japonesas na fase de produção. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, p.658-664, 2012.

CAPÍTULO 4 - INGESTÃO ÓTIMA ECONÔMICA DE LISINA, TREONINA, METIONINA + CISTINA E TRIPTOFANO PARA CODORNAS JAPONESAS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o ótimo econômico de lisina (**Lys**), metionina+cistina (**MetCys**), treonina (**Thr**) e triptofano (**Trp**) para codornas japonesas, utilizando equações e simulações com o Reading Model. Para isso foi considerada a variação que existe dentro da população e a relação custo-benefício da suplementação de aminoácidos industriais na dieta. Para estimar os parâmetros do Reading Model foram realizados três experimentos, utilizando 392 aves. O delineamento utilizado nos experimentos foi inteiramente ao acaso, com sete tratamentos e sete repetições de sete aves por unidade experimental. As dietas foram formuladas pela técnica da diluição, onde obteve sete diferentes níveis de aminoácidos que variaram de 2,60-13.00, 2,70-10.79, 1,56-7.80 e de 0.69 a 2.76 g/kg de Lys, MetCys, Thr e Trp, respectivamente. Cada experimento teve duração de sete semanas (três semanas de adaptação e quatro semanas de coleta de dados). A ingestão de aminoácidos, a produção de massa de ovos (**EO**) e peso corporal (**PC**) foram utilizadas para ajustar os parâmetros do Reading Model. Com base nos parâmetros foi aplicado o método da equação exata e de simulação considerando, 10.000 aves. A recomendação de ótimo econômico baseada na equação exata foi 308, 231, 189 e 65 mg de Lys, MetCys, Thr e Trp por ave.dia, respectivamente.

Aplicando a simulação a recomendação para Lys, MetCys, Thr e Trp foi de 287, 219, 181 e 63 mg por ave.dia, respectivamente.

Palavras-chave: aminoácidos, equação, modelo de Reading, simulação

INTRODUÇÃO

Codornas japonesas são aves que necessitam de um plano nutricional no qual sejam consideradas as interações fisiológicas de crescimento, manutenção e produção. Neste contexto, os modelos matemáticos são ferramentas importantes para definir as exigências nutricionais dessas aves, por permitir correções nas exigências de manutenção e produção das codornas.

Segundo Sakomura et al. (2015), a modelagem é uma ferramenta indispensável para estimar as exigências de aminoácidos para aves, e pode auxiliar o nutricionista na tomada de decisão (Fisher, 2015), tornando possível aperfeiçoar a eficiência técnica e econômica da alimentação das aves (Gous, 2015).

A utilização dos modelos matemáticos baseados na predição dos coeficientes de manutenção e produção de ovos tem sido uma alternativa para determinar com maior precisão a ingestão dos aminoácidos (Sakomura et al. 2015). O Reading Model descreve a resposta do indivíduo baseado no modelo fatorial simples e a média da população é obtida considerando a média integrada dos indivíduos da população (Fisher e Morris, 1973). Os parâmetros do modelo permitem simular uma população com distribuição normal para EO e PC. Este modelo tem sido utilizado para calcular a ingestão do aminoácido limitante, embasado no ótimo econômico (Silva et al., 2015a,b). Apesar das vantagens do modelo Reading, não há uma descrição do seu uso para codornas japonesas na fase de produção. Desse modo, o objetivo deste estudo foi determinar o ótimo econômico de lisina (**Lys**), metionina+cistina (**MetCys**),

treonina (**Thr**) e triptofano (**Trp**) para codornas japonesas, utilizando e equações e simulações com o Reading Model.

MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de ética

Quatro estudos dose-resposta foram realizadas utilizando codornas japonesas. Os estudos foram realizados no Laboratório de Ciência Avícola da Universidade Estadual Paulista, UNESP Jaboticabal, SP, Brasil. A Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da UNESP (CEUA) aprovou todos os procedimentos experimentais usados nestes estudos, sob o número de protocolo não 9999/14.

Aves e delineamento experimental

As codornas foram alojadas em um galpão convencional com unidades experimentais compostas por gaiolas com sete aves cada (densidade de 239 cm² / ave). Antes do início dos experimentos, as aves foram alimentadas com uma dieta padrão para atender as necessidades nutricionais de codornas japonesas (Rostagno et al., 2011). Para cada experimento foram utilizados, trezentos e noventa e dois codornas japonesas na fase de postura, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Cada experimento teve sete tratamentos (níveis de aminoácidos), sete repetições e sete codornas por unidade experimental. Os experimentos começaram com codornas com 16 semanas de idade e os dados foram coletados durante sete semanas, assim,

terminando com 23 semanas de idade. O programa de iluminação adotado foi de 16 horas de luz e oito horas de escuro. A temperatura máxima ($31,5 \pm 0,98$ °C) e mínima ($20,5 \pm 0,68$ °C) foi registrada. A umidade relativa máxima e mínima foi de $78 \pm 1,67\%$ e $21 \pm 0,57\%$, respectivamente.

Dietas experimentais

Para cada um dos aminoácidos foi formulada uma dieta com alto teor de proteína, à base de milho e farelo de soja, contendo 13.00 g/kg de Lys; 7.80 g/kg de treonina (THR); 10,79 g/kg de MetCys e 2,76 g/kg de Trp (Tabela 1).

Tabela 1. Composição (g/kg) da dieta concentrada (Alta proteína) e da dieta sem nitrogênio (N-free) usada nas resposta de lisina (Lis), triptofano (Trp), metionina+cistina (MetCis) e treonina threonine (Thr)

Ingredientes	1º estudo		2º estudo		3º estudo		4º estudo	
	Concentr. Lisina	N- free	Concentr. Triptofano	N- free	Concentr. Met+cis	N- free	Concentr. Treonina	N-free
Farelo de Soja	344.00	--	275.70	--	275.60	--	307.80	--
Milho	473.00	--	470.70	--	471.80	--	488.60	--
Glúten de Milho	53.40	--	101.70	--	101.60	--	80.80	--
Óleo de Soja	25.00	40.7	37.20	68.00	37.50	68.00	15.60	40.70
Fosfato Bicalcico	10.90	16.4	6.80	16.40	6.50	16.40	10.90	16.40
Calcáreo	67.60	63.0	68.60	62.10	68.70	62.10	67.70	63.00
Sal Comum	3.20	3.2	2.60	3.30	2.60	3.30	3.20	3.20
Cloreto de Colina (60%)	1.00	--	1.00	--	1.00	--	1.00	--
Suplemento Vit e Min ⁽¹⁾	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
DL- Metionina (990g/kg)	6.10	--	6.00	--	4.10	--	5.70	--
L-Lisina HCl (78g/kg)	3.60	--	8.80	--	8.80	--	7.20	--
L-Treonina	1.20	--	2.60	--	2.50	--	--	--
L-Valina	1.50	--	2.40	--	2.40	--	1.40	--
L-Isoleucina	0.60	--	1.70	--	1.70	--	0.60	--
L-Arginina	4.00	--	6.60	--	6.70	--	4.60	--
L-triptofano	0.80	--	0.90	--	1.40	--	0.90	--
Cloreto de Potássio		17.6	2.60	13.30	2.60	13.30	--	17.60
Amido de milho		517.0	--	500.00	--	500.00	--	517.00
Açúcar		150.0	--	150.00	--	150.00	--	150.00
Casca de arroz		150.0	--	142.70	--	142.70	--	150.00
Inerte ⁽²⁾		38.0	--	40.00	--	40.00	--	38.00
Antioxidante ⁽³⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Composição Nutricional								
EME (kcal/kg)	2800	2800	3025	3025	3025	3025	2800	2800
Proteína Bruta	257.50	0.10	238.7	0.10	238.10	0.10	263.0	0.10
Cálcio	29.20	29.20	29.20	29.2	29.20	29.20	29.20	29.20
Dig. Metionina+cistina	12.40	--	12.60	--	10.80	--	12.40	--
Dig. Metionina	9.20	--	9.50	--	7.70	--	9.20	--
Dig. Lisina	13.00	--	15.40	--	15.40	--	15.20	--
Dig. Triptofano	3.20	--	2.80	--	3.20	--	3.20	--
Dig. Treonina	9.10	--	9.20	--	9.20	--	7.80	--
Dig. Arginina	17.50	--	17.80	--	17.80	--	17.90	--
Dig. Valina	11.30	--	11.50	--	11.50	--	13.70	--
Dig. Isoleucina	9.80	--	10.00	--	10.00	--	13.70	--

¹ Content (per kg of the diet)- Vit. A 1.750.000 U.I.; Vit. D3 500.000 U.I.; Vit. E 2.000 U.I.; Vit. K3 500 mg; Vit. B1 250 mg; Vit. B2 875 mg; Vit. B6 500 mg; Vit. B12 1.250 mcg/kg; Niacin 6.250 mg; Chlorine 65 g; pantothenate acid 2.500 mg; Copper 2.000 mg/kg; iron 12,500 g; Manganese 17,500 g; Zinc 12,500 g; Iodine 300 mg; Selenium 50 mg.

² Inert - Washed sand ;

³ butyl hydroxy toluene. BHT;

Para cada estudo uma dieta livre de nitrogênio, foi formulada para atender os mesmos níveis nutricionais como as dietas com alto teor de proteína, com exceção de proteínas e aminoácidos. As dietas sem nitrogênio foram usadas para diluir as dietas com alto teor em proporções adequadas, para obter os níveis crescentes dos aminoácidos para cada série de diluição (Fisher e Morris, 1970).

Para confirmar que a resposta das aves para cada série de diluições foi em função do respectivo aminoácido limitante, uma dieta de controle foi incluída em cada ensaio. Uma pequena quantidade do respectivo aminoácido cristalino foi adicionada à dieta com o nível mais baixo do aminoácido testado (D1) suficiente para atingir o nível do aminoácido no segundo nível mais baixo (D2), na série de diluição (Tabela 2). A dieta D7 foram formuladas para conter, respectivamente, 1,2 e 1,4 vezes a recomendação de lisina, triptofano, metionina+cistina e treonina, os outros aminoácidos foram ajustados com base nas recomendações de Rostagno et al. (2011). Este procedimento foi utilizado para assegurar que os aminoácidos foram o primeiro aminoácido limitante na proteína dietética com uma deficiência relativa de 20%, tal como recomendado por Fisher e Morris (1970).

Table 2. Proporções das dietas concentradas e isentas nos estudos de lisina (Lis); triptofano (Trp), Metionina+cistina (Metcis) e treonina (THR) que resultaram nas concentrações dos aminoácidos limitantes em cada estudo

Lisine			Triptofano			Met+Cis			Treonina		
Concentr	N-free	LIS	Concentr	N-free	TRP	Concentr	N-free	MC	Concentr	N-free	THR
%		g/kg	%		g/kg	%		g/kg	%		g/kg
20	80	2.60	25	75	0.69	25	75	2.70	20	80	1.56
40	60	5.20	36	64	1.00	40	60	4.32	40	60	3.12
50	50	6.50	50	50	1.38	50	50	5.40	50	50	3.90
60	40	7.80	65	35	1.80	63	37	6.80	70	30	5.46
80	20	10.40	77	23	2.13	75	25	8.10	80	20	6.24
86	14	11.20	89	11	2.45	88	12	9.50	90	10	7.02
100	0	13.00	100	0	2.76	100	0	10.79	100	0	7.80
20	80 ^a	5.20	25	75 ^b	1.00	25	75 ^c	4.32	20	80 ^d	3.12

^a Added 1.610 g of L-lysine/kg of diet; ^b Added 0.013g of L-tryptophan/kg of diet; ^c Added 1.560 g DL-Methionine/kg of diet; ^d Added 1.520 g LThreonine/kg of diet
^{a, b, c and d} Control diet.

Coleta de dados

Durante o período experimental as dietas e a água foram fornecidas ad libitum. As sobras da ração foram pesadas uma vez por semana para medir o consumo de ração. As ingestões dos aminoácidos foram estimadas pela multiplicação de consumo de ração e a concentração do aminoácido digestível nas dietas. O peso corporal foi mensurado na primeira, terceira e sétima semana experimental. A produção de ovos foi registrada diariamente e o peso do ovo foi medido em três dias consecutivos de cada semana.

Análises estatísticas e modelos matemáticos

Para realização das análises estatísticas, os dados dos tratamentos controle (D8) não foram utilizados, este tratamento foi utilizado apenas para validar a limitação dos aminoácidos testes nos estudos. No final de cada

ensaio, foram analisadas as médias e desvios padrão do consumo de ração, ingestão dos aminoácidos testes, a produção de ovos e peso corporal.

Reading Model

Para elaboração do Reading Model (Fisher et al., 1973) as respostas de produção de ovos e peso corporal foram aplicados de acordo com a seguinte expressão geral: $AAI_{opt} = \mu + y \times z$, em que AAI_{opt} é a ingestão ótima econômica; μ é a ingestão média da população, que é calculada pela equação $AAI = a \times MO + b \times PC$; y é o desvio padrão dos requisitos de aminoácidos; e Z é o índice econômico que sugere quantas vezes o desvio da exigência (y) tem de ser adicionada à exigência média da população.

Os parâmetros gerados pelo Reading Model são: a ingestão de aminoácidos em mg/ave dia (**AAI**); máxima massa de ovos, g / dia (**MO**); desvio padrão do dia MO, g / (**σMO**); peso corporal (PC), o desvio padrão de PC (**σPC**); exigência do aminoácido por grama de ovo, mg / g (**a**) e para a exigência de aminoácidos por quilograma do peso vivo, mg / kg (**b**). O desvio padrão das exigências foi calculada como se segue: $y = \sqrt{a^2 \times \sigma^2 MO + b^2 \times \sigma^2 PC}$. De acordo com Morris e Wethli (1978), a variância de $a \times MO + b \times PC$, assumindo correlação nula entre MO e PC, é $a^2 \times \sigma^2 MO + b^2 \times \sigma^2 PC$.

Aplicação do modelo para calcular a ingestão ótima econômica

A ingestão ótima de cada aminoácido foi calculada utilizando a simulação e equação descrito pelo Reading Model (Fisher et al., 1973). Utilizando-se esse modelo, a AAI_{opt} representa a quantidade extra de aminoácidos (mg / ave por

dia), que pode ser economicamente fornecido acima da exigência média da população. Para saber se a adição do aminoácido é economicamente viável, é utilizada a expressão: $Y \times Z$, onde Z é o índice que indica quantas vezes o desvio (y) deve ser adicionado à exigência média da população. A AA_{opt} foi criada usando a equação como descrito por Pilbrow e Morris (1974), onde z corrige o desvio y por fatores econômicos (k): $AA_{opt} = a \times E_{max} + b \times BW + \sqrt{(a^2 \times \sigma^2 E_{max} + b^2 \times \sigma^2 BW)} \times z$.

O valor z é o desvio padrão representado pelo produto entre a exigência do aminoácido e o custo da grama de ovo ($a \times k$). Onde, k é a relação custo-benefício, dado por US \$ mg de aminoácidos industrial / US \$ g de ovo.

Os dados aplicados para o modelo foram de uma dada população com um E_{max} média de 11 g / dia e 0,165 kg de BW. A uniformidade do lote foi obtida considerando 100% menos o coeficiente de variação (CV). Para o peso corporal, foi admitido um valor fixo para a uniformidade de 90%, correspondente a $\sigma^2 BW$ de 0,03 kg.

Para a variável de EO foram considerados quatro cenários de uniformidade dentro de um lote de 90%, 85%, 80% e 75%. Com base em CV foram calculados para cada cenário $\sigma^2 E_{max}$ de 0.6; 1.2; 1.8; 2,4 e 3.0 g/dia, dada como uma fonte de variação do modelo para calcular o AA_{opt} .

Os preços considerados foram 4.8 US \$ / kg de L-Lysine 78%, 18.83 US \$ / kg de L-triptofano 98%, 8.92 US \$ / kg de DL-Methione 99%, 11.73 US \$ / kg de L-Threonine 98.5% e US \$ 0,07 / unidade de 10 g de ovo de codornas.

Procedimento baseado na simulação utilizando 10.000 aves

Foi realizada uma simulação baseada na amostragem aleatória de Monte Carlo, onde utiliza-se amostra de aves com duas distribuições normais, não correlacionadas para máxima massa de ovos (MO) e peso corporal (PC), de acordo com Fisher et al. (1973). Os valores para os coeficientes a e b foram determinados por meio do PROC REG do programa estatístico do SAS, utilizando a fase linear das respostas obtidas. Para cada codorna, foi calculado o valor da AAI. A massa de ovos foi calculada pela equação: $MO = AAI - [b \times PC] / a$.

Na simulação, este procedimento foi repetido para toda a população de 10.000 aves, onde considerou-se uma estimativa da MO para cada indivíduo médio, considerando a AAI, repetindo durante o aumento dos níveis, estabelecendo o nível em que ocorre a estabilidade da resposta. Os níveis de ingestão dos aminoácidos foram determinados em função da MO da média da população. Sendo assim, foi possível, a partir de pequenos aumentos na ingestão dos aminoácidos, calcular o ótimo econômico com base no custo de entrada e receitas usando grandes populações. Neste método de simulação foi considerado os mesmos cenários de uniformidade para MO e PC, e os mesmos preços para os aminoácidos industriais e de ovos.

RESULTADOS

Na Tabela 3 estão apresentadas as respostas de codornas japonesas em função da ingestão de lisina, triptofano, metionina+cistina e treonina. Para as respostas avaliadas nos quatro estudos foram verificadas diferenças significativas

entre os tratamentos ($P < 0.01$). Foi confirmada através da técnica da diluição, que os aminoácidos estudados foram limitantes dieteticamente sobre as respostas das aves.

Tabela 3. Médias (Desvio padrão – DP) do consumo de ração, ingestão dos aminoácidos, massa de ovos e peso corporal para codornas japonesas

níveis g/kg	Consumo de ração (g/ave/d)		Ingestão dos aminoácidos (mg/ave/d)		Massa de ovos (g/ave d)		Peso corporal (kg)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Lisina</i>								
2,60	11,1	1,4	30,02	3,22	0,42	0,08	0,106	0,019
5,20	16,5	0,4	83,7	2,00	2,5	0,51	0,134	0,008
6,50	20,4	0,3	120,93	1,83	4,8	0,66	0,147	0,004
7,80	22,1	0,8	162,7	4,16	6,97	0,97	0,164	0,014
10,40	23,3	0,8	238,65	5,22	8,64	0,84	0,166	0,014
11,20	24,00	0,3	268,1	3,80	9,54	0,57	0,175	0,050
13,00	24,5	0,9	307,96	5,84	8,25	0,97	0,178	0,020
5,20 ^a	13,6	1,0	67,53	6,45	1,22	0,88	0,123	0,014
P-valor	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	
<i>Triptofano</i>								
0,69	16,29	1,42	11,24	10,98	0,47	0,34	0,136	0,009
1,00	19,71	2,55	19,71	2,55	3,62	1,04	0,150	0,005
1,38	21,01	1,13	28,99	1,69	6,57	1,05	0,160	0,005
1,80	23,37	2,02	40,67	3,51	8,84	1,30	0,174	0,004
2,13	24,20	1,45	51,54	3,08	10,14	0,55	0,179	0,002
2,45	24,44	0,79	60,85	1,96	10,62	0,83	0,184	0,004
2,76	24,81	1,72	68,47	4,75	10,31	0,73	0,180	0,006
1,00	15,15	1,32	15,15	1,32	0,55	0,44	0,141	0,009
P-value	<,0001		<,0001		<,0001		0,0022	
<i>Metionina + cistina</i>								
2,70	15,08	1,56	40,72	4,21	0,52	0,28	0,129	0,006
4,32	18,28	1,58	78,95	6,81	3,46	0,84	0,150	0,010
5,40	19,35	1,81	104,52	9,78	5,30	1,67	0,160	0,007
6,80	22,57	1,33	153,47	9,02	7,93	1,23	0,163	0,004
8,10	23,07	0,96	186,85	7,80	9,55	0,79	0,172	0,008
9,50	24,22	1,57	230,08	14,94	9,98	1,29	0,180	0,002
10,79	24,83	1,01	267,91	10,89	8,93	1,36	0,175	0,007
4,32	14,02	1,38	60,55	5,97	1,53	0,28	0,144	0,008
P-value	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	
<i>Treonina</i>								
1,56	11,62	1,59	15,68	1,88	0,54	0,15	0,114	0,016
3,12	14,26	0,50	45,28	2,13	2,30	0,19	0,141	0,004
3,90	19,57	0,61	78,03	2,26	4,98	0,28	0,146	0,010
5,46	23,36	0,92	131,03	3,56	8,53	0,32	0,150	0,003
6,24	24,25	0,67	154,43	3,14	9,09	0,16	0,163	0,003
7,02	24,26	0,22	178,92	1,98	9,65	0,24	0,164	0,004
7,80	24,16	0,24	194,13	2,71	9,21	0,40	0,164	0,003

3,12	12,58	1,61	32,05	2,16	0,91	0,19	0,122	0,009
P-value	<,0001		<,0001		<,0001		<,0001	

Parâmetros obtidos pelo Reading Model

O Reading Model foi ajustado utilizando como input a ingestão dos aminoácidos, a MO e o PC das aves. Para determinação do coeficiente de manutenção utilizou-se o PC e σ PC de 0.150 kg e 0.003 kg, respectivamente, para os quatro aminoácidos estudados. Para a determinação dos coeficientes de produção de ovos foram considerados os MO de 11.99; 11.56; 11.73 e 11.23 g/dia e MO para lisina, triptofano, metionina+cistina e treonina foram respectivamente de 0.40; 0.30; 0.20 e 0.30g / dia.

Os coeficientes obtidos para manutenção (b) foram de 204.88, 165.45, 96.90 e 49.25 mg/kg de peso corporal, respectivamente para lisina, metionina+cistina, treonina e triptofano, Os coeficientes gerados para produção de ovos (a) foram de 21.21, 16.00, 13.66 e 4.11 mg/g de massa de ovo para lisina, metionina+cistina, treonina e triptofano, respectivamente.

Aplicação do modelo para calcular a ingestão ótima econômica com base na simulação de uma população

Foram consideradas as equações abaixo para calcular a ingestão ótima econômica dos aminoácidos do plantel.

$$Lys_{opt} = 21 \times 11 + 205 \times 0.165 \sqrt{(21^2 \times \sigma_{MO}^2 + 205^2 \times 0.303^2)} \times 1.7063 \quad \text{Eq. 1}$$

$$MC_{opt} = 16 \times 11 + 165 \times 0.165 \sqrt{(16^2 \times \sigma_{MO}^2 + 165^2 \times 0.003^2)} \times 1.5410 \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Thr}_{\text{opt}}=17 \times 11 + 97 \times 0.165 \sqrt{(17^2 \times \sigma_{\text{MO}}^2 + 97^2 \times 0.003^2)} \times 1.4816 \quad \text{Eq. 3}$$

$$\text{Trp}_{\text{opt}}=4 \times 11 + 49 \times 0.165 \sqrt{(4^2 \times \sigma_{\text{MO}}^2 + 49^2 \times 0.003^2)} \times 1.8326 \quad \text{Eq. 4}$$

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 mostram os resultados da aplicação do modelo a uma população de 10.000 aves simuladas. Este procedimento considera as respostas de aves a cada ingestão de aminoácidos. Onze diferentes níveis dos aminoácidos estudados promoveram respostas nas aves. A ingestão ideal econômica pelo método de simulação foi estabelecido quando a receita foi superior ou igual ao custo.

A ingestão para atender a média da população foi de 268, 204, 166 e mg/ave dia de lisina, metionina+cistina, treonina e triptofano. Os resultados mostraram que a variação da população alterou a ingestão que proporciona atendimento para maior parte dos indivíduos da população e o ótimo econômico.

Como o aumento do CV houve maior necessidade de fornecimento de aminoácido para atender o maior no número de aves. Independentemente do aminoácido, o primeiro nível acima da média de ingestão calculado para a população de 10% do CV foi suficiente para satisfazer a maioria das aves e para obter maior receita.

No geral, a média a ingestão para atender a média da população estimou ingestões inferiores quando comparados ao método da simulação valores que estimou ingestões intermediárias e pelo método da equação, que estimou valores superiores.

Tabela 4. Número de aves que responderam ao consumo de lisina de acordo com o coeficiente de variação da população^a.

Consumo De lisina ¹	Custo ²	Coeficiente de variação %											
		10			15			20			25		
mg/bird d	US\$	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b
268	13	4987	11	122	5006	10	120	4980	10	117	4971	10	114
287	14	2131	11	54	2982	11	74	3485	11	85	3723	10	89
306	15	531	11	14	1445	11	36	2136	11	53	2571	11	63
325	16	87	11	2	530	11	13	1129	11	29	1657	11	41
344	16	6	11	0	136	11	3	537	11	14	973	11	25
363	17	-	11	-	31	11	1	208	11	5	526	11	13
382	18	-	11	-	5	11	0	52	11	1	221	11	6
401	19	-	11	-	1	11	0	14	11	0	96	11	2
420	20	-	11	-	-	11	-	2	11	0	37	11	1
439	21	-	11	-	-	11	-	-	11	-	15	11	0
458	22	-	11	-	-	11	-	-	11	-	3	11	0
Ingestão predita de lisina, mg/dia													
Média da população ⁴				268	268				268				268
Equação ⁵				308	328				348				367
Simulação ^c				287	306				325				344

^a Simulação com 10,000 aves; ^b Custo de produção US\$; ^c custo em US\$/kg de ovo: 2.315; custo da lisina US\$/kg: 4.8.

¹ Ingestão de lisina para necessária para produzir ovos com lucro

² Custo de produção – custo com a produção dos ovos

³ Numero de aves do plantel que foram atendidas com a ingestão do aminoácido no item 1

⁴ Média da população resultante da equação

⁵ equação completa considerando o ótimo econômico

Tabela 5. Número de aves que responderam ao consumo de metionina+cistina de acordo com o coeficiente de variação da população^a.

Consumo ¹ De Metcis	Custo ² US\$	Coeficiente de variação, %											
		10			15			20			25		
mg/bird d	US\$	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b
204	18	5084	11	124	5024	10	120	4962	10	116	4992	10	115
219	19	2005	11	51	2895	11	72	3351	11	82	3724	10	89
234	21	451	11	11	1276	11	32	2020	11	50	2567	11	63
249	22	50	11	1	433	11	11	1050	11	27	1565	11	39
264	24	1	11	0	90	11	2	471	11	12	875	11	22
279	25	-	11	-	14	11	0	167	11	4	441	11	11
294	26	-	11	-	1	11	0	47	11	1	199	11	5
309	28	-	11	-	-	11	-	14	11	0	83	11	2
324	29	-	11	-	-	11	-	4	11	0	28	11	1
339	30	-	11	-	-	11	-	1	11	0	7	11	0
354	32	-	11	-	-	11	-	-	11	-	1	11	0
Ingestão predita de metcis, mg/dia													
Média da população ⁴				204	204			204	204			204	
Equação ⁵				231	244			258	272				
Simulação ^c				219	234			249	249				

^a Simulação com 10,000 aves; ^b Custo de produção US\$; ^c custo em US\$/kg de ovo: 2.315; custo e metionina US\$/kg: 8.92.

¹ Ingestão metionina para necessária para produzir ovos com lucro

² Custo de produção – custo com a produção dos ovos

³ Numero de aves do plantel que foram atendidas com a ingestão do aminoácido no item 1

⁴ Média da população resultante da equação

⁵ equação completa considerando o ótimo econômico

Tabela 6. Número de aves que responderam ao consumo de treonina de acordo com o coeficiente de variação da população^a

Consumo de Treonina ¹ mg/dird d	Custo ² US\$	Coeficiente de variação %											
		10			15			20			25		
		nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b	nº aves ³	MO	receita ^b
166	20	4979	11	122	4990	10	119	4981	10	116	5017	10	115
181	21	1621	11	41	2588	11	64	3157	11	77	3478	10	83
196	23	203	11	5	953	11	24	1701	11	42	2123	11	52
211	25	9	11	0	206	11	5	697	11	18	1170	11	29
226	27	-	11	0	35	11	1	222	11	6	579	11	15
241	28	-	11	-	4	11	0	65	11	2	250	11	6
256	30	-	11	-	-	11	-	14	11	0	76	11	2
271	32	-	11	-	-	11	-	3	11	0	23	11	1
286	34	-	11	-	-	11	-	1	11	0	4	11	0
301	35	-	11	-	-	11	-	-	11	-	2	11	0
316	37	-	11	-	-	11	-	-	11	-	2	11	0
Ingestão predita de treonina, mg/dia													
Média da população ⁴				166	166				166	166			
Equação ⁵				189	200				210	222			
Simulação ^c				181	196				196	211			

^a Simulação com 10,000 aves; ^b Custo de produção US\$; ^c custo em US\$/kg de ovo: 2.315; custo de treonina US\$/kg: 11.73.

¹ Ingestão treonina para necessária para produzir ovos com lucro

² Custo de produção – custo com a produção dos ovos

³ Numero de aves do plantel que foram atendidas com a ingestão do aminoácido no item 1

⁴ Média da população resultante da equação

⁵ equação completa considerando o ótimo econômico

Tabela 7. Número de aves que responderam ao consumo de triptofano de acordo com o coeficiente de variação da população^a

Consumo de ¹ Triptofano	Custo ² US\$	Coeficiente de variação%											
		10			15			20			25		
mg/dird d	US\$	N ^o aves ³	EO	receita ^b	N ^o aves ³	EO	receita ^b	N ^o aves ³	EO	receita ^b	N ^o aves ³	EO	receita ^b
53	10	5024	11	123	4986	10	119	5008	10	117	5014	10	115
57	11	1892	11	48	2791	11	69	3326	11	81	3629	10	87
61	12	375	11	10	1234	11	31	1911	11	48	2428	11	60
65	12	43	11	1	394	11	10	991	11	25	1516	11	38
69	13	3	11	-	81	11	2	410	11	10	831	11	21
73	14	-	11	-	13	11	-	145	11	4	381	11	10
77	15	-	11	-	-	11	-	39	11	1	153	11	4
81	15	-	11	-	-	11	-	8	11	-	55	11	1
85	16	-	11	-	-	11	-	2	11	-	15	11	-
89	17	-	11	-	-	11	-	-	11	-	2	11	-
93	18	-	11	-	-	11	-	-	11	-	1	11	-
Ingestão predita de triptofano, mg/dia													
Média da população ⁴				53	53				53	53			
Equação ⁵				62	66				70	74			
Simulação ^c				57	61				65	69			

^a Simulação com 10,000 aves; ^b Custo de produção US\$; ^c custo em US\$/kg de ovo: 2.315; custo de triptofano US\$/kg: 18.38

¹ Ingestão triptofano necessária para produzir ovos com lucro

² Custo de produção – custo com a produção dos ovos

³ Número de aves do plantel que foram atendidas com a ingestão do aminoácido no item 1

⁴ Média da população resultante da equação

⁵ equação completa considerando o ótimo econômico

DISCUSSÃO

A confirmação que os aminoácidos estudados foram os limitantes é um passo importante na técnica da diluição (Bendezu et al. 2015, Silva et al., 2015 a,b). As melhores respostas foram obtidas nas dietas contra-prova em relação ao nível mais deficiente estudado de cada aminoácido. Confirmando que os aminoácidos estudados foram realmente os limitantes nas dietas.

Para a Lys, MetCys, Thr e Trp a estimativa da exigência pelo Reading Model foi respectivamente de 268; 204; 166 e 53 mg/ave/dia. Esses resultados corroboram com os valores obtidos por Rostagno et al. (2011) de 260; 213; 156 e 54 mg/ave/dia, respectivamente para Lys, MetCys, Thr e Trp.

A ingestão ótima econômica dos aminoácidos foram calculadas resolvendo a resolução da equação do Reading Model e por meio de uma simulação. Na simulação, o Emax do indivíduo foi determinado em virtude do aumento do consumo do aminoácido, onde foi possível chegar até o potencial genético de cada ave. A ingestão média foi obtida considerando as respostas individuais da população. Em ambos os procedimentos, o ótimo econômico foi obtido considerando o custo marginal do aminoácido e da massa de ovos, conforme descrito por Fisher (2015).

Analisando os resultados obtidos nas duas formas de obter o ótimo econômico foi possível perceber que a média do ótimo econômico obtido com a equação foi de 338, 251, 205 e 65 mg/ave/dia para Lys, MetCys, Thr e Trp, respectivamente. Já a ingestão ótima econômica encontrada para população de 10,000 aves simuladas foi de 316, 238, 196 e 63 mg/ave/dia,

respectivamente para Lys, MetCys, Thr e Trp. Estes resultados mostraram uma diferença de 5.5%, 5.2, 4.4% e 3.1% para Lys, MetCys, Thr e Trp, respectivamente.

Quando se aplica a equação do Reading Model notou-se que os animais precisam de uma maior ingestão quando comparada com a simulação para atingir o seu ótimo econômico, sendo possível observar uma diferença de 22, 13, 9 e 2 mg / ave para Lys, MetCys, Thr e Trp, respectivamente. A partir desses inputs é possível fornecer para o plantel de 10.000 um aumento de 0,22; 0,13; 0,09 e 0,02 kg por dia de Lys, MetCys, Thr e Trp, no qual representa um custo adicional de 1,6; 1,2; 1,1 e 1,1 US \$ por dia, respectivamente.

As equações geradas assumem a característica que as aves que produzem acima da média da população respondem de forma semelhante com o extra do aminoácido fornecido. A quantidade extra de aminoácido obtida destina-se proporcionalmente aos indivíduos que ainda não atingiram sua capacidade máxima de produção, corrigida pela taxa de produção e pelo valor marginal da produção de uma unidade de massa de ovo (Silva et al, 2015c). Então deve-se considerar a relação custo benefício do aminoácido no momento de atender as aves mais exigentes, pois quanto mais elevado o custo do aminoácido, menor quantidade será fornecido às aves. Em virtude disso, nas simulações a média da ingestão da população foi mantida, modificando apenas o CV do plantel. O objetivo do uso da equação e da simulação é o mesmo, pois ambos afirmam que quando ocorre aumento na ingestão do aminoácido, simultaneamente as aves mais exigentes irão obter melhor resposta e como

consequência irá ocorrer uniformidade na produção, pois a maioria das aves poderá expressar seu potencial genético.

Quando deseja-se aumentar a produção de ovos, uma alternativa poderia ser atender os animais mais exigentes da população, fornecendo a essas aves maior quantidade de aminoácidos, de forma que a resposta dessas aves se torna atraente para outros cenários econômicos (Silva et al. 2015). Sendo assim, os métodos propostos neste estudo permitem a reprodução para que cada granja possa avaliar o seu cenário econômico com a finalidade de tomar a decisão de até que ponto é viável atingir o ótimo econômico ou se apenas forneça a quantidade necessária para atender as necessidades nutricionais dos animais médios da população, atingindo o ótimo biológico. É importante ressaltar que em um cenário desfavorável (pelo preço do aminoácido ou pela desuniformidade da população) a melhor solução seria atender apenas os indivíduos médios (Hauschild et al., 2010; Silva et al., 2015).

O ótimo biológico obtido para o plantel foi de 268 mg de Lys / ave por dia, 204 mg de MC / ave por dia, 166 mg de Thr / ave por dia e 53 mg de Trp / ave por dia. Considerando o coeficiente de variação de 10% o ótimo econômico calculado pela equação foi de 308, 231, 189 e 65 mg Lys, MetCys, Thr e Trp/ ave por dia, respectivamente e pela simulação foi de 287, 219, 181 e 63 mg de Lys,MC, Thr e Trp / ave por dia, respectivamente. A elaboração de novos modelos para estimar as exigências dos aminoácidos, fundamentado na deposição de proteína do ovo poderá contribuir para avanços nos conhecimentos nutricionais, possibilitando assim, máxima utilização dos aminoácidos, explorar o máximo potencial genético de forma que vise maior

retorno econômico com benefícios ambientais para o país. O Reading model pode ser aplicado a qualquer cenário econômico de forma que a população possa expressar seu máximo potencial genético. As doses ótimas do fornecimento dos aminoácidos serão dependentes dos ingredientes utilizados e disponíveis na formulação de ração, bem como seu custo. Além disso o preço do aminoácido utilizado e a receita dos ovos produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bendezu, H.C.P., Sakomura, N.K., Venturini, K.S., Sato, J., Hauschild, L., Malheiros, E.B., Gous, R.M. 2015. In: Sakomura, N.K., Gous, R.M., Kyriazakis, I., Hauschild, L (Eds), Nutritional Modelling for Pig and Poultry, CABI International, Wallingford, pp. 259-268.
- Fisher, C., Morris, T.R. 1970. The determination of the methionine requirement of the laying pullet by a diet dilution technique. Br. Poult. Sci. 11, 67-82.
- Fisher, C., Morris, T.R., Jennings, R.C., 1973. A model for the description and prediction of the response of laying hens to amino acid intake. Br. Poult. Sci. 14, 469-484.
- Fisher, C. 2015. An Overview of poultry models. In: Sakomura, N.K., Gous, R.M., Kyriazakis, I., Hauschild, L (Eds), Nutritional Modelling for Pig and Poultry, CABI International, Wallingford, pp. 1-21.
- Gous, R.M. 2015. Modelling reproduction in broiler breeder and laying hens. In: Sakomura, N.K., Gous, R.M., Kyriazakis, I., Hauschild, L (Eds), Nutritional Modelling for Pig and Poultry, CABI International, Wallingford, pp. 38-49.

- Hauschild, L. et al. 2010. Systematic comparison of the empirical and factorial methods used to estimate the nutrient requirements of growing pigs. *Animal*, v.4, p.714-723.
- Pilbrow, P.J. Morris, T.R. (1974) Comparison of lysine requirements amongst eight stocks of laying fowl. *Br. Poult. Sci.* 15, 51-73.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L.T. and Euclides, R.F. 2011. Brazilian tables for poultry and swine-Composition of feedstuffs and nutritional requirements, third ed. Viçosa, MG.
- Sakomura, N.K.; Ekmay, R.D.; Mei, S.J.; Coon, C.N. 2015. Lysine, methionine, phenylalanine, arginine, valine, isoleucine, leucine, and threonine maintenance requirements of broiler breeders. *Poultry Science* 94:2715–2721.
- SAS, 2010. User's Guide: Statistics (version 9.2). SAS Institute Inc.
- SILVA, E.P, SAKOMURA, N.K., OLIVEIRA, C.F.S., COSTA, F.G.P., DORIGAM, J.C.P., MALHEIROS, E.B. 2015. The optimal lysine and threonine intake for Cobb broiler breeder hens using reading model. *Livestock Science*.
- Silva, E.P., Malheiros, E.B., Sakomura, N.K., Venturini, K.S., Hauschild, L., Dorigam, J.C.P., Fernandes, J.B.K. 2015a. Lysine requirements of laying hens. *Livest. Sci.* 173, 69-77.
- Silva, E.P, Sakomura, N.K., Oliveira, C.F.S., Costa, F.G.P., Dorigam, J.C.P., Malheiros, E.B. 2015b. The optimal lysine and threonine intake for Cobb broiler breeder hens using reading model. *Livest. Sci.* 174, 59-65.

Wethli, E., Morris, T.R. 1978. Effects of age on the tryptophan requirement of laying hens. *Br. Poult. Sci.* 19, 559-565.