

**LORRAYNE BERNEGOSSI POLONIO**

**Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como Suplemento  
de Rações para Galinhas Poedeiras**

**Araçatuba – SP**

**2007**

**LORRAYNE BERNEGOSSI POLONIO**

**Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como Suplemento  
de Rações para Galinhas Poedeiras**

**Dissertação de mestrado apresentada à  
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina  
Veterinária da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de  
Araçatuba, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ass. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Helena Giglio Ponsano**

**Araçatuba – SP**

**2007**

## *Dedicatória*

*Dedico...*

*A Deus,  
que me conduz pela vida de acordo com o Seu projeto de amor.*

*Ao meu querido esposo Fernando,  
pela imensa compreensão, por sempre acreditar em mim e por seu amor,  
que é um presente de Deus na minha vida.*

## *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araçatuba, pela acolhida.

À Prof<sup>ª</sup>. Ass. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Helena Giglio Ponsano pela orientação e pela dedicação demonstrada durante todo o trabalho. Sua presença foi constante e fundamental para a execução da pesquisa.

Ao Prof. Adj. Manuel Garcia Neto pelas instruções sobre manejo das aves, pelo processamento e análise estatística de parte dos dados.

Ao Prof. Ass. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles pelo auxílio na análise do material histopatológico.

Ao Prof. Ass. Dr. Marcos Franke Pinto pela colaboração na execução do experimento, pela atenção e presteza.

Ao Prof. Ass. Dr. Paulo César Ciarlini e à residente Tatiana de Souza Barbosa pelo processamento e execução dos exames sorológicos.

À Prof<sup>ª</sup>. Ass. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Helena Venturoli Perri pelo processamento e análise estatística de parte dos dados.

À Prof<sup>ª</sup>. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos pelas instruções sobre métodos de colheita e conservação de peças anatômicas para análises histopatológicas.

À Prof<sup>ª</sup>. Cristina Maria Rodrigues Monteiro, ao Prof. Titular Wilson Machado de Souza e à Prof<sup>ª</sup>. Maria Cecília Rui Luvizoto por permitirem a confecção do material histopatológico nos laboratórios sob suas responsabilidades e às funcionárias Marta Paccanaro Peres e Magna Adriana da Silva Galvão pelo grande auxílio e instrução na confecção das mesmas.

Às médicas veterinárias Michele Honaga e Ana Paula da Silva Almeida pela maravilhosa convivência e pelo auxílio na execução de todas as etapas do trabalho, às vezes até tarde da noite.

Aos alunos de graduação do Curso de Medicina Veterinária – UNESP - Campus de Araçatuba Tiago Augusto Ferrari, Luis da Silveira Neto, Saulo Vinícius Avanço, Débora Testoni Dias, Renata Zanutto Paulino, Juliana Pampana Nicolau, e ao mestrando Luis Carlos Garibaldi Simon Barbosa pelo auxílio e colaboração no trabalho.

Às funcionárias da biblioteca do Curso de Medicina Veterinária – UNESP - Campus de Araçatuba, Isabel Pereira de Matos, Fátima Maria Metello Bertolucci e Alexandra Bento pelo carinho e pelas instruções.

Ao funcionário do laboratório de alimentos do Curso de Medicina Veterinária – UNESP - Campus de Araçatuba, Alexandre José Teixeira pela amizade e pela colaboração na execução do trabalho.

Aos funcionários Adão Ângelo Custódio e Nerci Ramos Abreu pela colaboração, pelo apoio e pela prontidão demonstrados na realização do abate das aves.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro para a execução do experimento.

Aos professores do curso pelos ensinamentos transmitidos.

Às aves que doaram suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## *Epígrafe*

*“Antes do compromisso, há hesitação, a oportunidade de recuar, uma ineficácia permanente. Em todo ato de iniciativa (e de criação), há uma verdade elementar cujo desconhecimento destrói muitas idéias e planos esplêndidos.*

*No momento em que nos comprometemos de fato, a Providência também age. Ocorre toda espécie de coisas para nos ajudar, coisas que de outro modo nunca ocorreriam. Toda uma cadeia de eventos emana da decisão, fazendo vir em nosso favor todo tipo de encontros, de incidentes e de apoio material imprevistos, que ninguém poderia sonhar que surgiriam em seu caminho.*

*Começa tudo o que possas fazer.*

*A ousadia traz em si o gênio, o poder e a magia.”*

*Goethe*

# *Sumário*

<b><i>Capítulo 1</i></b>	9
Resumo	10
Palavras-chaves	10
Abstract	11
Key words	11
Introdução	12
Revisão da literatura	15
1 Carotenóides na natureza	15
2 Carotenóides e os animais	16
3 Carotenóides e pigmentação	17
4 Pigmentação da gema de ovos	18
5 Carotenóides como suplementos de rações animais	20
6 Produção de carotenóides bacterianos em efluentes industriais	22
Referências	25
<b><i>Capítulo 2</i></b>	30
Artigo científico	31
Anexos	53
Tabela 6	54
Tabela 7	54
Parecer técnico das análises histopatológicas	55
Fotografias referentes ao experimento	57
Normas do Periódico Journal of Applied Poultry Research	62

## *Lista de tabelas*

Tabela 1	47
Tabela 2	49
Tabela 3	50
Tabela 4	51
Tabela 5	52
Tabela 6	54
Tabela 7	54

# *Capítulo 1*

**POLONIO, L.B. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como suplemento de rações para galinhas poedeiras. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.**

## **Resumo**

Os efeitos da adição de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* em dietas de galinhas poedeiras foram investigados. Sorgo e milho foram utilizados para formulação de rações basais que receberam níveis crescentes de biomassa. A biomassa bacteriana aumentou a tonalidade de vermelho e diminuiu a luminosidade das gemas quando adicionada a ambas as rações basais. Na ração à base de milho, 1.500ppm de biomassa foram suficientes para alcançar a preferência do consumidor, enquanto que, com ração à base de sorgo, 7.500ppm foram necessários para atingir o mesmo objetivo. Galinhas alimentadas com ração à base de milho tiveram consumo de ração superior e melhor conversão alimentar que aquelas alimentadas com ração à base de sorgo, mas os níveis de inclusão da biomassa em ambas as rações basais não influenciaram estes parâmetros. Durante o período experimental não ocorreu mortalidade nem mudança no peso das galinhas. As galinhas alimentadas com ração à base de milho mostraram taxas superiores de produção de ovos, peso e massa de ovos que aquelas alimentadas com ração à base de sorgo. Estes parâmetros não foram influenciados pela inclusão de níveis de biomassa em ambos os tipos de ração. Níveis normais para enzimas séricas e ausência de lesões degenerativas e inflamatórias nos fígados e nos rins das galinhas permitem a indicação da biomassa para suplementação de rações.

**Palavras-chaves:** Cor da gemas de ovos, Preferência do consumidor, Desempenho

**POLONIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA NETO, M.; PINTO, M. F. Utilization of *Rubrivivax gelatinosus* biomass to supplement laying hens rations. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.**

### **Abstract**

The effects of the dietary inclusion of *Rvi. gelatinosus* biomass in layers rations were investigated. Sorghum and corn were used for the formulation of basal rations that received increasing levels of biomass. The bacterial biomass increased red hues and decreased lightness of yolks when added to both basal rations. Biomass at 1,500ppm in the corn-based ration was enough to reach consumers` preference, while with the sorghum-based ration, 7,500ppm were necessary to reach the same. Hens fed corn-based rations had superior feed consumption and better feed conversion than those fed sorghum-based rations but the inclusion levels of the biomass on both basal rations did not influence these parameters. No mortality and no change on layers weight occurred during the experimental period. Hens fed corn-based rations showed superior egg production, egg weight and egg mass rates than those fed sorghum-based rations. These parameters were not influenced by the inclusion levels of the biomass on both kinds of rations. Normal levels for seric enzymes and the absence of degenerative and inflammatory lesions in livers and kidneys of hens allow the indication of the biomass for ration supplementation.

**Key words:** Egg yolk color, Consumer preference, Performance

## Introdução

A aparência dos alimentos, principalmente em relação à coloração, é uma característica determinante na aceitação dos mesmos pelo consumidor. Geralmente, os consumidores preferem produtos que apresentam, no momento da compra, cores intensas e uniformes, pois julgam que são saudáveis, frescos, nutritivos e foram produzidos dentro de padrões de qualidade, enquanto que alimentos de cores pálidas são comumente rejeitados pelos consumidores, pois seu aspecto pode gerar desconfiança, suspeita de deterioração, ou mesmo, repugnância (FONTANA, 2003; LIUFA et al., 1997; NYS, 2000; PONSANO et al.; 2002b).

Em tempos remotos, não havia problemas com a coloração de produtos de origem animal, pois os métodos de produção eram extensivos, com o objetivo de abastecer a própria família do criador ou, no máximo, diminutos mercados. Isto é particularmente verdadeiro no tocante à criação de galinhas poedeiras, as quais podiam se alimentar por si próprias, e seus hábitos alimentares geravam ovos com gemas de tonalidade agradável aos consumidores habituais (BOSMA et al., 2003; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990).

No momento em que as pessoas passaram a se concentrar em cidades, os métodos de produção tiveram de ser adaptados para atender à grande demanda por produtos de origem animal, como os ovos, produto focado neste trabalho. As aves, então confinadas em granjas, dependiam da dieta fornecida pelos criadores para proporcionar ovos com gemas de coloração compatível com a preferência do consumidor. Desta forma, a responsabilidade por esta tarefa recaiu sobre os ingredientes da ração, principalmente, o milho amarelo, que constitui o cereal mais utilizado na alimentação de aves (LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PONSANO et al., 2004).

O milho, assim como os vegetais, as algas, alguns fungos e algumas bactérias, apresentam pigmentos chamados carotenóides. Estes são responsáveis pela diversidade de cores observadas na natureza, com tonalidades que vão do amarelo ao vermelho. As cores das pétalas de flores, como margaridas e girassóis; de frutas, como morango e pêssego; de alguns insetos, como besouros e borboletas; de aves como flamingo e arara vermelha; de peixes, como salmão e peixe palhaço; de crustáceos, como lagosta e camarão, etc., são proporcionadas pelos pigmentos carotenóides. A natureza sem os carotenóides seria bem menos colorida e menos bela (GOUVEIA et al., 1996; HUDON, 1994; WILLIAMS, 1992).

No entanto, os animais são incapazes de produzir tais pigmentos, e precisam ingerí-los na sua dieta para que produtos de origem animal tenham uma coloração adequada. A cor das gemas,

portanto, depende da presença de carotenóides na dieta das galinhas e, quanto mais as aves consumirem alimentos que contenham pigmentos carotenóides em sua constituição, tanto maior será a deposição destes pigmentos nas gemas dos ovos e a intensidade da sua coloração (AWANG et al., 1992; BAUERNFEIND, 1972; HENCKEN, 1992; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981, LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981).

O milho sozinho, porém, nem sempre pode gerar nas gemas a coloração desejada pelos consumidores, pois seus pigmentos carotenóides podem variar devido à sua instabilidade. Os carotenóides podem sofrer oxidação degradativa dependendo do tempo de estocagem do milho, da temperatura ambiente e da incidência de iluminação. Até mesmo os processos de colheita e de moagem do milho para a produção de ração podem comprometer a quantidade destes pigmentos e prejudicar a absorção e deposição de carotenóides pelas aves nos tecidos corporais, em particular na gema do ovo (EL BOUSHY; RATERINK, 1992; NYS, 2000).

Com a intenção de solucionar este problema, várias pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de buscar fontes alternativas de pigmentos carotenóides a serem adicionadas à ração de galinhas poedeiras para melhorar a coloração das gemas. Devido à tendência atual para o uso de produtos naturais, muitas algas, leveduras, vegetais e microrganismos estão sendo estudados e recomendados para utilização como suplemento pigmentante (AKIBA et al., 2000; BOSMA, et al., 2003; EL BOUSHY; RATERINK, 1992; FARRAN, 2001; GOUVEIA et al., 1996; LIUFA et al, 1997; PATERSON et al., 2000; PEREZ-VENDRELL, et al., 2001; PINCHASOV et al., 1992; PONSANO et al., 2002b; PONSANO et al., 2004; PRABAKARAN et al., 2001).

Dentre estas fontes alternativas de pigmentos carotenóides, está a biomassa de coloração vermelho-púrpura produzida pela bactéria fotossintetizante *Rubrivivax gelatinosus*. Esta bactéria não patogênica é encontrada em ambientes aquáticos, solos úmidos e efluentes industriais, onde desempenha uma função primordial na despoluição das águas residuárias. A biomassa oriunda do cultivo desta bactéria em efluente de abatedouro avícola é rica em nutrientes e pigmentos carotenóides, sugerindo sua utilização como suplemento para ração de galinhas poedeiras com a intenção de aumentar a pigmentação da cor da gema (PONSANO et al., 2002a; 2003; 2004).

O fato de *Rubrivivax gelatinosus* ser um microrganismo com capacidade depuradora de efluentes e de sua biomassa ser constituída por nutrientes e pigmentos carotenóides significa um magnífico recurso para a avicultura industrial, pois o substrato para o crescimento da bactéria é um subproduto poluidor da indústria alimentícia, que precisa ser tratado ou eliminado por todas as indústrias de produtos avícolas (PONSANO et al., 2002a).

A presente pesquisa teve o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação de diferentes níveis de biomassa da referida bactéria em ração para galinhas poedeiras quanto à tonalidade das

gemas, à fisiologia das aves, aos parâmetros de desempenho e à preferência do consumidor. Estes estudos estão abordados no artigo científico apresentado no capítulo 2 da presente dissertação de mestrado.

## Revisão da Literatura

### 1 Carotenóides na natureza

Os carotenóides são uma classe de pigmentos de ocorrência natural, de cores amarela, alaranjada e vermelha. O nome do grupo é devido ao fato dos carotenóides constituírem o principal pigmento da cenoura (*Daucus carota*), um dos primeiros alimentos em que se observou esta classe de pigmentos. Os carotenóides constituem o grupo de pigmentos de ocorrência natural mais difundida. Cerca de 600 pigmentos carotenóides foram isolados e identificados nos reinos animal e vegetal e a cada ano este número aumenta com a descoberta de novos pigmentos (BAUERNFEIND, 1972; GOODWIN, 1986; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990; NYS, 2000).

Universalmente presentes em tecidos vegetais fotossintéticos, os carotenóides também podem ser encontrados em tecidos não fotossintéticos de plantas superiores, como frutas, pétalas de flores, pólen, raízes, etc., bem como em tecidos animais. Neste caso, eles aparecem como consequência da deposição em tecidos-alvos, uma vez que os animais são incapazes de sintetizar seus próprios carotenóides, dependendo totalmente da ingestão na dieta para seu suprimento de pigmentos carotenóides (AWANG et al., 1992; BAUERNFEIND, 1972; BOSMA et al., 2003; GOUVEIA et al., 1996; HENCKEN, 1992; HUDON, 1994; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990; LIUFA et al., 1997; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; NYS, 2000; PONSANO et al., 2002b; PONSANO et al., 2004; WILLIAMS, 1992).

Além de sua variedade e beleza, os pigmentos carotenóides executam funções muito variadas na vida de vários organismos. No reino vegetal, por exemplo, os carotenóides têm importância na fotossíntese ao partilhar com a clorofila uma função chave no metabolismo de energia dos vegetais superiores. Esses pigmentos são considerados condutores de energia, pois absorvem a luz como um tipo de antena, tornam-se excitados e transferem esta energia capturada para centros de reação, onde a energia da luz é convertida em energia elétrica e, então, em energia química, na forma de trifosfato de adenosina (ATP), substância necessária para a síntese de uma variedade de compostos (LATSCHA, 1990).

No reino animal, várias interações intra e inter-específicas e modelos de comportamento são fortemente influenciadas pela cor, que atua como sinal, por exemplo, como um atrativo, uma advertência ou como uma camuflagem, em comunicações entre uma ampla variedade de

organismos. À parte destas funções sinalizadoras óbvias, contudo, os carotenóides também realizam uma ampla extensão de tarefas puramente fisiológicas, atuando como precursores da vitamina A e participando do desenvolvimento e maturação gonadal, da fertilização, da gestação, da viabilidade e crescimento, particularmente de peixes e crustáceos e no processo reprodutivo de uma grande variedade de classes e espécies animais, como por exemplo, aves, bovinos, eqüinos e suínos (AMAYA, 1985; BHOSALE; BERNSTEIN, 2005; BOSMA, et al., 2003; GOODWIN, 1986; HENCKEN, 1992; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PEREZ-VENDRELL, et al., 2001).

Os carotenóides são divididos, quimicamente, em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos puros, ou seja, compostos consistindo apenas de átomos de carbono e hidrogênio, sem oxigênio, geralmente de cor alaranjada. As xantofilas, por sua vez, são derivadas dos carotenos correspondentes pela adição de várias funções de oxigênio, de coloração amarela e vermelha, também chamadas oxicarotenóides. Os carotenóides mais adequados para a pigmentação são aqueles contendo funções oxigenadas por apresentarem a capacidade de se depositar nos tecidos animais (BHOSALE; BERNSTEIN, 2005; EL BOUSHY; RATERINK, 1992; LATSCHA, 1990; LIAAEN-JENSEN, 1978; WILLIAMS, 1992; PONSANO et al., 2004).

## **2 Carotenóides e os animais**

Os carotenóides ingeridos pelos animais em sua alimentação são absorvidos pelo intestino delgado, principalmente na área do jejuno-íleo e uma pequena porção no duodeno, junto com outros lipídeos (EL BOUSHY; RATERINK, 1992; LATSCHA, 1990; NYS, 2000; PEREZ-VENDRELL et al., 2001).

Os mamíferos, de modo geral, não acumulam carotenos nem xantofilas. Até o que se sabe hoje, o homem é o único entre os mamíferos que acumula pigmentos carotenóides em quantidades significantes. Em contraste, invertebrados marinhos e terrestres são ricos em carotenóides (esponjas, celenterados, equinodermos, caracóis, crustáceos, insetos), como são, também, um grande número de peixes e aves. As aves, em geral, absorvem principalmente oxicarotenóides que se acumulam em locais como a pele, a plumagem, as pernas, o tecido adiposo corporal, o fígado e, acima de tudo, a gema do ovo. Portanto, a coloração amarelo-alaranjada da gema de ovo não é sintetizada pela galinha, mas é proveniente da transferência dietária e depósito de pigmentos oxicarotenóides (xantofilas) presentes na ração (AWANG et al.,

1992; BAUERNFEIND, 1972; BOSMA et al., 2003; GOUVEIA et al., 1996; HENCKEN, 1992; HUDON, 1994; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990, MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PRABAKARAN et al., 2001; WILLIAMS, 1992).

Em animais, os carotenóides também exercem várias funções protetoras. Eles podem, efetivamente, destruir espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e inibir sua formação, atuando, desta forma, como um antioxidante. Recentemente, foi evidenciada uma importante função no campo da imunologia veterinária e humana. Em frangos, os carotenóides podem fornecer proteção contra encefalomalácea. Os carotenóides parecem aumentar a atividade citotóxica de *Natural Killers*, diminuir a velocidade de crescimento de tumores e promover a cura de feridas (BHOSALE; BERNSTEIN, 2005; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990; NYS, 2000).

Evidências epidemiológicas sugerem que as xantofilas dietárias podem inibir o começo de muitas doenças, tais como aterosclerose, catarata, degeneração macular relacionada à idade, esclerose múltipla e cânceres. Devido às notáveis propriedades antioxidantes e funções relacionadas à saúde, as xantofilas constituem um mercado mundial multimilionário (BHOSALE; BERNSTEIN, 2005).

### **3 Carotenóides e pigmentação**

As cores são parte integral da experiência diária do homem. Não é de admirar, portanto, que as cores também possuam uma importante função na culinária pois, para que um produto comestível em particular seja considerado apetitoso, ele deve apresentar uma determinada cor. Foi demonstrado, repetidamente, que uma mudança radical na coloração do alimento, ainda que sem mudança no sabor e aroma, pode torná-lo completamente inaceitável (WILLIAMS, 1992).

Cores fortes e vivas aguçam o apetite, aumentam a satisfação e a apreciação do alimento, e atuam também como um tipo de tempero. Em contraste, cores parecendo artificiais dão origem a desconfiança e rejeição. Dos diferentes critérios de qualidade, a cor é, portanto, um dos mais importantes, embora freqüentemente subestimada. Então, não é coincidência que extratos de grãos e plantas tais como páprica, açafrão, cenoura, pimenta e outros tenham sido usados por séculos para refinar alimentos em todo o mundo (LASTCHA, 1990).

Para a maioria dos consumidores, poucas propriedades dos alimentos são mais importantes do que a cor. Quando determinado produto se apresenta com a coloração esperada, a resposta do consumidor é agradável, porém, quando o alimento tem uma coloração inesperada, o consumidor

torna-se cauteloso e interpreta-a como um possível sinal de imaturidade, de deterioração, de processamento inapropriado ou adulterado. A coloração do alimento influencia na decisão de compra do produto. Em adição, há uma conexão entre cor e saúde onde, normalmente, há um instinto de rejeição por alimentos de origem animal que se apresentam pálidos. Cores naturais e brilhantes dão impressão de um alimento de alta qualidade, sadio e nutritivo (FONTANA, 2003; GOUVEIA et al., 1996; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981, LATSCHA, 1990; LIUFA et al., 1997; NYS, 2000; PONSANO et al., 2002b; PONSANO et al., 2004; SUNDE, 1992; WILLIAMS, 1992).

No intuito de atender às exigências dos consumidores e das indústrias produtoras de alimentos, os produtores de aves adicionam corantes, geralmente sintéticos, às dietas de galinhas poedeiras para melhorar a atratividade de ovos e seus produtos (AWANG et al., 1992; BAUERNFEIND, 1972; BOSMA et al., 2003; HENCKEN, 1992).

Pigmentos ou corantes são termos que designam compostos que, quando presentes na matéria-prima ou adicionados às rações, têm um efeito corante nos tecidos dos animais como pele, gordura e músculo, ou seus produtos tais como ovos, manteiga e queijo (BAUERNFEIND, 1972; LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981).

O grupo de corantes alimentares mais difundido pertence à família dos carotenóides, os quais estão naturalmente presentes em vegetais, como frutas, grãos de cereais, alimentos marinhos e laticínios. Em animais, a presença de carotenóides é responsável, por exemplo, pela cor do peixe dourado, do camarão, dos canários e dos flamingos (WILLIAMS, 1992).

Por isso, além da ampla extensão de funções fisiológicas, os carotenóides também influenciam a aparência, isto é, a coloração de muitos produtos usados pelo homem como alimento. Ultimamente, a principal significância dos carotenóides é sua utilidade como pigmentante natural adicionado à ração de animais para elevar a qualidade da aparência de muitos alimentos de origem animal, tais como ovos (AMAYA, 1985; BAUERNFEIND, 1972; HENCKEN, 1992; LATSCHA, 1990).

#### **4 Pigmentação da gema de ovos**

Os ovos são uma rica fonte de nutrientes vitais e, por isso, são comumente usados na alimentação humana. O grau de pigmentação das gemas de ovos depende basicamente do desejo do consumidor e varia com a área geográfica, tradição e cultura. Em países como Alemanha, França (região Sul), Países Baixos, Espanha, Itália, Peru, Colômbia, Israel, Suíça, Ceilão,

Austrália, Nova Zelândia, Irlanda do Norte, África do Sul, Estados Unidos (região Nordeste), México e Bélgica, gemas de coloração mais alaranjada são preferidas (EL BOUSHY; RATERINK, 1992; GOUVEIA et al., 1996; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; NYS, 2000; PRABAKARAN et al., 2001; SUNDE, 1992). No Norte da França, no Sul da Inglaterra e na Finlândia, os consumidores preferem gemas de coloração intermediária, enquanto que na Irlanda, no Norte da Inglaterra e na Suécia, a preferência é por gemas de cor pálida (SUNDE, 1992; NYS, 2000). No Brasil, consumidores de algumas regiões preferem gemas de ovos bem pigmentadas (PONSANO et al., 2002b; 2004), havendo diferenças de preferência entre regiões metropolitanas e interioranas. Em muitas áreas de mercado ao redor do mundo, consumidores e indústrias que produzem alimentos contendo ovos em sua formulação (maionese, misturas para bolos, produtos de confeitaria, massas, e outros) preferem gemas de ovos fortemente coloridas, sendo difícil resistir ou ignorar essa tendência cultural e comercial (AKIBA et al., 2001; BAUERNFEIND, 1972; EL BOUSHY; RATERINK, 1992; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PONSANO et al., 2002b; WILLIAMS, 1992).

Com o advento da industrialização e dos grandes avanços nos campos da medicina e da higiene no início do século XIX, uma mudança fundamental nas estruturas sociais começou a se desenvolver. O resultado foi a migração da população rural e a concentração de setores industrializados da sociedade em cidades, um aumento exponencial sustentado da população e, em consequência, uma mudança fundamental na situação de suprimento de alimentos. A pequena propriedade rural foi substituída pelo empreendimento agrícola racionalizado focado na maximização da produção, visando suprir as necessidades da população crescente com produtos essenciais, particularmente, proteína animal (LATSCHA, 1990).

Na época de produção extensiva de aves, a pigmentação dos produtos não apresentava problemas, pois a alimentação com milho, o livre acesso das galinhas à grama verde e a oportunidade de se alimentarem por si mesmas garantiam uma adequada pigmentação às gemas de ovos, embora a taxa produção fosse baixa (BOSMA et al., 2003; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981).

Atualmente, com os métodos de criação intensivos, o peso da pigmentação recaiu sobre o milho amarelo, que nem sempre produz resultados adequados sem a ajuda de quantidades significativas de corantes provenientes de fontes externas. Além disso, a seleção genética de linhagens animais de alta produção com menor ingestão de ração e o uso de dietas com baixo teor de fibras resultaram em uma ingestão menor de xantofilas para serem transferidas e depositadas nas gemas que, conseqüentemente, se tornaram de coloração mais clara

(BAUERNFEIND, 1972; CHANDRA et al., 1978; KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PONSANO et al., 2004).

Em geral, o uso de rações ricas em carotenóides, ou de suplementos carotenóides na ração, efetivamente mantém ou aumenta a coloração onde carotenóides são limitantes. Estas práticas têm se tornado o principal meio de conseguir a coloração desejada em vários produtos de origem animal, incluindo gemas de ovos (HUDON, 1994).

## **5 Carotenóides como suplementos de rações animais**

Nos últimos anos, tem havido uma tendência para uso de produtos naturais e de baixo custo, em detrimento ao uso de produtos artificiais ou sintéticos para suplementação de dietas animais, com o objetivo de melhorar a coloração de alimentos. Devido ao fato dos carotenóides serem pigmentos naturais, eles estão bem adaptados a esta crescente demanda de grandes grupos de consumidores para o uso de, somente, pigmentos de ocorrência natural em rações e produtos alimentares. (BAUERNFEIND, 1972; LATSCHA, 1990; PONSANO et al., 2004; TOYOMIZU et al., 2001).

Os carotenóides mostram pobre estabilidade e são altamente sensíveis a uma ampla variedade de fatores, tais como luz, oxigênio, ácidos, bases e calor. Sob tais condições, os carotenóides são suscetíveis a processos de degradação oxidativa rápida (LATSCHA, 1990; NYS, 2000).

A taxa de diminuição do conteúdo de carotenóides aumenta quando a temperatura ambiente está elevada. O conteúdo de carotenóides dos ingredientes naturais das rações mostra uma grande variação. Entre os grãos, somente o milho amarelo e seus subprodutos contêm quantidades mensuráveis destes pigmentos, com os carotenos representando somente cerca de 10% do total de carotenóides e as xantofilas 90%. Porém, o conteúdo total de carotenóides do milho amarelo - principal cereal utilizado como ingrediente energético e fonte de xantofilas na ração para aves - não é constante. As condições de colheita e a moagem podem destruir ou remover uma porção considerável do conteúdo de carotenóides. A estocagem do milho por um ano a 25°C determina perda de 50% do seu conteúdo de oxicarotenóides. Este fato deve ser considerado por países que dependem da importação de ingredientes para ração (BAUERNFEIND, 1972; EL BOUSHY; RATERINK, 1992; LATSCHA, 1990; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; NYS, 2000).

Por conta disto, muitas pesquisas têm sido realizadas, para testar xantofilas de plantas, algas e leveduras no intuito de obter fontes alternativas de carotenóides suplementares de origem natural para aumentar o conteúdo destes pigmentos na ração para aves (AKIBA et al., 2000; AWANG et al., 1992; BOSMA, et al., 2003; EL BOUSHY; RATERINK, 1992; FARRAN, 2001; GOUVEIA et al., 1996; LIUFA et al, 1997; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PATERSON et al., 2000; PEREZ-VENDRELL, et al., 2001; PINCHASOV et al., 1992; PONSANO et al., 2002b; PONSANO et al., 2004; PRABAKARAN et al., 2001).

Pinchasov et al. (1992) compararam dietas à base de milho e soja adicionadas de diferentes concentrações cantaxantina sintética (Carophyll red - Roche<sup>®</sup>) e observaram que, aumentando os níveis de cantaxantina, a pigmentação da gema aumentou de maneira quadrática. Gouveia et al. (1996) avaliaram o efeito dos carotenóides presentes na biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* sobre a pigmentação das gemas de ovos, quando incluída na ração, com bons resultados. Liufa et al. (1997) utilizaram farinha de folha de *Alocasia macrorrhiza*, rica em xantofilas, na ração de aves com bons resultados na pigmentação das gemas e boas perspectivas para seu uso como pigmentante de tecidos e produtos avícolas. Baiao et al. (1999) avaliaram a eficácia pigmentante de vários oxicarotenóides na gema do ovo, utilizando três fontes dietárias de oxicarotenóides amarelos e duas fontes de carotenóides vermelhos combinados em rações para poedeiras e demonstraram a importância das xantofilas vermelhas para a geração de uma tonalidade mais pigmentada à gema. Akiba et al. (2000) conduziram dois experimentos para avaliar o potencial pigmentante da gema de ovos com *Phaffia rhodozyma*, uma levedura contendo altos teores de oxicarotenóides em comparação com a páprica, uma fonte pigmentante de ocorrência natural, e os resultados mostraram que a levedura pode ser uma fonte útil para o propósito almejado. Paterson et al. (2000) testaram a utilização de farinha de folhas de *Calliandra calothyrsus* em ração para galinhas poedeiras e comprovaram sua utilidade como fonte de pigmentação dietária para a produção de ovos. Farran (2001) avaliou os parâmetros de qualidade de ovos de galinhas poedeiras alimentadas com sementes de *Vicia sativa* e os resultados indicaram que a semente não foi prejudicial para as aves. Prabakaran et al. (2001) adicionaram dois produtos comerciais que contêm xantofilas derivadas de flores de *Marigold* (*Tagetes erecta. L*) e Pimenta do Chile (*Capsicum annum. L*) na ração de poedeiras, em diferentes combinações, para tentar melhorar a intensidade da cor das gemas e avaliar seus efeitos na preferência do consumidor, e observaram que os consumidores preferiram os ovos de coloração mais intensa. Ponsano et al. (2002a) desenvolveram metodologia para o isolamento e caracterização da bactéria púrpura não sulfurosa *Rubrivivax gelatinosus* de efluente de abatedouro avícola, sugerindo o uso de sua biomassa na suplementação de rações para galinhas

poedeiras. Bosma et al. (2003), estudaram a otimização da produção de flores de *Marigold* africana (*Tagetes erecta L.*), pois os pigmentos carotenóides das flores desta planta podem ser extraídos e utilizados como aditivo alimentar natural para colorir gemas de ovos com a tonalidade alaranjada.

Como resultado de numerosos experimentos com variadas fontes de carotenóides, pode ser constatado que a cor da gema resulta de deposição, relativamente não específica, de oxicarotenóides, ou seja, é necessário que o carotenóide possua grupos funcionais contendo oxigênio. Os carotenos, hidrocarbonetos puros, não possuem grupos funcionais oxigenados e não são depositados na gema em quantidade significativa. Os oxicarotenóides são depositados nas gemas dos ovos em proporção direta à sua distribuição na ração, sendo que a taxa de deposição dos carotenóides da ração nos tecidos alvos é o principal fator que determina a eficiência pigmentante dos carotenóides (EL BOUSHY; RATERINK, 1992; HENCKEN, 1992; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; WILLIAMS, 1992).

## **6. Produção de carotenóides bacterianos em efluentes industriais**

Dentre as mais diversificadas fontes de pigmentos carotenóides destacam-se as biomassas provenientes do cultivo de bactérias púrpuras fotossintetizantes, pois estes microrganismos possuem a especial função de depuração de águas residuárias, e seu crescimento nestas águas origina uma biomassa nutritiva. Experimentos foram conduzidos por Kobayashi e Kurata (1978), Balloni et al. (1987) e Ponsano et al. (2002a; 2002b; 2003; 2004) com a obtenção de bons resultados na purificação de efluentes industriais, além da pigmentação de gemas de ovos e carcaças de frangos de corte, devido às muitas vantagens que estes microrganismos apresentam.

A ocorrência freqüente das espécies de bactérias púrpuras fotossintetizantes, como *Rubrivivax sp.*, em instalações de tratamento de águas residuárias (despejos) e lagoas aponta para a possibilidade de aplicação planejada deste microrganismo no tratamento de efluentes, com a vantagem da produção de biomassa rica em compostos como proteínas com altas quantidades de aminoácidos essenciais, carotenóides, cofatores biológicos e vitaminas, especialmente a vitamina B<sub>12</sub> (BALLONI et al., 1987; BALLOWS et al., 1992; KOBAYASHI; KURATA, 1978; PONSANO et al., 2002a).

Getha et al. (1998) utilizaram a bactéria púrpura fotossintetizante, *Rhodopseudomonas palustris*, para tratamento de águas residuárias ricas em carboidratos provenientes de fábrica de macarrão com a produção de biomassa rica em pigmentos carotenóides e com a redução de 77%

na demanda química de oxigênio do efluente. Ponsano et al. (2002a) desenvolveram metodologias para isolamento de *Rhodocyclus gelatinosus* (atualmente denominada *Rubrivivax gelatinosus*) de efluente de abatedouro avícola e para sua caracterização. A bactéria isolada e caracterizada foi cultivada em águas residuárias de abatedouro de aves, onde promoveu o desenvolvimento de coloração vermelho-castanha devido à presença de oxicarotenóides da série espiriloxantina alternativa que produz, dentre eles esferoidene, hidroxí-esferoidene e espiriloxantina. O cultivo microbiano, após ser submetido às operações de centrifugação e liofilização, originou a biomassa bacteriana contendo 7,1% de umidade, 62,8% de proteína bruta (com todos os aminoácidos essenciais para aves), 25,6% de carboidratos totais, 0,5% de lipídeos e 4,0% de sais minerais, em base seca, e seu uso foi sugerido como suplemento alimentar na ração de aves (PONSANO et al., 2002a; 2003; 2004). Azad et al. (2003) avaliaram os efeitos da utilização da bactéria fotossintetizante *Rhodovulum sulfidophilum* no tratamento de efluente industrial de processamento de sardinha, com a produção de biomassa útil para aquicultura e com a redução simultânea da Demanda Química de Oxigênio (DQO) da água residuária. Ponsano et al. (2004) avaliaram a atividade de *Rhodocyclus gelatinosus* como despoluente de efluente de abatedouro avícola. Além disso, estudaram a utilização de diferentes níveis da biomassa da bactéria na promoção da pigmentação de gemas de ovos e a influência da inclusão dietária do produto sobre parâmetros de desempenho de galinhas poedeiras. Efeitos positivos foram encontrados na despoluição das águas residuárias e na suplementação da ração com a biomassa. Zheng et al. (2005) estudaram a utilização de efluente industrial da fabricação de óleo para a produção de biomassa de leveduras como *Rhodotorula rubra*, *Candida tropicalis* e *C. utilis* e obtiveram bons resultados na purificação do efluente, além de um produto rico em proteínas, com destino à alimentação animal.

Conforme visto, os microrganismos fotossintetizantes executam uma importante função de purificação do resíduo líquido industrial, sua utilização é interessante porque a matéria-prima é livre de custo, requer menor custo com instalação de equipamento purificador de águas residuárias, a biomassa é rica em proteínas e tem ótima composição em aminoácidos e vitaminas, não é patogênica ou tóxica (KOBAYASHI; KURATA, 1978).

De acordo com Chávez et al. (2005) o processamento de um frango para consumo humano requer 10 a 12 litros de água, dos quais 60% são convertidos em efluente de abatedouro avícola. Considerando que, segundo Pinheiro e Pinheiro (2006), no ano de 2005 a avicultura brasileira produziu 9,3 milhões de toneladas de carne de frango, podemos concluir que são produzidos, em média, 62 milhões de litros de efluente de abatedouro avícola por dia no Brasil.

Este imenso volume de efluente oriundo de abatedouros avícolas brasileiros demonstra o potencial de substrato para o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus*, com duas vantagens primordiais. A primeira delas tem valor sublime para o meio ambiente e constitui-se na despoluição dos efluentes de abatedouros avícolas pelo desenvolvimento de *Rvi. gelatinosus*, promovendo a degradação da matéria orgânica presente nas águas residuárias. A consequência direta deste desenvolvimento gera a segunda vantagem, que é a produção de uma biomassa rica em nutrientes protéicos, vitamínicos e pigmentos oxicarotenóides, a qual pode ser utilizada como ingrediente pigmentante em ração para galinhas poedeiras, com o objetivo de melhorar a atratividade das gemas de ovos e de produtos que contenham ovos em sua formulação.

Neste trabalho de pesquisa, foram empregados níveis mais altos de biomassa de *R. gelatinosus* que em trabalhos anteriores, como os executados por Ponsano et al. (2002b; 2004), com o objetivo de avaliar os efeitos da utilização destes níveis superiores na fisiologia das aves quanto a possível toxicidade do emprego da biomassa, no desempenho das galinhas, na intensidade da coloração das gemas e na aceitação das mesmas pelos consumidores.

O capítulo 2 é referente ao artigo científico intitulado **Utilization of *Rubrivivax gelatinosus* Biomass to Supplement Laying Hen Rations**, que teve como objetivos avaliar os efeitos da adição de biomassa de *Rvi. gelatinosus* em ração de galinhas poedeiras sobre a cor das gemas e a preferência do consumidor.

O artigo foi escrito de acordo com as normas da revista **Journal of Applied Poultry Research**.

## Referências

AKIBA, Y.; SATO, K.; TAKAHASHI, K. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, n. 2, p.154-161, 2001.

AKIBA, Y.; SATO, K.; TAKAHASHI, K.; TOYOMIZU, M.; TAKAHASHI, Y.; TSUNEKAWA, H.; HAYASAKA, Y.; NAGAO, H. Availability of cell wall fractured yeast, *Phaffia rhodozyma*, containing high concentration of astaxanthin for egg yolk pigmentation. **Animal Science Journal**, v. 71, n. 3, p. 255-260, 2000.

AMAYA, D.B.R. Os carotenóides como precursores de vitamina A. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 4, p. 227-242, 1985.

AWANG, I.P.R.; CHULAN, U.; AHMAD, F.B.H. Curcumin for upgrading skin color of broilers. **Pertanika**, v. 15, n. 1, p. 37-38, 1992.

AZAD, S.A.; VIKINESWARY, S.; CHONG, V.C.; RAMACHANDRAN, K.B. Rhodovulum sulfidophilum in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. **Applied Microbiology**, v. 38, p. 13-18, 2003.

BAIAO, N.C.; MENDEZ, J.; MATEOS, J.; GARCIA, M.; MATEOS, G.G. Pigmenting efficacy of several oxycarotenoids on egg yolk. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 8, p. 472-479, 1999.

BALLONI, W.; CARLOZZI, P.; VENTURA, S.; DE PHILIPPIS, R.; BOSCO, M. A three years experimento on the production of *Rhodopseudomonas* and *Rhodospirillum* biomass by outdoor culture on different wastes. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON BIOMASS FOR ENERGY AND INDUSTRY, 4, 1987, Órleans. **Proceedings...** London: Elsevier Applied Science, 1987. p. 598-602.

BALLOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed). **The Prokaryotes**. 2ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 2, cap.129, p. 2556-2561.

BAUERNFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 456-473, 1972.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P.S. Microbial xanthophylls. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 445-455, 2005.

BOSMA, T.L.; DOLE, J.M.; MANESS, N.O. Optimizing marigold (*Tagetes erecta* L.) petal and pigment yield. **Crop Science**, v. 43, n. 6, p. 2118-2124, 2003.

CHANDRA, S.; NETKE, S.P.; GUPTA, B.S. Studies on comparative utilization of xanthophylls from various natural sources for egg yolk pigmentation. **Indian Journal Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 456-460, 1978.

CHÁVEZ, C.P.; CASTILHO, R.L.; DENDOOVEN, L.; ESCAMILLA – SILVA, E.M. Poultry slaughter wastewater treatment with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Bioresource technology**, v. 96, n. 15, p.1730-1736, 2005.

EL BOUSHY, A.R.; RATERINK, R. Egg yolk pigmentation. **World Review of Animal Production**, v. 27, n. 1, p. 49-62, 1992.

FARRAN, M.T.; DAKESSIAN, P.B.; DARWISH, A.S.; UWAYIAN, M.G.; DBOUK, H.K.; SLEIMAN, F.T.; ASHKARIAN, Y.M. Performance of broilers and production and egg quality parameters of laying hens fed 60% raw or treated common vetch (*Vicia sativa* seeds). **Poultry Science**, v. 80, n. 2, p. 203-208, 2001.

FONTANA, J.D. **Carotenóides: cores atraentes e ação biológica**. [S.L.]: Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento, 2003. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/bio/13\\_e.htm](http://www.biotecnologia.com.br/bio/13_e.htm)>. Acesso em 30 jan. 2006.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; CHONG, V.C. Isolation and growth of the phototropic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch-processing wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 505-511, 1998.

GOUVEIA, L.; VELOSO, V.; REIS, A.; FERNANDES, H.; NOVAIS, J.; EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk. **Journal Science Food Agricultural**, v. 70, n. 2, p. 167-172, 1996.

GOODWIN, T.W. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. **Annual Review Nutrition** v. 6, p. 273-279, 1986.

HENCKEN, H. Chemical and Physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. **Poultry Science**, v. 71, n. 4, p. 711-717, 1992.

HUDON, J. Biotechnological applications of research on animal pigmentation. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 1, p. 49-69, 1994.

KLAUI, H.; BAUERNFEIND, J.C.; Carotenoids as food colors. In: BAUERNFEIND, J.C., (Ed). **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors**. New York (NY): Academic Press; p. 47-319, 1981.

KOBAYASHI, M.; KURATA, S. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. **Process Biochemistry**, v. 13, n. 9, p. 27-30, 1978.

LATSCHA, T. **Carotenoids: their nature and significance in animal feeds**. Switzerland: Roche Animal Nutrition and Health, 1990. 110p.

LIAAEN-JENSEN, S. Chemistry of Carotenoid pigments. In: CLAYTON, R.K.; SISTROM, W.R. (Ed). **The photosynthetic bacteria**. New York: Plenum Press, 1978. cap. 12, p. 233-245.

LIUFA, W.; XUFANG, L.; CHENG, Z. Carotenoids from Alocasia leaf meal as xanthophylls sources for broiler pigmentation. **Tropical Science**, v. 37, n. 2, p. 116-122, 1997.

MARUSICH, W.L.; BAUERNFEIND, J.C. Oxycarotenoids in poultry feeds. In: BAUERNFEIND, J.C., (Ed). **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors**. New York: Academic Press, 1981.p. 319-462.

NYS, Y. Dietary carotenoids and egg yolk coloration: a review. **Archives fur Geflügelkunde**, v. 64, n. 2, p. 45-54, 2000.

PATERSON, R.T.; ROOHTHAERT, R.L.; KIRUIRO, E. The feeding of leaf meal of *Calliandra calothyrsus* to laying hens. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, n. 1, p. 51-56, 2000.

PEREZ-VENDRELL, A.M.; HERNANDEZ, J.M.; LLAURADO, L.; SCHIERLE, J.; BRUFAU, J. Influence of source and ratio of xanthophylls pigments on broiler chicken pigmentation and performance. **Poultry Science**, v. 80, n. 3, p. 320-326, 2001.

PINCHASOV, Y.; DAVID, G.; ZOHARI, S. Dietary supplementation with xanthophyll as an effective way of identifying low producing broiler breeder hens. **Poultry Science**, v. 71, n. 9, p. 1436-1441, 1992.

PINHEIRO, L.A.S.; PINHEIRO, L.E.L. Avicultura brasileira: desafios e conquistas. **Revista CFMV** v. 12, n. 38, p. 7-8, 2006.

PONSANO, E.H.G.; LACAVA, P.M.; PINTO, M.F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 143-147, 2003.

PONSANO, E.H.G.; LACAVA, P.M.; PINTO, M.F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 445-449, 2002a.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P.M. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 1, p. 77-82, 2002b.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P.M. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 3, p. 421-425, 2004.

PRABAKARAN, R.; MUTHUSAMY, P.; JAYAPRASAD, I.A. Inclusion of natural pigment products in layer mash to improve egg yolk colour. **Indian Veterinary Journal**, v. 78, n. 5, p. 416-419, 2001.

SUNDE, M.L. Symposium: The scientific way to pigment poultry products. Introduction to the Symposium. 78th Annual Meeting of the Poultry Science Association. Madison, Wisconsin. **Poultry Science**, v. 71, n. 4, p. 709-710, 1992.

TOYOMIZU, M.; SATO, K.; TARODA, H.; KATO, T.; AKIBA, Y. Effects of dietary spirulina on meat colour in muscle of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 42, n. 2, p. 197-202, 2001.

WILLIAMS, W.D. Origin and impact of color on consumer preference for food. **Poultry Science**, v. 71, n. 4, p. 744-746, 1992.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 10, p. 1183-1187, 2005.

## *Capítulo 2*

## Artigo Científico

### UTILIZATION OF *RUBRIVIVAX GELATINOSUS* BIOMASS TO SUPPLEMENT LAYING HENS RATIONS

L. B. POLONIO, E. H. G. PONSANO<sup>1</sup>, M. GARCIA NETO and M. F. PINTO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade  
Estadual Paulista - Unesp.

P. O. box 341, Araçatuba – SP, Brazil. 16050 – 680.

Phone: (18) 3636-1381

Fax: (18) 3636-1352

**Primary Audience:** Egg Producers, Nutritionists, Researchers, Feed Manufacturers

#### SUMMARY

The effects of the dietary inclusion of *Rvi. gelatinosus* biomass in layers rations on yolk color, consumer preference, productive parameters and hens` metabolism were investigated. One hundred twenty six Dekalbe hens aging 19 weeks were used in the experiment. Sorghum and corn were used for the formulation of basal rations that received increasing levels of biomass. The bacterial biomass increased red hues and decreased lightness of yolks when added to both basal rations. Biomass at 1,500ppm in the corn-based ration was enough to reach

---

<sup>1</sup>Corresponding author: elisahgp@fmva.unesp.br

consumers` preference, while with the sorghum-based ration, 7,500ppm were necessary to reach the same. Hens fed corn-based rations had superior feed consumption and better feed conversion than those fed sorghum-based rations but the increasing levels of the biomass on both basal rations did not influence these parameters. No mortality and no change on layers` weight occurred during the experimental period. Hens fed corn-based rations had superior egg production, egg weight and egg mass rates than those fed sorghum-based rations, although these parameters were not influenced by the increasing levels of the biomass on both kinds of rations. Normal levels for seric enzymes and the absence of degenerative and inflammatory lesions in livers and kidneys of hens allow the indication of the biomass for ration supplementation.

**Key words: yolk color, consumer preference, performance, egg production**

**Running Title: BIOMASS IN LAYERS RATIONS**

### **DESCRIPTION OF PROBLEM**

For most consumers around the world, few attributes of food can influence at a deeper degree the decision for the purchase of foodstuffs rather than color. Natural and bright colors remind high quality, healthful and nutritious food, what is especially true for egg yolks [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. In some regions like Germany, south of France, The Netherlands, Spain, Italy, Peru, Colombia, Israel, Swiss, Grain-Britain, Ceiland, Australia, New Zealand, North Ireland, South Africa, northeast of United States of America, Mexico and Belgium, people prefer orange yolks [2, 4, 6, 10, 11]. In the north region of France, in the south of England and in

Finland, consumers prefer an intermediate color for yolks, while in Ireland, in the north of England and in Sweden, most consumers prefer pale yolks [2, 6]. In Brazil, there are differences in the preference for the color of the egg yolk that vary in accordance with the region [8, 9], i.e. either in country or metropolitan sites but, in a general sense, most consumers prefer well-pigmented egg yolks. The color of the egg yolk depends on the amount and kind of xanthophylls present in the animal feed [12, 13] since birds, as the other animals, are unable to synthesize their own carotenoids, conversely of plants, fungi, algae and photosynthetic bacteria [1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17]. The yellow-orange color of the egg yolk, thus, is not synthesized by the laying hen, but derives from the dietary transference and deposition of pigments from the feed that occur in yolk and other tissues [1, 3, 4, 10, 14, 15, 16, 17, 18]. In order to attain the optimal coloration for yolks, hens' feed must contain yellow and red xanthophylls, commonly supplied by the feed ingredients, such as corn and alfalfa [12]. Moreover, also to reach the market requests and increase attractiveness of egg products, poultry breeders generally add synthetic pigments to hens' diets [14, 15, 16, 17]. Recent researches have been accomplished in an attempt to experience xanthophylls from plants, algae, bacteria and yeasts as alternative sources of natural carotenoids for birds' feeds [4, 5, 8, 9, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

Photosynthetic bacteria like *Rubrivivax gelatinosus* widely inhabit aquatic environments, moist soil and industrial effluents, in which they play an important role in the degradation of pollutant compounds [26]. Biomass derived from the cultivation of *Rvi. gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater contains xanthophylls from alternative spirilloxanthin series that impairs its purple-red color and suggest its use as a pigment for poultry products [9, 26]. *Rvi. gelatinosus* biomass has been previously tested in broilers and layers rations aiming at color enhance of carcass and yolks [8, 9]. Nevertheless, its effects on hens' physiology have not been investigated yet and, according to Litchfield [27] the toxicity of ingredients might be investigated before they can be safely used for feed supplementation.

Moreover, investigations on the inclusion levels of the product to reach consumers` preference on the color of products and about hens` productive parameters also needed to be performed before the recommendation of the biomass for feeding supplementation.

So, the purpose of this research was to evaluate the influence of the dietary inclusion of *Rvi. gelatinosus* biomass on yolk color, consumer preference, performance, hepatic and renal metabolism of laying hens.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Ration Formulation and Layers Management***

Corn and sorghum isocaloric and isoproteic diets (Table 1) were formulated according to NRC recommendations [28]. One hundred twenty-six Dekalbe layers at 19 wks age were individually housed in wire cages (25 cm wide × 40 cm deep × 45 cm high) equipped with feeders and drinkers. During an adaptation period of four wks, layers were fed sorghum ration with no biomass addition at 100g/hen per day and water *ad libitum*. The time of light exposition gradually increased during the adaptation period until it reached 16h per day, and so remained for the whole experiment time. The inclusion levels of *Rvi. gelatinosus* biomass prepared in poultry slaughterhouse wastewater [30] were 0 (control), 1,500, 3,000, 4,500, 6,000 and 7,500ppm, into both corn and sorghum basal rations, making a total of 12 treatments [31]. Diets were mixed weekly and stored in closed cans at room temperature. Hens received ration and water *ad libitum* for 24 days.

### ***Analytical Procedures***

For productive parameters determination [32], layers and feeds were weighted at the beginning and at the end of experimental period; number and weight of eggs were determined daily. Egg yolk colors were measured daily for L\* (lightness), a\* (redness) and b\* (yellowness) [33]. For the consumer preference tests, 50 untrained panelists visually evaluated the egg yolks according to a hedonic scale of five points [34, 35]. At the end of the experiment, one hen of each replication was randomly selected for blood collection and killing [36]. Serum was analyzed for total protein, albumin, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), uric acid, creatinine, gamma-glutamyltransferase (GTT) and creatine kinase (CK) in automated analyzer [37]. Liver and kidney fragments were withdrawn for the histological preparation [38] and investigation on degenerative and inflammatory lesions. Data were analyzed by the general linear model procedure of SAS software [39, 40].

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***Yolk Colors***

Yolks from treatments that contained *Rvi. gelatinosus* biomass were significantly darker ( $P<0.05$ ) than those from respective control sorghum and corn-based feeds, due to the effective deposition of the product (Table 2). The pigmenting ability of the biomass was demonstrated by the significant increases ( $P<0.05$ ) on redness of yolks from treatments that received the product, both on sorghum and corn-based feeds, compared to their respective

control groups (Table 2). Yolks from all corn-based treatments had significantly higher  $b^*$  values than yolks from sorghum-based treatments because the latter is free of oxycarotenoids, while the former contains around 17ppm of xanthophylls, mainly lutein and zeaxantin, that play a role on the yellowness of yolks, despite of their instability at environmental conditions [24]. For sorghum-based treatments (Table 2), all inclusion levels of the product led to significant increases in redness of yolks ( $P < 0.05$ ), as compared to  $a^*$  values of that control group yolks, although treatments with 3,000 and 4,500ppm of biomass were equivalent in redness, like treatments with 6,000 and 7,500ppm ( $P > 0.05$ ). Also for those feeds, only 6,000 and 7,500ppm of biomass provided significantly higher yellowness ( $P < 0.05$ ) for yolks than control feed did, what indicates the main ability of the product in providing red color, its original color, due to the red color of its component carotenoids [9]. Redness of yolks from all corn-based treatments that received the biomass (Table 2) was significantly higher than redness of that control group ( $P < 0.05$ ). With that feed, yolks from treatments with 1,500 and 3,000ppm of biomass had equivalent red colors, as it happened to yolks from treatments with 4,500, 6,000 and 7,500ppm of the product ( $P > 0.05$ ). For corn-based treatments, none of the inclusion levels was able to provide higher yellowness than for the control group, showing that the  $b^*$  values were provided by the corn own xanthophylls and confirming the ability of the product on enhancing the red color of yolks. Conversely, Baiao et al. [12] tested the pigmenting properties of different sources and concentrations of yellow and red xanthophylls (natural and synthetic) when added to diets of layer hens and found that yellowness of yolks was modified by the red xanthophylls used. Oxycarotenoids from *Rvi. gelatinosus* biomass in addition to corn xanthophylls were responsible for the raising of a new orange color in yolks from corn-based feeds. The use of reflectance colorimetry was justified in this research, since traditional visual method by Roche Color Fan - RCF [41] cannot reach the hues raised by the biomass inclusion on sorghum-based rations due to the main increase on redness. Chandra et al. [20] fed layers with a sorghum diet supplemented

with paprika meal and also could not score the color of yolks with the RCF because of the reddish tinges obtained.

### *Consumers` Preference*

Results from the first preference test (Table 3) shows that yolks from hens fed 4,500ppm of the biomass in corn-based ration had the highest preference rank ( $P<0.05$ ), followed by equivalent ranks presented by 3,000 and 1,500ppm in the same ration. None of the sorghum-based rations was able to reach the highest rank of preference attained with corn-based treatments ( $P>0.05$ ). In the second preference test (Table 3), yolks from hens fed 6,000 and 7,500ppm of biomass in corn-based ration and 7,500ppm of biomass in sorghum-based ration were preferred by consumers showing that a blend of yellowness and redness in yolk is desirable to reach consumers` preference. This is in agreement to Baiao et al. [12], who states that red xanthophylls can be used to extend the dominant wavelength of yolk pigmentation from a pure yellow to a more desirable golden color. These results confirm the regional preference for well-pigmented egg yolks and the influence of red xanthophylls on yolk color. Thus, the inclusion of 1,500ppm of *Rvi. gelatinosus* biomass into corn-based rations is enough to reach the maximum preference of the consumer while, when the ration is formulated with sorghum, 7,500ppm of the product will be necessary to reach the same purpose. The high preference scores reached by yolks from hens fed corn-based diets supplemented with the bacterial biomass demonstrate the importance of both xanthophylls sources (yellow and red) to satisfy the regional consumer, since yolk colors depend not only on the levels of pigmenting substances, but also on the type and ratio of these compounds [13].

### ***Productive Parameters***

Table 4 shows that feed consumption was superior for hens fed corn-based rations than for those fed the sorghum-based ones ( $P < 0.05$ ). According to Trevino et al. [42], this finding may be due to the adstringent taste of some sorghum varieties that might have a negative effect on birds' ingestion. Increasing inclusion levels of *Rvi. gelatinosus* biomass did not influence feed consumption at none of the rations used, what allows to demonstrate that the product did not cause any change in palatability. Also, as no significant difference on feed consumption ( $P > 0.05$ ) was detected among the inclusion levels of the product, it is feasible to conclude that the yolks pigmentation are really due to the presence of the biomass in the rations. The best feed conversion rates were detected with treatments that used corn (Table 4), with no significant rates among the increasing inclusion levels of the product ( $P > 0.05$ ). Also, the sorghum-based treatments, that had the worst feed conversion, were not influenced ( $P > 0.05$ ) by the included levels of the biomass. During the experimental period, body condition of hens was not affected, as they kept average weight of 3.70kg, which was influenced neither by the energetic source utilized nor by the increasing inclusion levels of the biomass.

Hens fed corn-based rations showed superior egg production, egg weight and egg mass output ( $P < 0.05$ ) than those fed sorghum-based rations (Table 5), what might reflect the relationship between feed intake and feed conversion and these parameters. Nevertheless, these parameters were not influenced by the increasing addition levels of the biomass ( $P > 0.05$ ) on both kinds of rations. Conversely to results found in this study, Ponsano et al. [9] observed reduced layers' weight and increased egg weight when inferior levels of *Rvi. gelatinosus* biomass (500, 1,000 and 2,000ppm) were added to sorghum-based rations. Productive parameters were considered normal for the experimental conditions used in this study and no deleterious effects due to the application of *Rvi. gelatinosus* biomass were detected, results that were reforced by

the absence of mortality during the whole experimental period. These data are in agreement with data from other authors [12, 13, 43] who found no influence of synthetic and/or natural pigmentants on laying hens` productive parameters.

### ***Biochemical and Histological Analysis***

The absence of deleterious effects on hens` performance was also reforced by the normal values found for seric enzymes, as compared to values reported by Saukas [44] who studied hematological and biochemical characteristics of birds under normal and pathological conditions. Moreover, no degenerative or inflammatory lesions in liver and kidney as a consequence of the biomass inclusion were observed in the histological investigations. These results allow the indication of *Rvi. gelatinosus* biomass for layer hens` feed supplementation.

The effective deposition of *Rvi. gelatinosus* oxycarotenoids in the yolk may represent an additional benefit to consumer, besides that of the pigmentation improvement, since epidemiological evidences suggest that dietary xanthophylls may inhibit the onset of many diseases such as arteriosclerosis, cataracts, age-related macular degeneration, multiple sclerosis and cancers due to the antioxidant properties of these compounds [45]. Also, besides oxycarotenoids, additional proteins, lipids, minerals and vitamins are present in the yolk as part of the bacterial biomass deposition.

## **CONCLUSIONS AND APPLICATIONS**

1. *Rvi. gelatinosus* biomass caused an increase in yolks red hues, contributing to improve color of yolks mainly when hens` feed was formulated with corn.

2. When ration was formulated with corn, 1,500ppm of *Rvi. gelatinosus* biomass were enough to reach the consumers` preference for yolk color; when sorghum was the basis of the ration, 7,500ppm of the biomass were necessary to reach the preference.
3. Inclusion of increasing levels of *Rvi. gelatinosus* biomass into laying hens` diets did not affect performance.

### REFERENCES AND NOTES

1. Klaui, H., and J.C. Bauernfeind. 1981. Carotenoids as food colors. Pages 47-319 in Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. J.C. Bauernfeind, ed. Academic Press. New York.
2. Sunde, M.L. 1992. The scientific way to pigment poultry products. Introduction to the Symposium. 78th Annual Meeting of the Poultry Science Association. Poult. Sci. 71:709-710.
3. Williams, W.D. 1992. Origin and impact of color on consumer preference for food. Poult. Sci. 71:744-746.
4. Gouveia, L., V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais, and J. Empis. 1996. *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk. J. Sci. Food Agric. 70:167-172.
5. Liufa, W., L. Xufang, and Z. Cheng. 1997. Carotenoids from *Alocasia* leaf meal as xanthophylls sources for broiler pigmentation. J. Trop. Agric. Food Sci. 37:116-122.

6. Nys, Y. 2000. Dietary carotenoids and egg yolk coloration – a Review. Arch. Geflügel. 64:45-54.
7. Fontana, J.D. 2003. Carotenóides - Cores atraentes e Ação biológica. [S.L.]: Biotecnolog. Cienc. Desenvolv. <[http://www.biotecnologia.com.br/bio/13\\_e.htm](http://www.biotecnologia.com.br/bio/13_e.htm)>. Access in jan 30, 2006.
8. Ponsano, E.H.G., M.F. Pinto, M. Garcia Neto, and P.M. Lacava. 2002. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. J. Appl. Poult. Res.11:77-82.
9. Ponsano, E.H.G., M.F. Pinto, M. Garcia Neto, and P.M. Lacava. 2004. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. J. Appl. Poult. Res.13:421-425.
10. Marusich, W.L., and J.C. Bauernfeind. 1981. Oxycarotenoids in poultry pigmentation. Pages 319-462 in Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors J.C. Bauernfeind. ed. Academic Press. New York.
11. El Boushy, A.R., and R. Raterink. 1992. Egg yolk pigmentation. World Rev. Anim. Prod. 27:49-62.
12. Baiao, N.C., J. Mendez, J. Mateos, M. Garcia, and G.G. Mateos. 1999. Pigmenting efficacy of several oxycarotenoids on egg yolk. J. Appl. Poult. Res. 8:472-479.
13. Galobart, J., R. Sala, X. Rincón-Carruyo, E.G. Manzanilla, B. Vilà, and J. Gasa. 2004. Egg yolk color as affected by saponification of different natural pigmenting sources. J. Appl. Poult. Res. 13:328-334.

14. Bauernfeind, J.C. 1972. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. J. Agric. Food Chem. 20:456-473.
15. Awang, I.P.R., U. Chulan, and F.B.H. Ahmad. 1992. Curcumin for upgrading skin color of broilers. *Pertanika* 15:37-38.
16. Hencken, H. 1992. Chemical and Physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poult. Sci.* 71:711-717.
17. Bosma, T.L., J.M. Dole, and N.O. Maness. 2003. Optimizing marigold (*Tagetes erecta* L.) petal and pigment yield. *Crop Sci.* 43:2118-2124.
18. Prabakaran, R., P. Muthusamy, and I.A. Jayaprasad. 2001. Inclusion of natural pigment products in layer mash to improve egg yolk colour. *Indian Vet. J.* 78:416-419.
19. Marusich, W.L., E.F. Ogrinz, P.R. Brown, and M. Mitrovic. 1973. Effect of Roxarsone and canthaxanthin on broiler pigmentation. *Poult. Sci.* 14:23-30.
20. Chandra, S., S.P. Netke, and B.S. Gupta. 1978. Studies on comparative utilization of xanthophylls from various natural sources for egg-yolk pigmentation. *Indian J. Anim. Sci.* 48: 456-460.
21. Pinchasov, Y., G. David, and S. Zohari. 1992. Dietary supplementation with xanthophyll as an effective way of identifying low producing broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 71:1436-1441.

22. Akiba, Y., K. Sato, K. Takahashi, M. Toyomizu, Y. Takahashi, H. Tsunekawa, Y. Hayasaka, and H. Nagao. 2000. Availability of cell wall fractured yeast, *Phaffia rhodozyma*, containing high concentration of astaxanthin for egg yolk pigmentation. *Anim. Sci. J.* 71:255-260.
23. Akiba, Y., K. Sato, and K. Takahashi. 2001. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *J. Appl. Poult. Res.* 10:154-161.
24. Perez-Vendrell, A.M., J.M. Hernandez, L. Llaurodo, J. Schierle, and J. Brufau. 2001. Influence of source and ratio of xanthophylls pigments on broiler chicken pigmentation and performance. *Poult. Sci.* 80:320-326.
25. Toyomizu, M., K. Sato, H. Taroda, T. Kato, and Y. Akiba. 2001. Effects of dietary spirulina on meat colour in muscle of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 42:197-202.
26. Ponsano, E.H.G., P.M. Lacava, and M.F. Pinto. 2002. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45:445-449.
27. Litchfield, J. H. 1980. Microbial protein production. *Bioscience* 30:387-396.
28. National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9<sup>th</sup> rev. ed. National Academy Press. Washington (DC).

29. Ponsano, E. H. G. 2000. Avaliação da Capacidade Pigmentante de Biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* em Frangos de Corte. Ph.D. Thesis. IQ, UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

30. *R. gelatinosus* biomass contained 62.8% protein, 25.6% carbohydrate, 0.5% lipids, and 4.0% ash, and all essential amino acids for birds.

31. Laying hens were distributed in a completely randomized experimental design with a 2 (energetic source) x 6 (biomass level) factorial arrangement and 3 replications of 3 individually housed birds per experimental unit.

32. Productive parameters included feed consumption (g/hen/d), feed conversion (kg feed/kg egg), body weight variation (g) egg production (%/hen/d), egg weight (g) and egg mass (g/hen/d).

33. Measurements on yolk color attributes were obtained from the average of three consecutive pulses from the optical chamber of the MiniScan XE Plus (Hunter Lab) calibrated with black and white standards.

34. Preference tests were performed at the 16<sup>th</sup> day of the experiment (when the color measurement indicated stabilization of the color parameters) in two stages, in order to allow a better evaluation of colors by the panelists.

35. IFT. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. *Food Technology*, v. 35, n. 11, p. 50-59, 1981.

36. Hens were killed by cervical dislocation, bled for 3min by severing the jugular veins, scalded in hot water for 2min, defeathered in an automated picker and handly eviscerated.

37. Automated analyzer BTS-370 Plus ByoSistems was calibrated with normal and pathologic controls.

38. Liver and kidney fragments were fixed in 10% formaldeid for 24-48h, dehydrated in alcohol, cleared in xylol and embedded in paraplastic with the purpose of proceeding the microtomy. Cuts were made at approximately 5 $\mu$ m of thickness, routinely stained with hematoxylin-eosin and examined to the light microscope.

39. Data on yolk colors and productive parameters were analyzed by ANOVA and the differences among treatments were tested by Duncan's Multiple Range Test. Data on consumers' preference were analyzed by Friedman's Analysis of Variance and differences were tested by Dunn's Multiple Comparison Test. Significance level adopted was 5%.

40. SAS Institute. 1998. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements Through Release 6.12. Statistical Analysis System Institute. Cary, NC.

41. Vuilleumier, J.P. 1969. The 'Roche Yolk Colour Fan' - an instrument for measuring yolk colour. *Poult. Sci.* 48: 767-79.

42. Trevino, J., D. Zefferies, and B. Houston. 1992. Effects of tannin from faba beans (*Vicia faba*) on the digeston of starch by growing chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37:345-349.

43. Garcia, E.A., A.A. Mendes, C.C. Pizzolante, H.C. Gonçalves, R.P. Oliveira, and M.A. Silva. 2002. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 4:1-7.
44. SAUKAS, T.N. 1993. Variáveis Hematológicas e Bioquímicas em Aves (*Gallus gallus*, *Linnaeus*, 1758) Inoculadas com Amostras Vacinal E de Campo do Vírus da Doença Infecciosa Bursal. Ph.D. Thesis. FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.
45. Bhosale, P., and P.S. Bernstein. 2005. Microbial xanthophylls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 445-455.

### ***Acknowledgements***

Authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp – for financial support, Frango Sertanejo Industry for the effluent supply, Dr Silvia H. V. Perri for the statistical analysis, Dr Marcelo V. Meireles for the histological analysis, Dr Paulo César Ciarlini for the biochemical analysis, Marta P. Peres and Magna A. S. Galvão for the aid in histological preparations.

Table 1. Composition of basal rations

Ingredient	Sorghum ration (%)	Corn ration (%)
Ground corn	-	63.60
Ground sorghum	67.73	-
Soybean meal (48% CP)	19.02	21.45
Limestone	8.50	8.54
Soybean oil	3.20	2.80
Dicalcium phosphate	0.78	0,70
Salt (NaCl)	0.37	0,35
Vitamin mineral premix <sup>1</sup>	0.40	0.40
Inert filler (sand)	-	2.16
Calculated composition		
ME, kcal/kg	2,900	2,900
CP, %	16.00	16.00
EE, %	5.42	5.42
Calcium, %	3.46	3.46
Available phosphorus, %	0.26	0.26

Sodium, %	0.16	0.16
Arginine, %	0.96	1.03
Lysine, %	0.75	0.84
Methionine + cysteine, %	0.58	0.58
Threonine, %	0.58	0.59
Tryptophan, %	0.18	0.18

---

<sup>1</sup>Provided per kg of diet: vitamin A, 8,800 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 3,300 IU; vitamin E, 40 IU; vitamin K<sub>3</sub>, 3.3 mg; thiamine, 4.0 mg; riboflavin, 8.0 mg; pantothenic acid, 15 mg; niacin, 50 mg; pyridoxine, 3.3 mg; choline, 600 mg; folic acid, 1 mg; biotin, 220 µg; vitamin B<sub>12</sub>, 12 µg; antioxidant, 120 mg; manganese, 70 mg; zinc, 70 mg; iron, 60 mg; copper, 10 mg; iodine, 1.0 mg; selenium, 0.3 mg.

Table 2. Mean color attributes of yolks – lightness (L\*), redness (a\*), yellowness (b\*)

Overall treatments				
BL <sup>1</sup> (ppm)	ES <sup>2</sup>	L*	a*	b*
0	sorghum	71.05 <sup>a</sup>	-0.75 <sup>g</sup>	26.04 <sup>e</sup>
0	corn	65.90 <sup>cd</sup>	10.64 <sup>e</sup>	53.98 <sup>ab</sup>
1,500	sorghum	67.47 <sup>bc</sup>	5.53 <sup>f</sup>	27.23 <sup>e</sup>
1,500	corn	63.25 <sup>ef</sup>	14.12 <sup>d</sup>	55.51 <sup>a</sup>
3,000	sorghum	68.69 <sup>b</sup>	9.00 <sup>e</sup>	29.84 <sup>cde</sup>
3,000	corn	62.85 <sup>f</sup>	15.56 <sup>cd</sup>	51.06 <sup>ab</sup>
4,500	sorghum	66.87 <sup>bcd</sup>	8.94 <sup>e</sup>	29.18 <sup>de</sup>
4,500	corn	62.19 <sup>f</sup>	18.82 <sup>ab</sup>	50.97 <sup>ab</sup>
6,000	sorghum	65.06 <sup>de</sup>	14.07 <sup>d</sup>	33.22 <sup>cd</sup>
6,000	corn	62.52 <sup>f</sup>	17.36 <sup>abc</sup>	51.06 <sup>ab</sup>
7,500	sorghum	62.60 <sup>f</sup>	16.52 <sup>bcd</sup>	34.01 <sup>c</sup>
7,500	corn	61.75 <sup>f</sup>	19.44 <sup>a</sup>	50.63 <sup>b</sup>
P value				
	BL x ES	< 0.0001	<0.0001	<0.0001
	CV <sup>3</sup> (%)	1.74	10.41	5.32

<sup>1</sup> Biomass level; <sup>2</sup> Energetic source; <sup>3</sup> Coefficient of variation

<sup>a,b,c,d,e,f</sup> Means in a column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

TABLE 3. Consumer preference for yolk colors

Test	Overall treatments		Median (sum of the ranks)
	BL <sup>1</sup> (ppm)	ES <sup>2</sup>	
1	0	sorghum	1 (61.50) <sup>e</sup>
	0	corn	3 (194.50) <sup>c</sup>
	1,500	sorghum	2 (115.00) <sup>d</sup>
	1,500	corn	4 (282.50) <sup>ab</sup>
	3,000	sorghum	3 (240.00) <sup>bc</sup>
	3,000	corn	4 (320.00) <sup>a</sup>
	4,500	sorghum	3 (234.50) <sup>bc</sup>
	4,500	corn	5 (352.00) <sup>a</sup>
P value			
BL x ES		<0.0001	
2	0	sorghum	1 (67.00) <sup>c</sup>
	0	corn	3 (139.50) <sup>b</sup>
	6,000	sorghum	2 (137.50) <sup>b</sup>
	6,000	corn	4 (254.00) <sup>a</sup>
	7,500	sorghum	4 (211.50) <sup>a</sup>
	7,500	corn	4 (240.50) <sup>a</sup>
P value			
BL x ES		<0.0001	

<sup>1</sup> Biomass level; <sup>2</sup> Energetic source

<sup>a,b,c,d,e</sup> Medians in a column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

TABLE 4. Performance of hens fed different levels of *Rvi. gelatinosus* biomass

Biomass level	Feed conversion	Feed consumption
(ppm)	(kg ration/kg egg)	(g/hen/d)
0	3.00	81.05
1,500	2.98	79.78
3,000	2.64	81.60
4,500	2.78	75.00
6,000	2.84	80.38
7,500	3.03	86.11
Energetic Source (ES)		
Corn	2.472 <sup>b</sup>	86.905 <sup>a</sup>
Sorghum	3.324 <sup>a</sup>	74.514 <sup>b</sup>
P value		
Biomass level (BL)	0.8098	0.1325
Energetic Source (ES)	0.0001	0.0001
BL x ES	0.8674	0.822
CV <sup>1</sup> (%)	20.39	7.96

<sup>1</sup> Coefficient of variation

<sup>a,b</sup> Means in a column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

TABLE 5. Productive parameters of the experiment

Biomass level (BL)	Egg production	Egg weight	Egg mass
(ppm)	(%/hen/d)	(g)	(g/hen/d)
0	50.06	53.38	26.85
1,500	51.06	53.77	27.76
3,000	57.38	52.62	30.34
4,500	51.16	51.95	26.82
6,000	49.31	54.46	27.08
7,500	52.31	54.28	28.64
Energetic Source (ES)			
Corn	60.64 <sup>a</sup>	54.99 <sup>a</sup>	33.38 <sup>a</sup>
Sorghum	42.60 <sup>b</sup>	51.82 <sup>b</sup>	22.14 <sup>b</sup>
P value			
BL	0.6275	0.2752	0.7242
ES	0.0001	0.0001	0.0001
BL x ES	0.9687	0.7942	0.9712
CV <sup>1</sup> (%)	16.88	3.86	16.90

<sup>1</sup> Coefficient of variation

<sup>a,b</sup> Means in a column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## *Anexos*

TABELA 6. Resultados dos testes bioquímicos realizados em galinhas poedeiras que receberam ração à base de sorgo.

Tratamento	Animal	Albumina (g/L)	PT (g/L)	FA (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ác. Úrico (mg/dL)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	CK
0/S	1	76,62	33,85	86	87	19	4	14,57	0,05	13,89
1500/S	3	86,02	45,18	219	119	22	12	7,87	0,09	10,84
1500/S	19	70,69	35,39	1417	103	11	4	11,91	0,02	24,58
4500/S	7	67,76	36,55	-15	85	17	2	3,64	-0,06	38,78

PT – proteína total, FA – fosfatase alcalina, AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, GGT – gama glutamiltransferase, CK – creatina-quinase.

TABELA 7. Resultados dos testes bioquímicos realizados em galinhas poedeiras que receberam ração à base de milho.

Tratamento	Animal	Albumina (g/L)	PT (g/L)	FA (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ác. Úrico (mg/dL)	GGT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	CK
0/M	2	72,69	33,36	1839	88	14	4	13,61	0,01	8,38
0/M	10	75,47	36,66	584	76	17	3	6,88	0,05	22,35
1500/M	4	76,47	37,76	780	89	18	5	10,99	0,03	13,04
1500/M	12	78,09	42,16	1295	61	0	7	-9,06	0,06	8,92
3000/M	6	81,40	42,82	447	65	13	6	11,93	0,07	38,34
3000/M	14	74,31	37,59	1659	81	15	4	11,78	0,05	6,81
3000/M	22	77,32	34,57	984	81	19	4	9,38	0,03	18,73
4500/M	8	69,38	36,99	728	104	16	5	9,15	0,05	10,9
4500/M	16	83,25	38,64	708	79	21	4	9,42	0,05	13,66

PT – proteína total, FA – fosfatase alcalina, AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase, GGT – gama glutamiltransferase, CK – creatina-quinase.

## **Parecer técnico das análises histopatológicas**

### **Fragmentos de fígado**

Os fígados das galinhas poedeiras apresentavam, macroscopicamente, coloração amarelada e eram friáveis ao toque, sendo estas características consideradas normais em virtude da categoria destas aves.

Microscopicamente o parênquima hepático não apresentava alterações patológicas. Vale ressaltar que o fígado das aves não se apresenta dividido em lóbulos, como ocorre nos mamíferos, os hepatócitos das aves estão dispostos em cordões devido à falta de septo interlobular. O corte do fígado da ave mostra uma massa de cordões de hepatócitos que compõem o parênquima hepático, circundados por sinusóides sangüíneos.

O formato dos hepatócitos era poliédrico com vários canalículos biliares ao redor. O citoplasma dos hepatócitos continha enormes e numerosos vacúolos gordurosos. O núcleo dos hepatócitos era levemente ovalado na forma, situados basalmente, um ou mais nucléolos estavam presentes.

### **Fragmentos de rim**

Os rins apresentavam, macroscopicamente, coloração marrom escura e estavam posicionados dorsalmente na parede abdominal, externos ao peritônio.

Microscopicamente os túbulos contorcidos proximais eram arredondados ao corte, ou de perfil alongado quando intimamente localizados com túbulos contorcidos distais e glomérulos. A parede dos túbulos contorcidos proximais constituía-se de epitélio cúbico simples com borda em escova. O citoplasma destas células, neste corte corado com HE, apresentava-se acidófilo, provavelmente pela presença de mitocôndrias. O núcleo das células dos túbulos proximais era de forma esférica, com um nucléolo proeminente e localizado próximo da base.

As partes delgadas das alças de Henle apresentavam epitélio simples pavimentoso, com núcleos salientes para a luz, a qual se mostrava mais ampla que a dos túbulos. As partes espessas, formadas por epitélio cúbico simples, também não apresentavam alterações.

As células dos túbulos contorcidos distais, em comparação com as células dos túbulos proximais, apresentavam-se menores, sem borda em escova e com citoplasma menos acidofílico. O núcleo destas células assumia uma posição central ou levemente deslocada para a lâmina basal.

A única alteração observada nas lâminas de rim foi a constatação que as células tubulares, proximais e distais, estavam soltas da lâmina basal, porém, isto foi considerado artefato de técnica, pois estava presente na totalidade das lâminas coradas.

## Fotografias relativas ao experimento



Galpão experimental de poedeiras da Unesp – Campus de Araçatuba.  
Fonte: Lorryne B. Polonio.



Galinhas poedeiras da raça Dekalbe se alimentando no galpão.  
Fonte: Lorryne B. Polonio



Cultivo de *Rubrivivax gelatinosus*.  
Fonte: Elisa H. G. Ponsano.



Biomassa de *R. gelatinosus* liofilizada.  
Fonte: Elisa H. G. Ponsano.



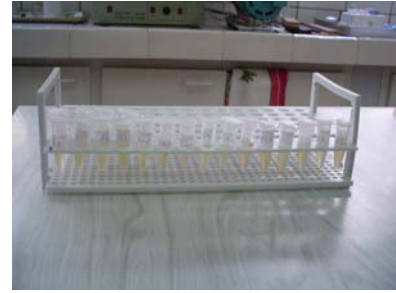
Gemas de diversas tonalidades provenientes das galinhas do experimento.  
 Fonte: Lorraine B. Polonio.



Teste de preferência das gemas.  
 Fonte: Lorraine B. Polonio.



Amostras de sangue das poedeiras em centrifugação.  
Fonte: Lorryne B. Polonio.



Soros obtidos das galinhas.  
Fonte: Lorryne B. Polonio.



Analizador bioquímico automático BTS – 370 Plus BioSystems.  
Fonte: Lorryne B. Polonio.



Da esquerda para a direita: Ana Paula da Silva Almeida, Michele Honaga e Lorryne B. Polonio.

Fonte: Lorryne B. Polonio.

## **Normas do Periódico Journal of Applied Poultry Research**

# **Instructions for Contributors to *Journal of Applied Poultry Research* (Revised 2006)**

## ***Editorial Policies and Procedures***

The mission of *Journal of Applied Poultry Research* (JAPR) is to provide practical, reliable, and timely information to those whose livelihoods are derived from the commercial production of poultry and those whose research benefits this sector; address topics of near-term application based on appropriately designed studies and critical observations; encourage scientific approaches to practical problem solving; and present information comprehensible to a broad readership.

By submission of a manuscript, the authors guarantee to the journal that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, thesis, or dissertation); that it is not under consideration for publication elsewhere; and that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out. Appropriate identification of previously published preliminary reports should be provided in a title page footnote. Translations of an article into other languages for publication requires approval by the Editor-in-Chief. Opinions or views expressed in papers published by JAPR are those of the author(s) and do not necessarily represent the opinion of the Poultry Science Association or the Editor-in-Chief.

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

## ***Contact Information for Journal Staff***

For information on the scientific content of the journal, contact the Editor-in-Chief, Dr. Henry Wilson, University of Florida, Department of Animal Sciences, PO Box 110910, Gainesville, FL 32611-0910 (e-mail: wilson@animal.ufl.edu).

For other information or to submit a paper, contact Susan Pollock, Managing Editor, PSA, 1111 North Dunlap Ave., Savoy, IL 61874; (telephone: 217-356-7641; FAX: 217-378-4083; susanp@assoqh.org).

For assistance with Manuscript Central, manuscript submission and copyright forms, or page charge and offprint orders, contact Jeremy Holzner, Editorial Assistant, PSA, 1111 North Dunlap Ave., Savoy, IL 61874 (telephone: 217-356-2426 ext. 38; FAX: 217-378-4083; jeremyh@assoqh.org).

## ***Care and Use of Animals***

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*, 1st revised edition, 1999 (Association Headquarters, 1111 North Dunlap Avenue, Savoy, IL 61874); and, if applicable, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd ed. Volume 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intra-abdominal and intra-thoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes caponization. The Editor-in-Chief of *Journal of Applied Poultry Research* may refuse to publish manuscripts that are not compatible

with these guides. If rejected solely on that basis, however, the paper may be resubmitted for reconsideration when accompanied by a written verification that a committee on animal care in research has approved the experimental design and procedures involved.

### *Types of Articles*

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

In addition to research reports, other types of papers appear in the journal:

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

**Review Articles.** Articles submitted to this section may cover new developments in a field, describe the evolution of a currently accepted management practice, propose changes in management based on current research, or describe procedures. Clear distinctions should be made between firmly established practices and unresolved questions. Articles should begin with a concise description of the topic followed by a critical evaluation of the important references. Review articles, whether solicited or unsolicited, will be subject to a stringent review process.

Review articles should follow the general format outlined in the Style and Form when appropriate and include brief subheadings to separate main ideas. The title page should use the appropriate format and include a summary and statement of primary audience. Review articles may include tables, figures, and photographs. A Conclusions and Applications section should be included in most cases.

The use of copyrighted materials must be by permission of the copyright holders. Authors are responsible for obtaining copyright permissions and sending them to the Managing Editor.

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

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

## SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

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

### *Copyright Agreement*

When a manuscript is accepted for publication, the authors agree to transfer copyright to the publisher, that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders, that written permission of the copyright holder has been obtained by the authors for material used from other copyrighted sources (including tables, graphs, figures, and illustrations), and that any costs associated with obtaining this permission are the authors' responsibility.

The Manuscript Submission and Copyright Release Form (available on the JAPR Web site: <http://www.poultryscience.org/japr>) must be completed and filed with the editorial office for each paper

submitted; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release form and must be completed by all authors before publication can proceed. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of co-authors. Authors who are not permitted to release copyright, such as federal employees, must still sign and return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

## REVIEW OF MANUSCRIPTS

The journal uses a two-stage review process. All manuscripts will first receive a preliminary review to ensure appropriateness for the journal. The second review will be a more detailed scrutiny by individuals knowledgeable in the specific subject area of the paper. Additional examination of the manuscript will be made by the editors.

The review process will be stringent. Names of authors will be made known to reviewers; reviewers may contact the authors directly with questions, suggestions, and comments if such contact will improve the paper or streamline the review process. The Subject Editors will handle all initial correspondence with authors during the review process; the Editor-in-Chief will notify the author of the final decision to accept or reject.

## PRODUCTION OF PROOFS

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

### *Proofs*

Author proofs of all manuscripts will be sent to the corresponding author indicated on the title page of the manuscript. Proofs should be read carefully, because the responsibility for proofreading is with the author(s).

Corrections to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. Galley proofs should be faxed (217-378-4083) to PSA headquarters. Proofs should be corrected and returned within 48 hours.

Editor queries appear in the text, within brackets and in boldface type. Queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication.

### *Page Charges and Offprints*

A charge of \$48 per page, or fraction thereof, will be assessed to partially defray costs of publication. In case of financial hardship, page charges may be deferred if requested in writing prior to publication. Such requests must be sent directly to the editor-in-chief.

A form for ordering offprints is forwarded to the corresponding author with the author proof. The form must be completed and returned to the Headquarters Office before publication. Reprints will not be available unless so ordered and will be shipped after publication of the issue. Invoices for offprints will be sent to the author or institution so indicated on the order form. There is a charge for all offprints.

## MANUSCRIPT PREPARATION: STYLE AND FORM

### *Preparing the Manuscript File*

Manuscripts should be double-spaced with lines and pages numbered consecutively using Times New Roman font at 12 points. All special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscripts (not placed in the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript.

Metric or English units (or both) are acceptable. Authors should use units appropriate for the intended audience. Energy content of feeds will be expressed as calories.

### **Headings**

**Major Headings.** Major headings are centered, boldface, all capital letters, and consist of SUMMARY, DESCRIPTION OF PROBLEM, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES.

Major headings in review articles, field reports, and symposium articles may vary from those listed here.

**First Subheadings.** First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

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

### **Title Page**

- Title should be indicative of content. It should capture the interest of all who might benefit from information in the manuscript. However, the length of the title should be kept to a minimum.
- Address and affiliation of author(s) should be included. Indicate to whom correspondence should be directed by means of a footnote, with the notation "Corresponding author: (e-mail address)" at the bottom of the title page.
- List three to eight key words or phrases to identify the most important subjects covered by the paper.
- The running title should be 30 characters or less, including spaces.
- Statement of primary audience. To determine appropriateness for the Journal and to assist in selecting reviewers, the author should indicate clearly what sector(s) within the poultry community (e.g., flock supervisors, nutritionists, quality assurance personnel, researchers, plant managers, veterinarians) could most benefit from the content of this article.

### **Summary**

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

### **Description of Problem**

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

### **Materials and Methods**

The author(s) should clearly establish in the Materials and Methods section why they approached the problem in a particular way. The rationale for including each treatment should be clearly stated. Detailed laboratory and bird management procedures should be described in the References and Notes section and not in the Materials and Methods section. Sources of stock, equipment, and materials should be listed in the References and Notes section and not in the text or footnote.

A brief statement of the statistical methods should be included, with more detailed descriptions placed in the References and Notes section.

In manuscripts using several treatments, a description of treatments should be included as Table 1.

## ***Results and Discussion***

This section begins with observed results and their interpretation. Descriptive subheadings may precede all major paragraphs and changes in subject emphasis. This section should discuss specifically how findings address the problem described in the Description of Problem section and how they are related to published works.

Statements regarding statistically significant differences between treatments in results should be included in the text, tables, and figures. Statements regarding differences should be avoided unless they are supported by statistical analyses and meet the stated level of probability (e.g.,  $P < 0.05$ ).

## ***Conclusions and Applications***

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

## ***References and Notes (with Acknowledgments)***

References and notes should be cited in text, by number within an editorial bracket (e.g., [1]). In the References and Notes section, citations should be listed in the order they appear and are numbered in the text (not alphabetically). Manuscripts may be returned to authors *before review* for renumbering of references if not cited in numerical order. Include details such as statistical analysis, detailed procedures; sources of birds, instruments, or items; details of designed instruments; literature review; and other tangential matters.

Cite acknowledgments at the end of this section in a subsection called *Acknowledgments*. These entries are not numbered.

## ***Tables***

Number tables consecutively according to the citation in the text. Each table must be placed on a separate page and must have a clear descriptive heading so that the meaning of the data will be understandable without reference to the text. Indicate footnotes to tables with numbers, beginning with 1. Statistical notation should be made with lowercase superscript letters or with asterisks, as appropriate. Statistical notation should place the superscript “a” on the largest mean. Probability values may be indicated as follows:  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ,  $***P \leq 0.001$ , and  $\dagger P \leq 0.10$ . Consult a recent issue of the journal for examples of tables.

## ***Figures***

- **Figure Size.** Prepare figures at final size for publication. Figures should be created at 14 cm wide (final publication size).
- **Font Size.** Ensure that all type within the figure and axis labels are readable at final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.
- **Fonts.** Use Helvetica or Times New Roman. Symbols may be inserted using the Symbol palette in Times New Roman.
- **Line Weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long dash, short dash, and dotted lines. Avoid the use of color, gray, or shaded lines, as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.
- **Axis Labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses, and should be consistent within a manuscript.
- **Shading and Fill Patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed (e.g., black, white, gray, diagonal stripes). Avoid the use of multiple shades of gray, as they will not be easily distinguishable in print.

- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: □, ■, ○, ●, ▲, ▼, △, ▽, ★, ☆, ◇, ◆, +, or ×. Symbols should be defined in a key on the figure if possible.
- **File Formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG. Avoid PowerPoint files and other formats.

For the best printed quality, line art should be prepared at 600 ppi. Grayscale and color images and photomicrographs should be at least 300 ppi.

- **Grayscale Figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.
- **Color Figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).
- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.
- **Caption.** The caption should provide sufficient information that the figure can be understood with excessive reference to the text. All author-derived abbreviations used in the figure should be defined in the caption.
- **General Tips.** Avoid the use of three-dimensional bar charts, unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and key are clear and easily readable at final publication size.

**Color Images.** The cost to publish in color is \$995 per figure; there is also a surcharge for color offprints. The corresponding author should complete a “Charges for Printing in Color” form, available on the journal website ([www.poultryscience.org/japr](http://www.poultryscience.org/japr)), and fax (217-378-4083) that form to the JAPR editorial office when a manuscript with color figures is accepted for publication.

### **Sample References**

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

#### **Refereed Journal Article**

Dansky, L. M., and F. W. Hill. 1952. Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chicks. *J. Nutr.* 47:449–459.

Snow, J. L., M. W. Douglas, and C. M. Parsons. 2003. Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 82:474–477.

#### **Monograph**

National Research Council. 1984. *Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Poultry.* 8th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

#### **Dissertation**

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

#### **Trade Journal**

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

#### **Chapter in Book**

Whittow, G. C. 1976. Regulation of body temperature. Pages 146–173 in *Avian Physiology*. P. D. Sturkie, ed. Springer-Verlag, New York.

***Proceedings***

Leeson, B. 1990. Factors influencing utilization of feed-grade fats by poultry. Pages 95–109 in Proc. 26th Guelph Nutr. Conf., Guelph, ON, Canada.

***Federal Register***

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

***Laboratory Procedure***

The extract was added to 30 mL of hexane, made to 100 mL with 10% aqueous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

***Personal Communication***

Stetka, P. R. 1999. Institute, city, state. Personal communication.

***Proprietary Product***

Incubator, Petersime, Zulte, Belgium ([www.petersime.com](http://www.petersime.com)).  
Avizyme TX, Finnfeed International, Marlborough, Wiltshire, UK.  
Thymol, 99% purity; Acros Organics, Geel, Belgium.

***Statistical Procedure***

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

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

***Statistical Software***

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

***Web Site***

Schaeffer, L. R. 1997. Random regression. <http://chuckagsci.colostate.edu/wais/logs/agdg869258263.html> Accessed Nov. 1997.

***Acknowledgments***

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

***Abbreviations***

The following abbreviations may be used without definition in *Journal of Applied Poultry Research*. Plurals do not require "s". Chemical symbols and three-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Other abbreviations should be defined at first use in the summary and main text, as well as in each table or figure in which they appear. Abbreviations should not be used in the manuscript title, or to begin a paragraph. They can be used, however, to begin sentences or in section headings, if previously defined. This list appears on the inside, front cover of the journal.

AME	apparent metabolizable energy	ME	metabolizable energy
AME <sub>n</sub>	nitrogen-corrected apparent metabolizable energy	ME <sub>n</sub>	nitrogen-corrected metabolizable energy
ANOVA	analysis of variance	MHC	major histocompatibility complex
BSA	bovine serum albumin	mRNA	messenger ribonucleic acid
BW	body weight	min	minute
°C	Celcius	mo	month
cDNA	complementary DNA	MS	mean squares
CF	crude fiber	n	number of observations
CP	crude protein	<i>N</i>	normal
cpm	counts per minute	NRC	National Research Council
CV	coefficient of variation	NS	not significant
d	day	PBS	phosphate-buffered saline
df	degrees of freedom	ppm	parts per million
DM	dry matter	r	correlation coefficient
DNA	deoxyribonucleic acid	r <sup>2</sup>	coefficient of determination, simple
EDTA	ethylenediaminetetraacetate	R <sup>2</sup>	coefficient of determination, multiple
EE	ether extract	RH	relative humidity
°F	Fahrenheit	RIA	radioimmunoassay
ft	foot	RNA	ribonucleic acid
g	gram	rpm	revolutions per minute
gal	gallon	s	second
GLM	general linear model	s.c.	subcutaneous
h	hour	SD	standard deviation
HPLC	high-performance (high-pressure) liquid chromatography	SE	standard error
ICU	international chick units	SEM	standard error of the mean
Ig	immunoglobulin	SRBC	sheep red blood cells
i.m.	intramuscular	TBA	thiobarbituric acid
in.	inch	T cell	thymic-derived cell
i.p.	intraperitoneal	TME	true metabolizable energy
IU	international units	TME <sub>n</sub>	nitrogen-corrected true metabolizable energy
i.v.	intravenous	TSAA	total sulfur amino acids
kcal	kilocalorie	USDA	United States Department of Agriculture
L	liter (also capitalized with any combination, e.g., mL)	vol/vol	volume to volume
lb	pound	vs.	versus
L:D	hours light:hours darkness in a photoperiod	wt/vol	weight to volume
m	meter	wt/wt	weight to weight
μ	micro	wk	week
<i>M</i>	molar	$\bar{x}$	mean
		yr	year

### **Supplemental Information (Online)**

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

**Journal Title Abbreviations.** A list of standard abbreviations for common journal titles is available online (<http://www.poultryscience.org/ps/jabbr.htm>).

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

**Manuscript Central Instructions.** Manuscripts are submitted online (<http://mc.manuscriptcentral.com/psa>). Full user instructions for using the Manuscript Central system are available online (<http://mcv3help.manuscriptcentral.com/tutorials/>).