

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS DE  
BOTUCATU  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

EFEITOS DO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ NOS SISTEMAS  
IMUNE E ANTIOXIDANTE DE FRANGOS DE CORTE

FERNANDA KAISER DE LIMA-KRENCHINSKI

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP

Junho de 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS DE  
BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

EFEITOS DO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ NOS SISTEMAS  
IMUNE E ANTIOXIDANTE DE FRANGOS DE CORTE

FERNANDA KAISER DE LIMA-KRENCHINSKI

*Médica Veterinária*

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Sartori

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP

Junho de 2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lima-Krenchinski, Fernanda Kaiser de.

Efeitos do óleo da semente de maracujá nos sistemas imune e antioxidante de frangos de corte / Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Roberto Sartori

Capes: 50403001

1. Frango de corte - Nutrição. 2. Carne - Qualidade. 3. Sementes oleaginosas. 4. Maracujá. 5. Resposta ao choque térmico. 6. Sistema imune.

Palavras-chave: Avicultura; Estresse térmico; Nutrição de frangos de corte; Permeabilidade intestinal; Qualidade de carne.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA KAISER DE LIMA-KRENCHINSKI – Nasceu no dia 24 de outubro de 1995, em Assis Chateaubriand/PR. Em 2014 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor de Palotina, completando em dezembro de 2018. Sob orientação da prof. Dr<sup>a</sup> Jovanir Inês Müller Fernandes foi bolsista de iniciação científica, presidente do grupo de estudos PENA, monitora da disciplina de Nutrição de Não Ruminantes e Avicultura. Em 2019, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Nutrição Animal) na Unesp – Botucatu, onde foi bolsista CNPq e FAPESP.

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e, por ter me iluminado durante essa caminhada, sempre me apresentando pessoas incríveis por onde passei.

A meus pais Flávio e Denilce, que sempre foram os pilares para minha formação pessoal e profissional, obrigada por tanto! Aos meus irmãos Gustavo e Antonio por fazerem parte dessa família que tive o privilégio de nascer. E a toda minha família por sempre se fazerem presentes em minha vida, vocês são muito especiais!

A meu esposo Fábio pelo companheirismo, amizade, paciência, ajuda em todas as fases desse processo e, por sempre se fazer presente. Obrigada por ser meu parceiro de vida!

A meus amigos que apesar da distância sempre se fazem presente! E também aos amigos que formei em Botucatu Tatiane, Priscila, Jéssica, Cássio, Bruna, Leone, Bismarck, Andrey, Renata, José, Igor, Will, Matheus, Evelyn, Iasmin, Lucas, Janaína e Tássio. Obrigada por tornarem essa fase mais leve e divertida.

A meu orientador prof. José Roberto Sartori, pela oportunidade, ensinamentos compartilhados e, a confiança depositada em meu trabalho, que ajudaram a me tornar a profissional que sou.

A meu coorientador prof. Pedro Magalhães Padilha e, ao pós-doutorando José Cavalcante Souza Vieira pelos conhecimentos e aprendizagem em uma área tão diferente e complexa que é a proteômica.

Aos grupos de estudos LabAves, Laboratório de Bioanálítica e Metaloproteômica (LBM), Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes (AquaNutri) e, ao Laboratório de Qualidade de Carne do Departamento de Economia, Sociologia e Tecnologia FCA, o meu muito obrigada! Pelos carregamentos, batidas de rações, coletas, abates, processamento de amostras, análises e afins, que na companhia de vocês se tornaram momentos divertidos, sem a ajuda de todos não seria possível a realização desse trabalho. Sou eternamente grata a todos que de alguma forma ajudaram!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP (FAPESP – processo nº 2019/12179-1) e a CNPq, pela concessão das bolsas de estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos profissionais da Unesp – Botucatu, tanto os professores, técnicos, secretárias, e demais funcionários, muito obrigada pelo apoio.

O meu muito obrigada a todos que de alguma forma participaram deste trabalho,  
sem sua contribuição não seria possível a realização do mesmo.

## Sumário

Resumo Geral .....	10
Abstract.....	12
CAPÍTULO I .....	14
Considerações Iniciais .....	15
1.1 Estresse por calor na avicultura e suas consequências fisiológicas.....	16
1.3 Sistema antioxidante.....	19
1.4 Ácidos graxos e o Sistema imunológico.....	20
1.2 <i>Passiflora</i> (maracujá) .....	22
2. Referências .....	26
CAPÍTULO II.....	32
Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos Santos, Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel, Cássio Yutto Oura, Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori .....	2
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Autor correspondente: ferkaiserlima@gmail.com .....	2
Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos Santos, Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel, Cássio Yutto Oura, Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori .....	3
Resumo .....	4
1. Introdução.....	8
1. Material e Métodos.....	11
2.1 Avaliação do rendimento de carcaça e de cortes comerciais.....	13
2.2 Avaliação da qualidade da carne.....	14
2.3 Titulação das imunoglobulinas após vacinação .....	15
2.4 Avaliação hematológica .....	15
2.5 Ensaio de funcionalidade intestinal.....	16

2.6 Análise proteômica do plasma de frangos.....	20
2. Resultados .....	24
3. Discussão .....	33
4. Conclusão.....	43
5. Referências bibliográficas .....	44
CAPÍTULO III.....	51
Óleo da semente de maracujá aumenta a resposta antioxidante de frangos de corte .....	52
Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos Santos, Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel, Cássio Yutto Oura, Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori .....	52
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Autor correspondente: ferkaiserlima@gmail.com .....	52
Óleo da semente de maracujá aumenta a resposta antioxidante de frangos de corte .....	53
Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos Santos, Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel, Cássio Yutto Oura, Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori .....	53
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.....	53
Resumo .....	54
Abstract .....	56
1. Introdução.....	58
2. Material e métodos .....	60
2.2 Capacidade antioxidante e peroxidação lipídica .....	65
2.3 Análise proteômica do plasma de frangos.....	66
3. Resultados .....	70
4. Discussão .....	76

5. Conclusão.....	81
6. Referências.....	83
APÊNDICE.....	87
CAPÍTULO IV .....	102
IMPLICAÇÕES .....	103

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Temperaturas utilizadas nas câmaras termoneutra e estresse térmico.....	12
Tabela 2- Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 33 dias de idade) e final (34 a 42 dias de idade).....	18
Tabela 3 - Rendimento (%) de carcaça de cortes comerciais e deposição de gordura abdominal em frangos de corte machos abatidos com 42 dias de idade, recebendo diferentes níveis de óleo da semente de maracujá.....	25
Tabela 4 - Peso absoluto (kg) de cortes comerciais e deposição de gordura abdominal de frangos de corte machos abatidos com 42 dias de idade, alimentados com diferentes níveis de óleo da semente de maracujá. ....	25
Tabela 5 - Desdobramento da interação entre temperatura e níveis de inclusão do óleo da semente de maracujá do peso absoluto (kg) de pernas de frangos de corte machos aos 42 dias de idade.....	26
Tabela 6 - Parâmetros de qualidade de carne do peito de frangos de corte aos 42 dias de idade alimentados com dietas contendo níveis de óleo da semente de maracujá. ....	27
Tabela 7 - Valores de títulos de anticorpos de frangos de corte vacinados contra o vírus da Doença de Newcastle, recebendo diferentes níveis de óleo da semente de maracujá.....	28
Tabela 8 - Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de frangos de corte, aos 30 dias de idade, alimentados com diferentes níveis de óleo da semente de maracujá e desafiados com estresse térmico.....	31
Tabela 9 - Contagem diferencial de leucócitos (%) e relação heterófilo:linfócito (H:L) de frangos de corte aos 30 dias de idade recebendo diferentes níveis de óleo da semente de maracujá e desafiado com estresse térmico.....	31
Tabela 10 - Níveis de FITC-d no plasma sanguíneo de frangos de corte submetidos ao ensaio de permeabilidade intestinal com 21 dias de idade.....	32
Tabela 11 – Temperaturas utilizadas nas câmaras termoneutra e estresse térmico.....	61
Tabela 12- Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias) e crescimento (22 a 33 dias).....	63
Tabela 13- Porcentagem de sequestro de DPPH (%) e, TBARS plasmático ( $\mu\text{mol}$ de MDA/L) em amostras de soro e, plasma sanguíneo de frangos de corte, com 21 dias de idade, recebendo diferentes níveis de óleo de semente de maracujá.....	71
Tabela 14 - Atividade de enzimas do sistema antioxidante de frangos de corte, com 35 dias de idade, recebendo diferentes níveis de óleo de semente de maracujá.....	73
Tabela 15 - Percentual de correlação (PercentMatches) entre as repetições de cada tratamento e qualidade de spot (Match Count) em cada repetição de cada tratamento. ....	75

Tabela 16- Proteínas identificadas por espectrometria de massa, no plasma sanguíneo de frangos de corte.....	87
--	----

## **Lista de Figuras**

Figura 1 - Cartograma de produção de maracujá (toneladas) por Unidade de Federação no ano de 2018.....	23
--	----

## ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NA SAÚDE DE FRANGOS DE CORTE

### Resumo Geral

O estresse térmico proporciona muitos prejuízos na avicultura industrial e com o objetivo de minimizá-los, estratégias nutricionais vêm sendo adotadas, com ênfase, principalmente aos alimentos naturais. O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da suplementação de óleo da semente de maracujá (OSM) na imunidade e respostas imunes, qualidade de carne e sistema antioxidante de frangos de corte. Para isso foram utilizados 450 pintainhos de 1 dia de idade, machos, da linhagem Cobb® 500, alojados em gaiolas de arame galvanizado, em duas câmaras com 45 gaiolas cada. O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo duas temperaturas (termoneutra e estresse cíclico pelo calor) e cinco tratamentos (controle sem inclusão de OSM + quatro níveis de inclusão de OSM (0,30; 0,50; 0,70; 0,90%) com nove repetições de cinco aves cada. A ração foi desprovida de antibióticos como melhorador de desempenho, porém acrescida de anticoccidiano em todos os tratamentos. Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância com auxílio do SAS 9.3 (SAS Institute, 2008) e, sendo significativas a ( $P < 0,05$ ) no teste de média pelo teste de Tukey. Houve efeito significativo para o peso vivo ao abate e peso de cortes comerciais, para frangos criados em ambiente termoneutro, que apresentaram maiores valores em relação ao estresse por calor, e a gordura abdominal apresentou menor valor para aves desafiadas por calor. O OSM influenciou no maior peso (em gramas) das pernas. Frangos de corte criados em estresse por calor apresentaram menores valores de  $a^*$  na musculatura do peito do que os frangos criados em ambiente termoneutro. Em relação a análise proteômica eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) do plasma sanguíneo para resultados voltados a qualidade de carne, a proteína *Actin alpha skeletal muscle*, apresentou diferença significativa nos tratamentos com inclusão de 0,9% de OSM em ambas as temperaturas (estresse por calor e termoneutra) e, *Neuropilin-1*, no tratamento termoneutro com 0% de inclusão de OSM. Com 21 dias de idade foi observado uma interação significativa para titulação de anticorpos, sendo que frangos criados em ambiente de estresse que receberam o nível de 0,90% de OSM, apresentaram maior valor de titulação vacinal. Aos 28 dias de idade, novamente os animais que receberam 0,90% de inclusão de OSM e, independente do ambiente de criação, apresentaram maiores valores de títulos de anticorpos. Na análise proteômica do plasma sanguíneo (2D-PAGE) foram encontradas diversas proteínas que

estão relacionadas com o sistema imunológico dos frangos de corte: *Complement factor B-like protease (Fragment)*; *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; *Mannose-binding protein*; *Zinc finger protein ubi-d4*; *Ig lambda chain C region*; *Ig lambda chain V-1 region*; *Apolipoprotein A-I*. A análise proteômica também apresentou resultados referentes a manutenção do epitélio gastrointestinal, com a expressão diferencial de *Retinol-binding protein 4* e, *Homeodomain-only protein*. Houve maior % de redução de DPPH com a maior inclusão do OSM, assim como maior expressão de *Alcohol dehydrogenase 1*, nos tratamentos com maior inclusão de OSM. Também houve diferença significativa para o efeito temperatura sobre a atividade da enzima catalase que se apresentou maior em ambiente termoneutro. Assim como, *Nuclear receptor coactivator 7* que foi diferencialmente expresso no tratamento 0% de frangos de corte criados em ambiente termoneutro. *Hemoglobin subunit epsilon* teve sua expressão diferenciada no tratamento 0,9% de frangos de corte criados em ambiente de estresse. Além disso, vários *spots* proteicos relacionados as chaperonas moleculares foram diferencialmente expressas nos tratamentos 0,5% e 0,9% de inclusão de OSM em ambas as temperaturas de criação. *Membrane-associated progesterone receptor component 1* foi diferencialmente expresso nos tratamentos de 0,9% de inclusão de OSM em ambos os ambientes de criação.

Palavras-chave: Avicultura, estresse térmico, nutrição de frangos de corte, permeabilidade intestinal, qualidade de carne.

## PASSION FRUIT SEED OIL IN THE HEALTH OF BEARING CHICKENS

### Abstract

Heat stress causes many damages in industrial poultry farming and in order to minimize them, nutritional strategies have been adopted, with emphasis, mainly on natural foods. The objective of this work was to study the effect of passion fruit seed oil (OSM) supplementation on immunity and immune responses, meat quality and antioxidant system of broiler chickens. For this, 450 1-day-old male chicks of the Cobb® 500 strain were used, housed in galvanized wire cages, in two chambers with 45 cages each. The design was completely randomized, in a 2 x 5 factorial scheme, with two temperatures (thermoneutral and cyclic heat stress) and five treatments (control without inclusion of OSM + four levels of inclusion of OSM (0.30; 0.50; 0.70; 0.90%) with nine replicates of five birds each. The ration was devoid of antibiotics as a performance enhancer, but added anticoccidial in all treatments. Data were analyzed using analysis of variance with the aid of SAS 9.3 (SAS Institute, 2008) and, being significant ( $P < 0.05$ ) in the mean test by the Tukey test. which had higher values in relation to heat stress, and abdominal fat had lower value for heat challenged birds. OSM influenced the higher weight (in grams) of the legs. Broilers reared under heat stress had lower value  $a^*$  in the breast musculature than broilers raised in a thermoneutral environment. Regarding proteomic two-dimensional electrophoresis analysis in polyacrylamide gel (2D-PAGE) of blood plasma for meat quality results, the protein Actin alpha skeletal muscle showed a significant difference in treatments with inclusion of 0.9% OSM in both temperatures (heat stress and thermoneutral) and, Neuropilin-1, in thermoneutral treatment with 0% inclusion of OSM. At 21 days of age, a significant interaction for antibody titration was observed, and broilers reared in a stress environment that received the level of 0.90% of OSM had a higher value of vaccine titration. At 28 days of age, again the animals that received 0.90% inclusion of OSM and, regardless of the rearing environment, had higher antibody titers. In the proteomic analysis of blood plasma (2D-PAGE) several proteins that are related to the immune system of broiler chickens were found: Complement factor B-like protease (Fragment); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Mannose-binding protein; Zinc finger protein ubi-d4; Ig lambda chain C region; Ig lambda chain V-1 region; Apolipoprotein A-I. Proteomic analysis also showed results regarding the maintenance of the gastrointestinal epithelium, with the differential expression of Retinol-binding protein 4 and Homeodomain-only protein. There was a greater % reduction of DPPH with the

greater inclusion of OSM, as well as greater expression of Alcohol dehydrogenase 1, in treatments with greater inclusion of OSM. There was also a significant difference for the temperature effect on the catalase enzyme activity, which was higher in a thermoneutral environment. As well as, Nuclear receptor coactivator 7 which was differentially expressed in the 0% treatment of broilers reared in thermoneutral environment. Hemoglobin subunit epsilon had its expression differentiated in the treatment of 0.9% of broilers reared in stress environment. Furthermore, several protein spots related to molecular chaperones were differentially expressed in the 0.5% and 0.9% OSM inclusion treatments at both rearing temperatures. Membrane-associated progesterone receptor component 1 was differentially expressed in treatments of 0.9% inclusion of OSM in both rearing environments.

Keywords: Poultry, heat stress, broiler nutrition, intestinal permeability, meat quality.

## CAPÍTULO I

## Considerações Iniciais

A pandemia causada pela COVID-19 trouxe inúmeros desafios para todos. De acordo com o último Relatório Global sobre Crises Alimentares (GRFC, 2020), em 2019 quase 135 milhões de pessoas em 55 países passaram fome aguda. Desde o início da pandemia por COVID-19, esses números têm aumentado. As cadeias de abastecimento foram desaceleradas e interrompidas por atrasos no transporte, mercados fechados e restrições à exportação (ABPA, 2021).

Apesar do cenário desfavorável para maioria dos setores, a produção de carne de frangos aumentou, saltando de 13,245 em 2019 para 13,845 milhões de toneladas em 2020. O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frangos, exportando 31% da sua produção e, terceiro maior produtor mundial (ABPA, 2021). Destaca-se também no cenário de produção de grãos, sendo o maior produtor de soja do mundo, produzindo 135,4 milhões de toneladas (CONAB, 2021). O aumento da produção de aves na Ásia e na América Latina, em particular, deve representar 60% do aumento global da carne de aves. Este crescimento será estimulado por baixos custos de produção, um curto ciclo, altas taxas de conversão de alimentos (OECD FAO, 2020).

As projeções para os próximos anos demonstram que, com o aumento da conscientização do consumidor sobre questões de dieta e saúde, deve-se aumentar o consumo de aves e peixes e reduzir o consumo de carne vermelha e açúcar. Essas mudanças serão particularmente pronunciadas em países de alta renda (OECD FAO, 2020). O consumidor também tem buscado por alimentos funcionais, enriquecidos com nutrientes essenciais, que podem melhorar a saúde e o bem-estar e reduzir o risco de doenças (GRASHORN, 2011).

Essa demanda por carne de aves apresenta perspectiva de aumento pois, além de ter seu consumo maior em países com alta renda por seus atributos de saúde superiores, também atende as necessidades de países de baixa renda, onde o consumo será impulsionado por sua ampla aceitação cultural aliado aos preços mais baixos, tornando as aves a carne de preferência dos consumidores nos países em desenvolvimento (OECD FAO, 2020).

O consumo de carne de aves está projetado para aumentar globalmente, sendo responsáveis por 50% da carne adicional consumida. O aumento das importações na próxima década será composto principalmente de aves, o maior contribuinte e, carne

bovina. Juntos esses dois tipos de carne, devem responder pela maioria das importações adicionais de carne para a Ásia e África (OECD FAO, 2020).

O curto ciclo de produção permite que os produtores respondam rapidamente aos sinais do mercado, além de permitir melhorias rápidas na genética, na saúde animal e na nutrição. A carne de frango continuará a ser o principal impulsionador do crescimento da produção de carne, embora em um ritmo mais lento em relação à década passada. A produção se expandirá rapidamente com ganhos de produtividade sustentados na China, Brasil e Estados Unidos, e investimentos feitos na União Europeia. A rápida expansão também está prevista na Ásia, uma vez que o abandono do consumo de carne de suíno no curto prazo, por conta do surto de peste suína africana, beneficiará as aves no médio prazo (OECD FAO, 2020).

As exportações de carne estão concentradas e, a participação combinada dos três maiores exportadores de carne - Brasil, União Europeia e Estados Unidos - está projetada para chegar a quase 60% das exportações mundiais de carne até 2029. Na América Latina, é esperado alta participação dos países exportadores tradicionais no comércio global de carne, beneficiando-se da desvalorização de suas moedas e da produção excedente de grãos para ração (OECD FAO, 2020).

Essa expansão na produção se deve às melhorias em procedimentos de manejo, sanidade, melhoramento genético, nutrição e, abundância em matérias primas de qualidade. Sendo, cada vez mais impulsionada pelo crescimento na demanda devido as mudanças nos padrões de consumo.

## 1. Revisão de Literatura

### 1.1 Estresse por calor na avicultura e suas consequências fisiológicas

A ocorrência natural de estressor ambiental, como altas temperaturas, causam efeitos prejudiciais e, ainda é considerado um problema comum na criação de frangos de corte no Brasil (LARA e ROSTAGNO, 2013; BELAL et al., 2018). Segundo a definição, o termo estresse representa a resposta do organismo, enquanto agente causador é definido como estímulo estressante ou estressor (PICKERING, 1981). Sendo assim, o agente estressor é aquele que possui a capacidade para alterar a homeostasia, como por exemplo, fome, dor, calor/frio, ansiedade, medo, entre outros fatores, provocando respostas que são mediadas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) (PAGLIARONE et al., 2016).

Aves e suínos dispõem do centro termorregulador localizado no hipotálamo, compreendido por uma região do sistema nervoso central, onde recebem estímulos de termorreceptores localizados na pele, medula espinhal, órgãos abdominais e vasos sanguíneos (ANDERSSON e JONASSON, 2006). O SNA é responsável pela resposta mais imediata à exposição ao estresse.

O eixo HHA, recebe o estímulo nervoso que chega ao hipotálamo, provocando a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH atua sobre a hipófise estimulando a produção e secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH liberado na circulação sanguínea chega até a glândula suprarrenal e estimula a secreção de glicocorticoides elevando os níveis circulantes, como, por exemplo, do cortisol (PAGLIARONE et al., 2016).

A glândula suprarrenal desempenha papel importante nessa reação hormonal em animais que não estejam em homeostase, sendo responsável pela produção de hormônios esteróides, importantes para a adaptação às condições adversas proporcionada pelo estresse, como cortisol, corticosterona, esteroides sexuais e aldosterona, além da noradrenalina e adrenalina (ANDERSSON e JONASSON, 2006).

Os hormônios cortisol e corticosterona representam o principal produto da secreção hormonal na glândula suprarrenal, possuindo como regulador de sua secreção o ACTH (adenohipófise) (BREUNER e ORCHINIK, 2002). O animal em situações de estresse aciona rapidamente respostas da glândula suprarrenal, resultando em aumento na produção de glicocorticoides e catecolaminas. Esse aumento na produção de hormônios representa o primeiro mecanismo de defesa do sistema endócrino para proteger o organismo contra as condições estressantes (BREUNER e ORCHINIK, 2002; MOSTL e PALME, 2002).

As adaptações fisiológicas do animal em relação ao estresse térmico, tem como consequência a expressão de proteínas relacionadas ao estresse (ZENG et al., 2013; TANG et al., 2015), as quais se manifestam em mudanças moleculares em nível genômico, transcriptômico, metabolômico e proteômico (JASTREBSKI et al., 2017). Entre essas adaptações, ocorre a expressão dos genes das proteínas de choque térmico (HSPs) que codificam as chaperonas moleculares responsáveis pela estabilização das estruturas das proteínas em temperaturas altas (FEDER e HOFMANN, 1999; BELAL et al., 2018).

As HSPs exercem funções importantes no crescimento, desenvolvimento, diferenciação e síntese de proteínas (DAVENPORT et al., 2014), além de desempenharem função reguladora em resposta ao estresse tanto nos tecidos quanto nas células dos animais (XU et al., 2018). HOSSEINI et al. (2018) observaram menor expressão dos genes HSP70 no cérebro e coração de frangos submetidos a alta densidade populacional (20 aves/m<sup>2</sup>) quando alimentados com dietas suplementadas com mistura de óleos essenciais provenientes dos extratos vegetais (canela e tomilho). Indicando que, o uso de extratos vegetais pode auxiliar no aumento da tolerância em condições estressantes e, proteger contra danos oxidativos em frangos de corte.

Além disso, as condições de estresse por calor afetam os parâmetros fisiológicos e imunológicos em frangos de corte (XU et al., 2018). Recentemente verificou-se que o estresse calórico em frangos de corte alterou a expressão das proteínas das junções oclusivas do epitélio intestinal, onde a barreira intestinal de frangos de corte pode ser adversamente afetada. O estresse, agudo ou crônico, induz a disbiose, associada a alterações da permeabilidade intestinal, caracterizadas por redistribuição temporária das proteínas das junções de oclusão (SONG et al., 2014). A molécula de FITC-d é considerada indicador de permeabilidade intestinal em frangos de corte. Essa macromolécula (3–5 kDa) normalmente não é absorvida pela mucosa intestinal intacta. No entanto, durante a inflamação entérica, como há ruptura das junções oclusivas nas células epiteliais, ocorre aumento da permeabilidade e a passagem de FITC-d na circulação sanguínea (VICUÑA et al., 2015).

Nas aves o estresse por calor também interfere de forma negativa no sistema antioxidante, uma vez que a peroxidação lipídica nos tecidos se eleva gerando acúmulo de radicais livres. Este acúmulo favorece alterações na célula e, conseqüentemente, diminuição no desempenho zootécnico e deterioração da qualidade da carne (MAINI et al., 2007). A peroxidação lipídica é o fator mais prevalente na conservação e que afetará decisivamente a retenção de água e a cor da carne (DEL PUERTO et al., 2016). A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados altera a composição, estrutura e propriedades das membranas (fluidez, permeabilidade) (MORRISSEY et al., 1998).

Dessa forma, com o objetivo de reduzir os efeitos prejudiciais que o estresse térmico proporciona na avicultura industrial desde a diminuição do crescimento, alteração na permeabilidade intestinal e, de parâmetros fisiológicos até a menor qualidade da carne, estratégias nutricionais vêm sendo adotadas com o intuito de promover melhor produção

e bem-estar animal, enfatizando, principalmente aos alimentos naturais (BRENES e ROURA, 2010; PLACHA et al., 2014).

### 1.3 Sistema antioxidante

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, realizando funções biológicas relevantes (BARBOSA et al., 2010). Durante os processos metabólicos, os radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas é importante para várias funções fisiológicas, como a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes, participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARBOSA et al., 2010).

Porém, a produção em excesso pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), que ocorrem quando a produção de oxidantes ultrapassa os limites dos sistemas antioxidantes, ocorrendo desequilíbrio, que pode determinar a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (SHAMI et al., 2004). Esse desequilíbrio vai gerar diferentes respostas celulares que é influenciado pelo tipo de célula e, nível de estresse oxidativo. Quando o nível de estresse é baixo, muitas células respondem aumentando a proliferação celular e, quando o estresse oxidativo aumenta, as respostas celulares mudam podendo determinar a oxidação de proteínas, lipídeos, DNA resultando em lesões oxidativas (CAMINI, 2014). Essas células podem ainda se recuperar substituindo ou, reparando as moléculas lesadas (exemplo DNA) ou, podem sobreviver com lesões. Em situações extremas pode ocorrer mecanismos de morte celular (exemplo apoptose e necrose) (HALLIWELL et al., 2015). Esses danos ocorrem ao DNA, proteínas e organelas celulares, mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares (HALLIWELL et al., 1992).

O objetivo dos mecanismos de defesa antioxidante é de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos (SHAMI et al., 2004). Dessa forma, o antioxidante é definido como uma substância que retarda, previne ou remove lesões oxidativas (HALLIWELL et al., 2015). Esse conceito inclui enzimas antioxidantes e, compostos não enzimáticos. As células produzem enzimas antioxidantes, como exemplo superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT) e, glutatona peroxidases (GPx), que agem por mecanismo de prevenção, impedindo ou controlando os radicais

livres em excesso e prevenindo danos à estrutura celular (SIES, 1993). As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem grande variedade de moléculas com capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ERO) (FINKEL et al., 2000; VALKO et al., 2007) incluindo compostos sintetizados pelo próprio organismo (exemplo glutatona, bilirrubina, piruvato, coenzima Q, melatonina, ácido úrico) e compostos incluídos a partir da dieta (exemplo tocoferol, ascorbato, carotenoides, flavonoides) (HALLIWELL et al., 2015). Essas defesas antioxidantes podem atuar de duas maneiras: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Nas condições em que as defesas antioxidantes endógenas não são suficientes para impedir os danos oxidativos, compostos da dieta, com propriedades antioxidantes podem exercer efeitos benéficos e aumentar as defesas celulares contra o dano oxidativo (RODRIGO et al., 2007).

Os antioxidantes naturais obtidos por meio da dieta agem na fase de iniciação da reação, reagindo de forma a interferir na participação do O<sub>2</sub> ou competindo com os radicais livres dos ácidos graxos (BOBBIO et al., 1992). Estes compostos tanto podem inibir radicais livres, ou ainda interferir na atividade de certas enzimas aumentando ou diminuindo a sua atividade (DRUŻYŃSKA et al., 2008).

Pesquisas que buscam por compostos de origem natural têm verificado que muitos vegetais, em particular as especiarias e frutas, apresentam em sua constituição além dos nutrientes essenciais, compostos com ação digestivas (HAFEEZ et al., 2015) e, antioxidantes (HALLIWELL 1996, HARBORNE e WILLIAMS, 2000). A função antioxidante dos extratos vegetais é de extrema importância, a qual tem sido estudada com a finalidade de melhorar a estabilidade oxidativa em diversos alimentos, tais como: carne de frango, carne bovina e ovos (PLACHA et al., 2014). O uso de compostos de origem natural, na alimentação animal, está se tornando uma alternativa contra os danos do estresse oxidativo.

#### 1.4 Ácidos graxos e o Sistema imunológico

Os ácidos graxos exercem diversas funções sobre as células imunológicas, como por exemplo: servem de combustível para geração de energia, compõem fosfolípidos da membrana plasmática contribuindo com propriedades físicas e funcionais das membranas, regulam a expressão de genes com efeitos na atividade de receptores,

processos de sinalização intracelular ou em fatores de transcrição celular. Além disso, podem modular a produção de citocinas, a proliferação de linfócitos, a expressão de moléculas de superfície, fagocitose, apoptose e podem inibir a atividade de células *natural killer* (CALDER et al., 2009).

O óleo da semente de maracujá apresenta ação no sistema imune em função da presença do ácido linoleico (PUFAs n-6), sendo que representa aproximadamente 69 % da sua composição. Esse ácido graxo é encontrado nas sementes de plantas oleaginosas, principalmente nos óleos de soja, milho, girassol e nas castanhas (YOUUDIM et al., 2000). Assim como os PUFAs n-6 os n-3 são também denominados ácidos graxos essenciais, que não podem ser sintetizados pelas células animais, devendo ser obtidos por meio da dieta (YEHUDA et al., 2002).

O ácido linoleico é convertido em ácido araquidônico (AA) por enzimas dessaturase e elongases, podendo servir de precursor para eicosanoides, mediadores inflamatórios (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (SIMOPOULOS, 2004). O ácido araquidônico está presente nas membranas plasmáticas de praticamente todas as células, como por exemplo: eritrócitos, plaquetas, monócitos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, neuronais, hepáticas, do neuroblastoma e da retina (SIMOPOULOS, 2002).

Em resposta a diferentes estímulos, o ácido araquidônico pode ser liberado das membranas celulares pela ação de fosfolipases para ser metabolizado por duas diferentes enzimas, a cicloxigenase e a lipoxigenase. A via da cicloxigenase fornece importantes produtos metabólicos, como a prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e as prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). As lipoxigenases formam hidroperóxidos instáveis que darão origem aos leucotrienos B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), todos participando dos processos inflamatórios (CARVALHO, 1990).

O ácido araquidônico é precursor dos prostanóides e dos leucotrienos. Os prostanóides são obtidos pela enzima cicloxigenase, que converte esses ácidos graxos livres em endoperóxidos, originando as prostaglandinas e tromboxanos. Os leucotrienos são obtidos pela ação da enzima lipoxigenase, que também está relacionada com a produção das lipoxinas (YOUUDIM, 2000). Tanto os prostanóides como os leucotrienos agem de forma autócrina e parácrina, influenciando inúmeras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos no organismo (SMITH, 1988). Entre os prostanóides, a maior afinidade do AA pela cicloxigenase resulta em maior probabilidade

de obtenção das prostaglandinas e tromboxanos da série 2. A essa série pertencem o tromboxano A<sub>2</sub> e as prostaglandinas E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub>, que participam de inúmeros processos inflamatórios no organismo. Contudo, os seus correspondentes da série n-3 possuem propriedades anti-inflamatórias (SIMOPOULOS, 2004).

O uso de ácidos graxos poliinsaturados na dieta demonstra grande influência na modulação do sistema imunológico de aves (PARMENTIER et al., 1997). Sua inclusão tem efeitos aprimoradores nas respostas de anticorpos e nas respostas inflamatórias, em aves (PARMENTIER et al., 1997; SIJBEN et al., 2000), o que se torna interessante quando esse fator pode ser usado para contornar prováveis problemas na sua criação. Muitas vezes esses animais são criados em ambientes que desafiam seu sistema imunológico (CASTRUCCI et al., 1994) como por exemplo, o estresse gerado por condições extremas de temperatura e de densidade elevada, que podem influenciar negativamente o sistema imunológico.

### 1.2 *Passiflora* (maracujá)

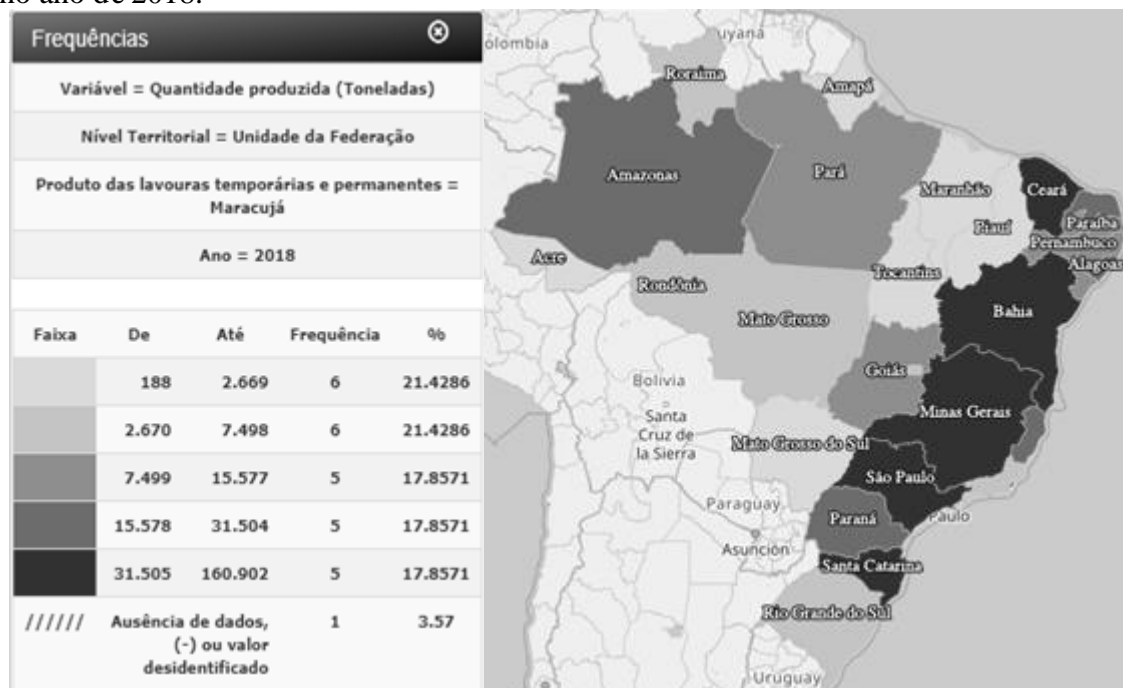
O gênero *Passiflora* spp. (maracujá) apresenta elevada importância alimentar, ornamental, econômica e medicinal (JUDD et al., 1999). Existem mais de 500 espécies desse gênero, sendo 120 espécies nativas do Brasil (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá. Não há informações atualizadas da produção de maracujá nos últimos anos, porém no último levantamento realizado no ano de 2018, o Brasil produziu aproximadamente 1 milhão de toneladas por ano, com produtividade média de 14 t/ha/ano (IBGE, 2019). Como demonstrado na Figura 1, pelo cartograma de estados brasileiros produtores de maracujá, segundo a legenda de produção, em toneladas, os estados que mais produzem são: Bahia, Ceará, Santa Catarina, São Paulo e, Minas Gerais (IBGE, 2019).

O maracujá produzido no Brasil é exportado para países europeus e latino-americanos. Além do Brasil, outros países também exploram essa cultura comercialmente, como Equador, Colômbia, Peru, Bolívia, Venezuela, África do Sul e Austrália (EMBRAPA, 2019).

Estima-se que 60% da produção brasileira de maracujá seja destinada ao consumo in natura. O restante é destinado às indústrias de processamento, sendo o suco o principal produto (FIGUEIREDO et al., 2009). A principal utilização da polpa é na fabricação de néctares, sucos concentrados ou prontos para consumo, além do seu aproveitamento na formulação mista com outras polpas de frutas e, extrato de soja. Até o momento, somente

a polpa do maracujazeiro-azedo é usada em escala industrial com a cadeia produtiva já estabelecida (EMBRAPA, 2019). Neste processo, são descartadas toneladas de subprodutos como cascas e sementes, que correspondem a cerca de 68% do peso total do fruto (OLIVEIRA et al., 2002; FERRARI et al., 2004; OLIVEIRA et al. 2011).

Figura 1 - Cartograma de produção de maracujá (toneladas) por Unidade de Federação no ano de 2018.



Fonte: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>

Existem numerosos estudos associando diferentes partes da planta a benefícios a saúde, como propriedades analgésicas, antipiréticas, anti-inflamatórias (SARAVANAN; ARUNACHALAM e PARIMELAZHAGAN, 2014), ansiolíticas (DHAWAN; KUMAR e SHARMA, 2001), antioxidante, antimicrobianas e antidiabéticas (RUDNICKI et al., 2007; GOSMANN et al., 2011; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2014; SILVA et al., 2014; PINELI et al., 2015).

Prasad (1980) identificou que as sementes do maracujá contêm cerca de 23% de óleo com características químicas e físicas semelhantes às do óleo de gergelim, soja e outros óleos vegetais. O óleo da semente do maracujá é considerado boa fonte de ácidos graxos essenciais. O ácido linoleico (n-6) é um dos principais ácidos graxos do óleo da semente de maracujá (cerca de 67,8 – 74,8%) (NYANZI et al., 2005; MALACRIDA e JORGE, 2012), seguido pelo ácido oleico (18-20%) e pelo ácido palmítico (10-14%). O ácido olinolênico (n-3) é encontrado em menor quantidade (0,8-1%) (LEONEL et al., 2000). Resultados também encontrados por Ferrari (2004), indicaram que o óleo da

semente de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) apresenta predominância de ácidos graxos insaturados (linoleico e oleico).

O alto conteúdo de ácido graxo linoleico é o maior responsável pelas insaturações do óleo. Os animais não sintetizam alguns ácidos graxos poliinsaturados como o linoleico (n-6) e linolênico (n-3), sendo então considerados essenciais na dieta (TOGASHI et al., 2007). Os ácidos graxos poli-insaturados são os mais importantes lipídios bioativos e, são encontrados principalmente em óleos de sementes de plantas. São importantes substratos para a biossíntese de hormônios celulares (eicosanoides) e, outros compostos sinalizadores que modulam a saúde (ALUKO, 2012).

Existem dois grupos de ácidos graxos essenciais, os ácidos graxos ômega-6 (n-6) e os ômega-3 (n-3) representados pelo ácido linoleico (C18:2) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3), respectivamente (MARTIN et al., 2006).

Silva e Jorge (2017) pesquisaram a composição de vários óleos obtidos de sementes de frutas, e identificaram o total de 286,20 mg/kg de tocoferol em óleo de semente de maracujá, além de carotenoides (6,70  $\mu$ g  $\beta$ -caroteno/g de óleo). Assim como Piombo et al. (2006) verificaram a presença de tocoferóis 465 ppm/100g em óleo da semente de maracujá (sendo os principais  $\gamma$ -tocoferol 46,5% e o  $\sigma$ -tocoferol 52,4%).

Os tocoferóis ocorrem em quatro formas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tocoferol, sendo esse grupo de moléculas responsável pela atividade da vitamina E (GLISZCZYNSKA-SWIGLO et al., 2007). Estão entre os mais importantes antioxidantes lipossolúveis e, exercem inibição efetiva na oxidação lipídica de óleos e gorduras e também em sistemas biológicos (KAMAL-ELDIN e APPELQVIST, 1996). A atividade antioxidante dos tocoferóis é, principalmente, devida a capacidade de doar seus hidrogênios aos radicais livres, interrompendo a propagação em cadeia (RAMALHO e JORGE, 2006). Além disso, os tocoferóis podem inibir a oxidação induzida pelo oxigênio singlete, doando um elétron originando uma molécula de oxigênio tripleto que é menos reativa (KAMAL-ELDIN, APPELQVIST, 1996).

Segundo Dhawan et al. (2004), o gênero *Passiflora* possui importantes componentes fitoquímicos com atividade antioxidante, como compostos fenólicos, glicosídeos e alcaloides. Outros autores demonstraram que o óleo de maracujá amarelo apresenta alto teor de compostos fenólicos, constituindo-se boa fonte de antioxidantes (MALACRIDA e JORGE, 2012). Os compostos antioxidantes estão presentes em quantidades significativas do óleo da semente de maracujá, como esteróis (209 mg/100g),

sendo os principais o estigmasterol 41,7 %,  $\beta$ -sitosterol 41,5%, o campesterol 13,5% (PIOMBO et al., 2006). Estes componentes podem inibir radicais livres e, atuar como agente pro-oxidante em metais, ou ainda interferir na atividade de certas enzimas aumentando ou diminuindo. Os fenóis podem também ajudar na atividade de outros antioxidantes, como vitaminas lipossolúveis (DRUŻYŃSKA et al., 2008).

Os compostos fenólicos são substâncias produzidas no metabolismo secundário de plantas e apresentam potencial antioxidante em situações de estresse oxidativo (calor excessivo, fome, sede, entre outros) (NACZK e SHAHIDI, 2006). Nas plantas os polifenóis colaboram para características sensoriais como, cor, odor, amargor, *flavour* e estabilidade oxidativa (PANDEY e RIZVI, 2009). Isso ocorre em função da estrutura química, que atua como antioxidante efetivo no sequestro de radicais livres e na inibição da oxidação em cascata (VATTEN e SHETTY, 2005), e também a modulação de moléculas biológicas sinalizadoras e efetoras, sendo capazes de participar nos processos de repressão/indução da expressão genica ou ativação/desativação de proteínas, enzimas e fatores de transcrição de vias metabólicas ( DROGE, 2002; YEH e YEN 2006).

Charradi et al. (2012) investigaram o efeito da administração de extrato de semente e casca de uva, contra o estresse oxidativo em camundongos e, verificaram que os produtos foram capazes de atenuar os efeitos deletérios sobre a atividade das enzimas antioxidantes, reduzir a produção de malonaldeído e de proteínas carboniladas.

Visto a composição do óleo de semente de maracujá, é considerado antioxidante, pois seus componentes apresentam ação supressora dos radicais livres diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo, que ocorre quando os animais são submetidos ao estresse. O uso do óleo de semente de maracujá (OSM) se torna interessante pois, o Brasil, devido as características de clima tropical, com ocorrência natural de altas temperaturas pode causar estresse ambiental para a avicultura (LARA e ROSTAGNO, 2013; BELAL et al., 2018) e assim, o OSM pode minimizar os efeitos negativos do estresse térmico.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de níveis crescentes de óleo da semente de maracujá (OSM) na dieta de frangos de corte criados em estresse por calor e ambiente termoneutro, sobre o rendimento de carcaça, qualidade de carne, titulação de anticorpos em resposta à vacinação, parâmetros hematológicos, permeabilidade intestinal, atividade de enzimas do sistema antioxidante, capacidade antioxidante, peroxidação lipídica e análise do proteoma plasmático (2D-PAGE) de frangos de corte. Sob a hipótese de que os compostos bioativos, principalmente ácido

linoleico (n-6) e, os tocoferóis presentes no óleo da semente de maracujá sejam capazes de melhorar/ atenuar os danos causados pelo estresse por calor, assim como proporcionar uma melhora no sistema imunológico e que os compostos bioativos, principalmente carotenoides presentes no óleo da semente de maracujá, fossem capazes de reduzir os danos oxidativos causados pelo estresse por calor.

O capítulo II e III foi escrito conforme as normas do periódico *Brazilian Journal of Poultry Science*.

## 2. Referências

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2019. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2019.pdf>. Acesso em: 03 de março, 2020.

ALUKO, R. E. *Functional foods and nutraceuticals*. New York: Springer, p. 155, 2012.

ANDERSSON, B.E., JONASSON H. *Regulação da Temperatura e Fisiologia Ambiental*. DUKES. *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12<sup>a</sup> Ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, p. 946, 2006.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. *Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios*. *Revista de nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BELAL, S. A., KANG, D. R., CHO, E. S. R., PARK, G. H., SHIM, K. S. *Taurine Reduces Heat Stress by Regulating the Expression of Heat Shock Proteins in Broilers Exposed to Chronic Heat*. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 20, n. 3, p. 479-486, 2018.

BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A., STRINGHETA, P.C. *Stability of copigmented anthocyanins from Panicum elinis toward light and oxygen at different pH*. *Bulletin Liaison-Groupe Polyphenols*, v. 16, p. 241-244, 1992.

BRENES, A., ROURA, E. *Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.

BREUNER, C.W., ORCHINIK, M. *Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid in vertebrates*. *The Journal of Endocrinology*. v. 175, p. 99-112, 2002.

CALDER P.C., ALBERS R., ANTOINE J.M., BLUM S., BOURDET-SICARD R., FERNS G.A., FOLKERTS G., FRIEDMANN P.S., FROST G.S., GUARNER F., LØVIK M. *Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition*. *Br J Nutr*, v. 101, n. S1, p. 1-45, 2009.

CAMINI, F. C. *Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus Caraparu*, 2014.

CARVALHO, W. A. *Mecanismo de ação das drogas antiinflamatórias não-esteróides: I- Ações farmacológicas das prostaglandinas leucotrienos*. *Folha méd*, p. 37-44, 1990.

CASTRUCCI, G., FERRARI, M., OSBURN, B. I., FRIGERI, F., BARRECA, F., TAGLIATI, S., CUTERI, V. *The use of a non-specific defence mechanism inducer in calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 18, n. 2, p. 85-91, 1994.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M., CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S., SOUZA, A. P., CORRÊA, R. X. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. *European Journal of Plant Pathology*, v. 139, p. 261-270, 2014.

CHARRADI, K., ELKAHOUI, S., KARKOUCH, I., LIMAM F., HASSINE, F. B., AOUBANI, E. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. *Neurochemical Research*, v. 37, n. 9, p. 2004-2013, 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: dia 17 de agosto de 2020.

DAVENPORT, J., BALCH, M., GALAM, L., GIRGIS, A., HALL, J., BLAGG, B. S., MATTS, R. L. High-Throughput Screen of Natural Product Libraries for Hsp90 Inhibitors. *Biology*, v. 3, n. 1, p. 101–138, 2014.

DEL PUERTO, M., OLIVERO, R., TEREVINTO, A., SAADOUN, A., CABRERA, M. C. Dietary organic and inorganic selenium on liver glycogen and lactate, pHu, color and drip loss of chicken pectoralis and gastrocnemius muscles. *Open Journal of Animal Sciences*, v. 6, p. 59-67, 2016.

DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K., KUMAR, S., SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnate* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, n. 2-3, p. 165-170, 2001.

DI PASQUALE, M. G. The essentials of essential fatty acids. *Journal of Dietary Supplements*, v.6, p. 143-161, 2009.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Journal of Physiology*, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DRUŻYŃSKA, B., STRZECHA, I., WOŁOSIAK, R., WOROBIJ, E. The contents of selected biologically active compounds in the extracts of the dried apricots and their antioxidant properties. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, v. 6, p. 77-87, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Maracujá Prospecção de demandas para pesquisa, extensão rural e políticas públicas baseadas na adoção e no impacto de tecnologias, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/ExpedicaoSafraVolume2versaofinal.pdf> . Acesso em: 16 de abril de 2020.

FEDER, M. E., HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, v. 61, p. 243-82, 1999.

FERRARI, R.A.P., COLUSSI, F., AYUB, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, p. 101-102, 2004.

FERREIRA A.L.A, MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 1-16, 1997.

FIGUEIREDO, L. P., VALENTE, W. A., DIAS, M. V., BORGES, S. V., PEREIRA, P. A. P., PEREIRA, A. G. T., CLEMENTE, P. R. Efeito da adição de suco de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. *Food Science and Technology*, v. 29, p. 840-846, 2009.

FINKEL T., HOLBROOK N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A., SIKORSKA, E., KHMELINSKII, I., SIKORSKI, M. Tocopherol content in edible plant oils. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, v. 57, p. 157-161, 2007.

GOSMANN, G., PROVENSÍ, G., COMUNELLO, L.N., RATES, S. M. K. Compisição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). Revista Brasileira de Biociências, v. 9, n. S1, p. 88-99, 2011.

GRASHORN, M.A. Functionality of Poultry Meat. Journal of Applied Poultry Research, v. 16, p. 99-106, 2011.

HAFEEZ, A., MÄNNER, K., SCHIEDER, C., ZENTEK, J. Effect of supplementation of phytogenic feed additives (powdered vs. encapsulated) on performance and nutrient digestibility in broiler chickens. Poultry Science, v. 95, n. 3, p. 622-629, 2015.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA, 2015.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. Annual Review of Nutrition, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B., CROSS, C.E., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, v. 55, p. 481-504, 2000.

HOSSEINI, S. M., FARHANGFAR, H., NOURMOHAMMADI, R. Effects of a blend of essential oils and overcrowding stress on the growth performance, meat quality and heat shock protein gene expression of broilers. British poultry science, v. 59, n. 1, p. 92-99, 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acesso em: 28 de março, 2019.

JASTREBSKI, S. F., LAMONT, S. J., SCHMIDT, C. J. Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis. Plos One, v. 12, p. 1-15, 2017.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., & DONOGHUE, M. J. Plant systematics: a phylogenetic approach. Ecologia Mediterranea, v. 25, n. 2, p. 215, 1999.

KAMAL-ELDIN A., APPELQVIST L.-A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids, v. 19, p. 671-701, 1996.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. Animals, v. 3, n. 2, p. 356-369, 2013.

LEONEL, S., LEONEL, M., DUARTE-FILHO, J. Principais produtos e subprodutos obtidos do maracujazeiro. Informe Agropecuário, v.21, p.86-88, 2000.

MAINI, S., RASTOGI, S. K., KORDE, J. P., MADAN, A. K., SHUKLA, S. K. Evaluation of oxidative stress and its amelioration through certain antioxidants in Broilers during summer. The Journal of Poultry Science, v. 44, p. 339-347, 2007.

MALACRIDA, C.R., JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 55, p. 127-134, 2012.

MARTIN, C. A., ALMEIDA, V. V., RUIZI, M. R., VISENTAINER, J. E. L., MATSHUSHITA, M., SOUZA, N. E., VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. Revista Nutrição, v. 19, p. 761-770, 2006.

MORRISSEY, P. A., SHEEHY, P. J. A., GALVIN, K., KERRY, J. P., BUCKLEY, D. J. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, v. 49, n. 1, p. S73-S86, 1998.

MOSTL, E., PALME, R. Hormones as indicators of stress. *Domest Animal Endocrinol*, v. 23, p. 67-74, 2002.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 5, p. 1523-1542, 2006.

NYANZI, S. A., CARSTENSEN, B., SCHWACK W. A comparative study of fatty acid profiles of Passiflora seed oils from Uganda. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 82, p. 41-44, 2005.

OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, Disponível em: <http://www.fao.org/publications/oecd-fao-agricultural-outlook/2020-2029/en/>. Acesso em: 09 de setembro, 2020.

OLIVEIRA, E.M.S., REGIS, S.A.L., DE RESENDE, E. D. Caracterização dos resíduos da polpa do maracujá-amarelo. *Ciência Rural*, v. 41, p. 725-730, 2011.

OLIVEIRA, L. F. D., NASCIMENTO, M. R. F., BORGES, S. V., RIBEIRO, P. C. D. N., RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 259-262, 2002.

PAGLIARONE, A. C., SFORCIN, J. M. Estresse: revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico. *Biosaúde*, v. 11, n. 1, p. 57-90, 2016.

PANDEY, K. B., RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PARMENTIER, H.K., NIEUWLAND, M.G.B., BARWEGEN, M.B., KWAKKEL, R.P. & SCHRAMA, J.W. Dietary unsaturated fatty acids affect antibody responses and growth of chickens divergently selected for humoral responses to sheep red blood cells. *Poultry Science*, v. 76, p. 1164–1171, 1997.

PEREIRA, A.D., CORRÊA, R.X., OLIVEIRA, A.C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of “sommus” passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): implications for conservation and pre-breeding. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 59, p. 12-21, 2015.

PICKERING, A. D. The concept of biological stress. In: — *Stress and fish*. New York: Academic Press, p. 225, 1981.

PINELI, L. L., RODRIGUES, J. S., COSTA, A. M., LIMA, H. C., CHIARELLO, M. D., MELO, L. Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild passiflora from Brazilian savannah: potential as functional beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 7, p. 1500-1506, 2015.

PIOMBO, G., BAROUH, N., BAREA, B., BOULANGER, R., BRAT, P., PINA, M., & VILLENEUVE, P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora eulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, v. 13, p. 195-199, 2006.

PLACHA, I., TAKACOVA, J., RYZNER, M., COBANOVA, K., LAUKOVA, A., STROMPFOVA, V., VENGLOVSKA, K., FAIX, S. Effect of thyme essential oil and selenium on intestine integrity and antioxidant status of broilers. *British Poultry Science*, v. 55, n. 1, p. 105-114, 2014.

PRASAD, J. Pectina and oil from passion fruit waste. *Fiji Agricultural Journal*, v. 42, p. 45-48, 1980.

- RAMALHO, V. C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006.
- RODRIGO R, GUICHARD C, CHARLES R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundamental & clinical pharmacology*, v. 21, n. 2, p. 111-127, 2007.
- RUDNICKI, M., OLIVEIRA, M. R., PEREIRA, T. V., REGINATTO, F. H., DALPIZZOL, F., MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007.
- SARAVANAN, S., PARIMELAZHAGAN, T. *In vitro* antioxidante, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. Fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*, v. 3, n. 2, p. 56-64, 2014.
- SAS INSTITUTE INC. Statistical analysis system user's guide. Version 9.3. ed. Cary: SAS Institute, USA, 2008.
- SHAMI, N.J.I.E., MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.
- SIJBEN, J.W.C., DE GROOT H., NIEUWLAND M.G.B., SCHRAMA J.W., PARMENTIER H.K. Dietary linoleic acid divergently affects immune responsiveness of growing layer hens. *Poultry Science*, v. 79, n. 8, p. 1106-1115, 2000.
- SILVA, A.C., JORGE, N. Bioactive compounds of oils extracted from fruits seeds obtained from agroindustrial waste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 119, p. 1-5, 2017.
- SILVA, J. K., CAZARIN, C. B. B., BATISTA, A. G., MARÓSTICA, M. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) by product intake in antioxidante status of Wistar rats tissues. *Food Science and Technology*, v. 59, n. 2, p. 1213-1219, 2014.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.
- SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v. 11, p. S163-S173, 2002.
- SMITH, I.K., VIERHGELLER, T.L., THRONE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenate using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid. *Analytical Biochemistry*, v. 175, p. 408-413, 1988.
- SONG, J., XIAO, K., KE, Y. L., JIAO, L. F., HU, C. H., DIAO, Q. Y., SHI B., ZOU, X. T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry science*, v. 93, n. 3, p. 581-588, 2014.
- TANG, X., MENG, Q., GAO, J., ZHANG, S., ZHANG, H., ZHANG, M. Label-free quantitative analysis of changes in broiler liver proteins under heat stress using SWATH-MS technology. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2015.
- TOGASHI, C.K., FONSECA, J.B., SOARES, R.T.R.N., GASPAR, A., DETMANN, E., OLIVEIRA, R.A. Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 6, p. 2063-2068, 2007.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VATTEN, D. A., SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of food chemistry biochemistry*, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

VICUÑA, E. A., KUTTAPPAN, V. A., TELLEZ, G., HERNANDEZ-VELASCO, X., SEEBER-GALARZA, R., LATORRE, J. D., FAULKNER, O.B., WOLFENDEN, A.D., HARGIS, B.M., BIELKE, L. R.. Dose titration of FITC-D for optimal measurement of enteric inflammation in broiler chicks. *Poultry Science*, v. 94, p. 1353-1359, 2015.

XU, Y., LAI, X., LI, Z., ZHANG, X., LUO, Q. Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. *Poultry Science*, v. 97, n. 11, p. 4073–4082, 2018.

YEH, C., YEN, G. Induction of hepatic antioxidante enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *Journal of Nutrition*, v.136, n. 1, p. 11-15, 2006.

YEHUDA, S., RABINOVITZ, S., CARASSO, R.L., MOSTOFISKY, DI. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiology of aging*, v. 23, n. 5, p. 843-853, 2002.

YOUDIM, M.B., GASSEN, M., GROSS, A., MANDEL, S., GRÜNBLATT, E. 2000. Iron chelating, antioxidant and cytoprotective properties of dopamine receptor agonist; apomorphine. In: *Advances in Research on Neurodegeneration*. Springer, Vienna, p. 83-96, 2000.

ZENG, T., JIANG, X., LI, J., WANG, D., LI, G., LU, L., WANG, G. Comparative Proteomic Analysis of the Hepatic Response to Heat Stress in Muscovy and Pekin Ducks: Insight into Thermal Tolerance Related to Energy Metabolism. *Plos One*, v. 8, n. 10, 2013.

## CAPÍTULO II

10 Óleo de Semente de Maracujá potencializa resposta

11 imunológica em frangos de corte

12 Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos

13 Santos, Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel,

14 Cássio Yutto Oura, Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori

15 Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal –

16 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu,

17 São Paulo, Brasil. Autor correspondente: [ferkaiserlima@gmail.com](mailto:ferkaiserlima@gmail.com)

18

19 Óleo de Semente de Maracujá potencializa resposta imunológica em frangos  
20 de corte

21 Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos Santos,  
22 Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel, Cássio Yutto Oura,  
23 Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori

24 Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina  
25 Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

26 Resumo

27 Em função da constante procura por novos aditivos que assegurem a crescente  
28 produção de carne de frangos e da busca pelos consumidores por carnes com  
29 características mais saudáveis e sustentáveis, o objetivo desse trabalho foi  
30 estudar o efeito da suplementação de óleo da semente de maracujá (OSM) para  
31 avaliação de seu potencial na imunidade, respostas imunes e qualidade de carne  
32 de frangos de corte. Para isso foram utilizados 450 pintainhos de 1 dia de idade,  
33 machos, da linhagem Cobb® 500, os quais foram alojados em gaiolas de arame  
34 galvanizado (0,4 x 0,5 x 0,6m) em duas câmaras climáticas, com 45 gaiolas cada.  
35 O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo  
36 duas temperaturas (termoneutra e estresse cíclico pelo calor) e cinco  
37 tratamentos: controle (sem inclusão de OSM) + quatro níveis de inclusão de  
38 OSM: 0,30; 0,50; 0,70; 0,90%) com nove repetições de cinco aves cada. A ração  
39 experimental foi desprovida de antibióticos como melhorador de desempenho,  
40 porém acrescida de anticoccidiano em todos os tratamentos. Os dados foram  
41 analisados utilizando-se análise de variância com auxílio do SAS 9.3 (SAS  
42 *Institute*, 2008) sendo significativo ( $P < 0,05$ ). Houve efeito significativo da  
43 temperatura para o peso vivo ao abate e peso de cortes comerciais, estes foram  
44 maiores para os frangos de corte criados em termoneutralidade em comparação  
45 aos submetidos ao estresse por calor, já o peso da gordura abdominal foi menor  
46 para frangos criados em estresse por calor. Houve diferença significativa para  
47 fatores isolados, em relação aos níveis de OSM para porcentagem de perda de  
48 água por cocção, no qual o nível de inclusão de OSM de 0% apresentou menor  
49 porcentagem de perda de água em relação ao tratamento de 0,7%. Frangos de  
50 corte criados em estresse por calor apresentaram menores valores de  $a^*$  na

51 musculatura do peito do que os frangos criados em ambiente termoneutro. Em  
52 relação a análise proteômica (2D-PAGE) do plasma sanguíneo para resultados  
53 voltados a qualidade de carne, a proteína *Actin alpha skeletal muscle*,  
54 apresentou diferença significativa nos tratamentos com inclusão de 0,9% de  
55 OSM em ambas as temperaturas (estresse por calor e termoneutra) e,  
56 *Neuropilin-1*, no tratamento termoneutro com 0% de inclusão de OSM. Com 21  
57 dias de idade foi observado uma interação significativa para titulação de  
58 anticorpos, sendo que frangos criados em ambiente de estresse que receberam  
59 o nível de 0,90% de OSM, apresentaram maior valor de titulação vacinal. Aos 28  
60 dias de idade, novamente os animais que receberam 0,90% de inclusão de OSM  
61 e, independente do ambiente de criação, apresentaram maiores valores de  
62 títulos de anticorpos. Na análise proteômica do plasma sanguíneo (2D-PAGE)  
63 foram encontradas diversas proteínas que estão relacionadas com o sistema  
64 imunológico dos frangos de corte: *Complement factor B-like protease*  
65 *(Fragment)*; *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; *Mannose-binding*  
66 *protein*; *Zinc finger protein ubi-d4*; *Ig lambda chain C region*; *Ig lambda chain V-*  
67 *1 region*; *Apolipoprotein A-I*. A análise proteômica também apresentou  
68 resultados referentes a manutenção do epitélio gastrointestinal, com a expressão  
69 diferencial de *Retinol-binding protein 4*, e, *Homeodomain-only protein*.

70 Palavras-chave: avicultura, resposta imunológica, produção de anticorpos.

## Passion fruit seed oil boosts immune response in broilers

71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95

### Abstract

Due to the constant search for new additives that ensure the growing production of chicken meat and the search by consumers for meats with healthier and more sustainable characteristics, the objective of this work was to study the effect of supplementation with passion fruit seed oil (OSM) to assess its potential in immunity, immune responses and meat quality of broiler chickens. For this, 450 1-day-old male chicks of the Cobb® 500 strain were used, which were housed in galvanized wire cages (0.4 x 0.5 x 0.6 m) in two climatic chambers, with 45 cages each. The design was completely randomized, in a 2 x 5 factorial scheme, with two temperatures (thermoneutral and cyclic heat stress) and five treatments: control (without inclusion of OSM) + four levels of inclusion of OSM: 0.30; 0.50; 0.70; 0.90%) with nine replicates of five birds each. The experimental food was devoid of antibiotics as a performance enhancer, but added anticoccidial in all treatments. Data were analyzed using analysis of variance with the aid of SAS 9.3 (SAS Institute, 2008) being significant ( $P < 0.05$ ). There was a significant effect of temperature for live weight at slaughter and weight of commercial cuts, these were greater for broilers reared in thermoneutrality compared to those subjected to heat stress, whereas the weight of abdominal fat was lower for chickens reared under stress by heat. There was a significant difference for isolated factors, in relation to OSM levels for percentage of water loss per cooking, in which the OSM inclusion level of 0% presented a lower percentage of water loss in relation to the treatment of 0.7%. Broilers reared under heat stress had lower  $a^*$  values in the breast musculature than broilers reared in a thermoneutral environment. Regarding proteomic analysis (2D-PAGE) of blood plasma for meat quality

96 results, the protein Actin alpha skeletal muscle, showed a significant difference  
97 in treatments with inclusion of 0.9% OSM at both temperatures (stress by heat  
98 and thermoneutral) and, Neuropilin-1, in thermoneutral treatment with 0%  
99 inclusion of OSM. At 21 days of age, a significant interaction for antibody titration  
100 was observed, and broilers reared in a stress environment that received the level  
101 of 0.90% of OSM had a higher value of vaccine titration. At 28 days of age, again  
102 the animals that received 0.90% inclusion of OSM and, regardless of the rearing  
103 environment, had higher antibody titers. In the proteomic analysis of blood  
104 plasma (2D-PAGE) several proteins that are related to the immune system of  
105 broiler chickens were found: Complement factor B-like protease (Fragment);  
106 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Mannose-binding protein; Zinc  
107 finger protein ubi-d4; Ig lambda chain C region; Ig lambda chain V-1 region;  
108 Apolipoprotein A-I. The proteomic analysis also showed results regarding the  
109 maintenance of the gastrointestinal epithelium, with the differential expression of  
110 Retinol-binding protein 4 and, Homeodomain-only protein.  
111 Keywords: poultry, immune response, antibody production.

## 112 1. Introdução

113 O sistema imunológico realiza suas funções através da geração de  
114 mecanismos de defesa, que variam desde barreiras mecânicas, tais como  
115 aquelas desempenhadas pela pele e, também a barreira celular, que possui  
116 células com receptores que tem a capacidade de reconhecer antígenos, além de  
117 gerar memória imunológica por alguns tipos celulares (GENNERY e CANT,  
118 2001). Os linfócitos T são responsáveis pela imunidade mediada por células  
119 (CALDER e KEW, 2002). Estas células podem se tornar células T citotóxicas  
120 (CD8+) ou células T auxiliares (CD4+), estas últimas atuam principalmente na  
121 secreção de citocinas. Os linfócitos T auxiliares dividem-se, ainda em células T  
122 *helpertipo* 1 (Th1) e, células T *helpertipo* 2 (Th2). De maneira resumida, células  
123 Th1 auxiliam na imunidade celular por estimular os macrófagos e células T  
124 citotóxicas, enquanto células Th2 estimulam as células B a produzirem  
125 anticorpos (DELVES e ROITT, 2000).

126 Os ácidos linoleico (n-6) e linolênico (n-3) possuem efeitos sobre a  
127 resposta imunológica e inflamatória. O balanço na ingestão destes ácidos graxos  
128 poliinsaturados (PUFAs) e, sua incorporação na membrana das células  
129 imunológicas, é importante para determinar a severidade do processo  
130 inflamatório (ANDRADE e CARMO, 2006). Os PUFAs n-3 possuem efeitos  
131 supressores, como inibição da proliferação de linfócitos, produção de anticorpos  
132 e citocinas, expressão de moléculas de adesão e ativação das células *Natural*  
133 *Killers* (NK). No entanto, os PUFAs n-6 possuem ambos os efeitos, tanto os  
134 efeitos inibitórios dos PUFAs n-3, quanto estimulante da resposta imune  
135 (CALDER et al., 2009).

136 Os efeitos dos PUFAs na dieta, como o ácido linoleico, sobre as respostas  
137 imunológicas das aves foram atribuídos à natureza diferente dos antígenos, por  
138 exemplo, os antígenos indutores da resposta imune Th1 ou Th2 (SIJBEN *et al.*,  
139 2000), aos níveis de PUFAs na dieta (FRIEDMAN e SKLAN, 1995;  
140 PARMENTIER *et al.*, 1997) e às interações entre os níveis alimentares de PUFAs  
141 n-6 e n-3 (SIJBEN *et al.*, 2001). Sijben *et al.* (2000) verificaram que rações  
142 contendo óleo de girassol rico em ácido linoleico (C18:2 n-6) melhoraram as  
143 respostas de anticorpos Th2, mas diminuíram as respostas de anticorpos Th1.

144 O uso de ácidos graxos poliinsaturados na dieta demonstrou  
145 repetidamente exercer modulação diferencial do sistema imunológico em aves e  
146 mamíferos (PARMENTIER *et al.*, 1997). Sua inclusão na dieta tem efeitos  
147 aprimoradores nas respostas de anticorpos e nas respostas inflamatórias, tanto  
148 em mamíferos (KINSELLA *et al.*, 1990; HARBIGE *et al.*, 1995) quanto em aves  
149 (PARMENTIER *et al.*, 1997; SIJBEN *et al.*, 2000).

150 Por exercer influência na imunidade das aves, os PUFAs podem ser  
151 utilizados como estratégias nutricionais para contornar prováveis problemas na  
152 sua criação. Muitas vezes esses animais são criados em ambientes que  
153 desafiam seu sistema imunológico (CASTRUCCI *et al.*, 1994) como por exemplo,  
154 a presença de micotoxinas, ou doenças infecciosas como a doença de Gumboro,  
155 anemia infecciosa das galinhas, doença de Marek, entre outras. Além disso, uma  
156 nutrição inadequada também é um importante fator para a redução da  
157 capacidade imunológica das aves (TIZARD, 2002). O estresse gerado por  
158 condições extremas de temperatura e de densidade elevada também pode  
159 influenciar negativamente o sistema imunológico. Apesar do Brasil ser  
160 considerado referência na produção de frangos de corte, ainda possui problemas

161 básicos, como o estresse por calor que resulta em queda de produtividade,  
162 menor consumo de ração e maior mortalidade (DE ABREU e ABREU, 2000).

163 O período de duração do estresse e sua magnitude podem ocasionar altos  
164 níveis de prostração e mortes ao longo desse processo (MOURA, 2001). As  
165 condições de estresse por calor afetam também os parâmetros fisiológicos e  
166 imunológicos em frangos de corte (JASTREBSKI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018).  
167 Além disso, é capaz de suprimir a imunidade celular e humoral, com  
168 consequente falha no desenvolvimento da resposta de aves vacinadas e  
169 involução de órgãos do sistema imune (SHINI *et al.*, 2008, 2010; SHINI e  
170 KAISER, 2009).

171 As plantas e especiarias possuem propriedades nutricionais funcionais  
172 podendo ser usadas na alimentação das aves, pois tem efeitos positivos sobre a  
173 produção e a saúde (PERIĆ *et al.*, 2009). Prasad (1980) identificou que as  
174 sementes do maracujá contêm cerca de 23% de óleo com características  
175 semelhantes às do óleo de gergelim, soja e outros óleos vegetais.

176 Além dos ácidos graxos o óleo das sementes de maracujá é constituído  
177 por vitamina E, esteróis, bem como compostos fenólicos e pigmentos como os  
178 carotenoides (NYANZI *et al.*, 2005; PIOMBO *et al.*, 2006; GIUFFRÉ, 2007; LIU  
179 *et al.*, 2008; MALACRIDA e JORGE, 2012). O óleo da semente do maracujá é  
180 considerado boa fonte de ácidos graxos essenciais. O ácido linoleico (n-6) é um  
181 dos principais ácidos graxos do óleo da semente de maracujá (cerca de 55-66%),  
182 seguido pelo ácido oleico (18-20%) e pelo ácido palmítico (10-14%). O ácido  
183 olinolênico (n-3) é encontrado em menor quantidade (0,81%) (LEONEL *et al.*,  
184 2000).

185 Silva e Jorge (2017) pesquisaram a composição das plantas do gênero  
186 *Passiflora* e encontraram a presença de compostos bioativos no óleo das  
187 sementes, tais como: tocoferol, carotenóides, fitoesteróis e compostos fenólicos,  
188 possuindo, também, importantes ácidos graxos que participam do metabolismo  
189 (LEONEL *et al.*, 2000).

190 Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de  
191 níveis crescentes de óleo da semente de maracujá (OSM) na dieta de frangos  
192 de corte criados em estresse por calor e ambiente termoneutro, sobre o  
193 rendimento de carcaça, qualidade de carne, titulação de anticorpos em resposta  
194 à vacinação, parâmetros hematológicos, permeabilidade intestinal e análise do  
195 proteoma plasmático (2D-PAGE) de frangos de corte. Sob a hipótese de que os  
196 compostos bioativos, principalmente ácido linoleico (n-6) e, os tocoferóis  
197 presentes no óleo da semente de maracujá sejam capazes de melhorar/atenuar  
198 os danos causados pelo estresse por calor, assim como proporcionar uma  
199 melhora no sistema imunológico.

## 200 1. Material e Métodos

201 O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
202 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, no Laboratório de  
203 Nutrição de Aves. Todos os procedimentos experimentais utilizados foram  
204 aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, sob o  
205 protocolo 0106/2019, estando de acordo com os princípios éticos na  
206 experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação  
207 Animal (COBEA).

208 Foram utilizados 450 pintainhos de 1 dia de idade, machos, da linhagem  
209 Cobb® 500, alojados em gaiolas de arame galvanizado (0,4 x 0,5 x 0,6m) com

210 comedouros tipo calha dispostos frontalmente a gaiola e bebedouros tipo nipple,  
211 alojados em duas câmaras climáticas contendo 45 gaiolas cada: termoneutra  
212 que segue as recomendações de temperatura da linhagem e, outra com estresse  
213 cíclico por calor, na qual os frangos foram criados em estresse cíclico por calor  
214 durante 12 horas por dia seguindo as temperaturas detalhadas na Tabela 1.

215 Tabela 1 – Temperaturas utilizadas nas câmaras termoneutra e estresse térmico.

CÂMARA TERMONEUTRA		CÂMARA ESTRESSE TÉRMICO	
Idade das aves (dias)	Média Temperatura (° C)	Idade das aves (dias)	Média Temperatura (° C)
1-7	31,20	1-7	35,26
8-21	28,29	8-21	33,08
22-35	25,55	22-35	31,54
36-42	21,12	36-42	30,01

216 Todas as aves foram vacinadas no incubatório contra Gumboro, Marek e  
217 Bouda Aviária. A água e ração foram fornecidas à vontade e o programa de luz  
218 seguiu as orientações do manual da linhagem de frangos selecionada. O  
219 delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, duas  
220 temperaturas (termoneutra e estresse cíclico pelo calor), e cinco dietas,  
221 totalizando 10 tratamentos de cinco aves cada. As dietas foram: Controle  
222 negativo sem óleo da semente de maracujá: 0% OSM; 0,30% de inclusão de  
223 óleo da semente de maracujá: 0,3% OSM; 0,50% de inclusão de óleo da  
224 semente de maracujá: 0,5% OSM; 0,70% de inclusão de óleo da semente de  
225 maracujá: 0,7% OSM; 0,90% de inclusão de óleo da semente de maracujá: 0,9%  
226 OSM.

227 A ração experimental foi desprovida de antibióticos como melhorador de  
228 desempenho, e foi utilizado anticoccidiano em todos os tratamentos. O OSM foi

229 adicionado nas dietas em substituição ao óleo de soja, considerando-se a  
230 correção pelo valor da EMA que no óleo de soja é 8.790 kcal (ROSTAGNO *et*  
231 *al.*, 2017) e no OSM é 9.378 kcal/kg (ZANETTI, 2018).

232 A ração foi formulada a base de milho, farelo de soja e farinha de vísceras,  
233 segundo as recomendações de Rostagno *et al.* (2017) para frangos de corte  
234 machos de desempenho médio (Tabela 2). O programa de alimentação foi  
235 dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento  
236 (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias).

237 Foi realizado a aferição da temperatura e umidade relativa do ar por meio  
238 de conjunto de termômetros de máxima e mínima, bulbo seco e bulbo úmido e  
239 de globo negro colocados na altura das aves e, por meio de sensores eletrônicos  
240 tipo HOBOS instalados em cada câmara.

#### 241 2.1 Avaliação do rendimento de carcaça e de cortes comerciais

242 Previamente, foram identificadas 10 aves/tratamento e submetidas ao  
243 jejum alimentar por seis horas, pesadas individualmente, insensibilizadas por  
244 atordoamento com eletricidade e abatidas por sangria. Após depena,  
245 evisceração e remoção da cabeça+pescoço e pés, foram obtidos os pesos das  
246 carcaças, dos cortes e da gordura abdominal com o auxílio de balança eletrônica.

247 Para o cálculo de rendimento de carcaça, foi considerado o peso da  
248 carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça+pescoço e gordura abdominal,  
249 em relação ao peso vivo obtido antes do abate das aves.

250 Para o rendimento dos cortes, foi considerado o rendimento do peito  
251 inteiro com pele e ossos, das pernas (coxa e sobrecoxa) e asas, calculado em  
252 relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal presente ao redor

253 da cloaca, da bolsa cloacal e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada,  
254 pesada e calculada em relação ao peso vivo da ave antes do abate.

## 255 2.2 Avaliação da qualidade da carne

256 Para as análises de qualidade e propriedades funcionais da carne foram  
257 utilizados 10 peitos/tratamento, realizadas 24 horas *post-mortem* no Laboratório  
258 de Qualidade de Carne do Departamento de Economia, Sociologia e Tecnologia  
259 da FCA, UNESP, Campus de Botucatu.

260 Os peitos foram posicionados em decúbito dorsal e o pH foi mensurado  
261 na porção cranial do músculo *Pectoralis major* direito, por meio do eletrodo de  
262 inserção (Hanna, HI 8314) com sistema de identificação digital. A coloração da  
263 carne foi determinada utilizando-se colorímetro Konica Minolta (CR-400),  
264 seguindo o sistema CIELAB, por meio de leituras de reflectância de luz em três  
265 dimensões: L\* (luminosidade), a\* (teor de vermelho) e b\* (teor de amarelo),  
266 mediante leitura em três pontos distintos do músculo *Pectoralis major* (HONIKEL,  
267 1998).

268 A perda de água por pressão foi realizada utilizando cerca de dois gramas  
269 de carne, com espessura semelhante (0,5cm) da porção cranial do músculo  
270 *Pectoralis major* esquerdo (filé do peito). As amostras foram posicionadas entre  
271 dois papéis filtro e pressionadas por duas placas de acrílico com peso de 10 kg  
272 por cinco minutos. Após a prensagem as amostras foram novamente pesadas  
273 para obtenção do percentual de perda de água por pressão (BRIDI e SILVA,  
274 2009).

275 Para a análise de perda de água por cocção, o músculo *Pectoralis major*  
276 esquerdo foram submetidos a cocção dentro de sacos de polietileno utilizando-se  
277 se banho-maria por 60 minutos a 80°C. Após a cocção as amostras foram

278 resfriadas a temperatura ambiente para posterior pesagem e obtenção do  
279 percentual de perda de água por cocção. De acordo com a metodologia  
280 modificada de Silva Sobrinho (1999).

281 Os filés de peito utilizados para avaliação da textura da carne foram os  
282 mesmos da determinação da perda de peso por cocção. Foi utilizado o  
283 texturômetro TAXT *plus* (*Stable Micro Systems*), equipado com dispositivo *Razor*  
284 *Blade*. Sendo avaliados a energia (N/mm) e a força de cisalhamento (N) segundo  
285 preconizado por Cavitt *et al.* (2005).

### 286 2.3 Titulação das imunoglobulinas após vacinação

287 Aos 10 dias, as aves foram vacinadas individualmente, por via ocular,  
288 contra o vírus da Doença de *New Castle*. Aos 21, 28 e 35 dias de idade, foi  
289 coletado sangue por meio de punção da veia jugular da mesma ave, para avaliar  
290 os títulos séricos de anticorpos contra o vírus da Doença de *New Castle* (*New-*  
291 *Vacin*®, cepa La Sota). As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos  
292 de ensaio, deixadas em descanso para formação de coágulo e, posteriormente  
293 centrifugadas para obtenção do soro que foram acondicionados em microtubos  
294 de 1,5 mL. A mensuração da produção de anticorpos foi avaliada por meio do  
295 ensaio imunoenzimático – Kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)  
296 produzido pela empresa Idexx Laboratórios e utilizando metodologia descrita por  
297 Swayne (1998).

### 298 2.4 Avaliação hematológica

299 As avaliações hematológicas foram realizadas aos 30 dias de idade das  
300 aves, a partir de amostras de sangue obtidas por punção da veia jugular direita.  
301 Para a realização das análises coletou-se aproximadamente 3 mL de sangue de  
302 cada ave em tubo contendo anticoagulante EDTA. Foi determinada a

303 porcentagem de hematócrito, pelo método do microhematócrito (Campbell,  
304 1995). Após a centrifugação e leitura do hematócrito, o plasma foi utilizado para  
305 a avaliação das proteínas totais utilizando-se o método de refratometria.  
306 Também foi realizada a contagem de eritrócitos em hemocítômetro de Neubauer  
307 com diluição em azul de toluidina a 0,01%.

308 Além disso, foi realizado a contagem percentual diferenciada de  
309 leucócitos por microscopia óptica, seguindo os critérios descritos por Lucas e  
310 Jamroz (1961), em esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico  
311 de Rosenfeld. Na contagem são diferenciados os linfócitos, heterófilos,  
312 eosinófilos, monócitos e basófilos, observando-se o total de 100 células.

313 A partir dos dados obtidos no hemograma, utilizando fórmulas  
314 padronizadas de Wintrobe (1934), foram calculados os índices de hemoglobina  
315 corpuscular média (HCM), expressa em pictogramas (pg) e, volume corpuscular  
316 médio (VCM), expresso em fentolitros (fL).

## 317 2.5 Ensaio de funcionalidade intestinal

318 Aos 21 dias de idade, para avaliar a permeabilidade da mucosa intestinal,  
319 foi inoculado isotiocianato de dextrano de fluoresceína (FITC-d) 2,2 mg/ave por  
320 via oral diretamente no esôfago/inglúvio em uma ave/repetição (9  
321 aves/tratamento) sem os animais ficarem de jejum e, após 2 horas da  
322 administração oral, as aves foram sacrificadas e o sangue colhido sob proteção  
323 da luz, para determinar a concentração de FITC-d/mL no soro (Vicuña *et al.*,  
324 2015).

325 Para detecção de FITC-d (3-5 KDa; Sigma Aldrich), o soro foi extraído  
326 após aproximadamente três horas da coleta e mantido refrigerado até a análise,  
327 sempre sendo protegido do contato com a luz. Os níveis séricos de FITC-d foram

328 medidos com comprimento de onda de excitação 485 nm e de emissão 528 nm,  
329 em uma leitora de microplacas por multidetecção, utilizando o equipamento  
330 *GloMax*® *Discover Microplate Reader* (Promega Corporation, Madison, USA)  
331 para sua leitura. A fluorescência medida foi então comparada com uma curva  
332 padrão com concentrações FITC-d conhecidas (Vicuña *et al.*, 2015).

Tabela 2- Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias de idade), inicial (8 a 21 dias de idade), crescimento (22 a 33 dias de idade) e final (34 a 42 dias de idade).

INGREDIENTES	Pré-Inicial					Inicial				
	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
Milho	54,52	54,55	54,58	54,60	54,63	56,26	56,30	56,32	56,34	56,37
Farelo de soja, 46%	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	34,00	34,00	34,00	34,00	34,00
Óleo soja	1,057	0,725	0,503	0,282	0,060	1,899	1,567	1,346	1,124	0,903
Farinha de vísceras	4,766	4,761	4,757	4,754	4,751	4,487	4,482	4,479	4,476	4,472
Fosfato bicálcico	1,263	1,263	1,264	1,264	1,265	1,080	1,081	1,081	1,082	1,082
Calcário	0,843	0,843	0,843	0,844	0,844	0,765	0,765	0,765	0,765	0,765
Bicarbonato de Sódio	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035
OSM <sup>1</sup>	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,367	0,367	0,367	0,367	0,366	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
L-Lisina HCL 99%	0,227	0,227	0,227	0,227	0,227	0,233	0,233	0,233	0,233	0,233
L-Treonina 98,5%	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092
Anticoccidiano <sup>2</sup>	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095
Premix Vit. <sup>3</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. <sup>4</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição nutricional calculada										
EM (kcal/kg)	2975	2975	2975	2975	2975	3050	3050	3050	3050	3050
Proteína Bruta (%)	24,27	24,27	24,27	24,27	24,27	23,31	23,31	23,31	23,31	23,31
Cálcio (%)	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,878	0,878	0,878	0,878	0,878
Fósforo disp. (%)	0,463	0,463	0,463	0,463	0,463	0,419	0,419	0,419	0,419	0,419
Potássio (%)	0,597	0,597	0,597	0,597	0,597	0,598	0,598	0,598	0,598	0,598
Sódio (%)	0,225	0,225	0,225	0,225	0,225	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218
Cloro (%)	0,202	0,202	0,202	0,202	0,202	0,194	0,194	0,194	0,194	0,194
Lisina dig. (%)	1,441	1,441	1,441	1,441	1,441	1,384	1,384	1,384	1,384	1,384
Metionina (%)	0,591	0,591	0,591	0,591	0,591	0,567	0,567	0,567	0,567	0,567
Met+Cys dig. (%)	1,066	1,066	1,066	1,066	1,066	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024
Triptofano (%)	0,259	0,259	0,259	0,259	0,259	0,249	0,249	0,249	0,249	0,249
Treonina (%)	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,955	0,955	0,955	0,955	0,955

INGREDIENTES	Crescimento					Final				
	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM	0% OSM	0,3% OSM	0,5% OSM	0,7% OSM	0,9% OSM
Milho	61,43	61,47	61,50	61,52	61,54	66,89	66,93	66,96	66,99	67,01
Farelo de soja, 46%	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	25,80	25,79	25,78	25,78	25,78
Óleo soja	2,973	2,640	2,419	2,198	1,976	2,916	2,583	2,360	2,138	1,916
Farinha de vísceras	2,273	2,268	2,265	2,261	2,258	1,462	1,461	1,461	1,460	1,460
Fosfato bicálcico	1,170	1,170	1,171	1,171	1,171	0,890	0,890	0,890	0,890	0,890
Calcário	0,678	0,678	0,678	0,678	0,678	0,660	0,660	0,661	0,661	0,661
Bicarbonato de Sódio	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
OSM <sup>1</sup>	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,314	0,314	0,314	0,314	0,314	0,275	0,275	0,275	0,275	0,275
L-Lisina HCL 99%	0,257	0,257	0,257	0,257	0,257	0,271	0,271	0,271	0,272	0,272
L-Treonina 98,5%	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091	0,082	0,082	0,082	0,082	0,082
Anticoccidiano <sup>2</sup>	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	-	-	-	-	-
Premix Vit. <sup>3</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. <sup>4</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Composição nutricional calculada

EM (kcal/kg)	3150	3150	3150	3150	3150	3200	3200	3200	3200	3200
Proteína Bruta (%)	20,58	20,58	20,58	20,58	20,58	18,57	18,57	18,57	18,57	18,57
Cálcio (%)	0,758	0,758	0,758	0,758	0,758	0,634	0,634	0,634	0,634	0,634
Fósforo disp. (%)	0,374	0,374	0,374	0,374	0,374	0,296	0,296	0,296	0,296	0,296
Potássio (%)	0,599	0,599	0,599	0,599	0,599	0,593	0,593	0,593	0,593	0,593
Sódio (%)	0,208	0,208	0,208	0,208	0,208	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197
Cloro (%)	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183	0,172	0,172	0,172	0,172	0,172
Lisina dig. (%)	1,239	1,239	1,239	1,239	1,239	1,118	1,118	1,118	1,118	1,118
Metionina (%)	0,508	0,508	0,508	0,508	0,508	0,458	0,458	0,458	0,458	0,458
Met+Cys dig. (%)	0,917	0,917	0,917	0,917	0,917	0,827	0,827	0,827	0,827	0,827
Triptofano (%)	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201
Treonina (%)	0,855	0,855	0,855	0,855	0,855	0,771	0,771	0,771	0,771	0,771

<sup>1</sup>OSM= Óleo da semente de maracujá; <sup>2</sup> Salinomicina (66ppm); <sup>3</sup>Premix vitamínico (níveis de garantia/kg de ração): Vitamina A (min) 10.000 U.I.; Vitamina D3 (min) 2.500 U.I.; Vitamina E (min) 17,5 U.I.; Vitamina K3 (min) 2 mg; Vitamina B1 (min) 1,5 mg; Vitamina B2 (min) 7,5 mg; Niacina (min) 25 mg; Ácido pantotênico 15 mg; Vitamina B6 (min) 2 mg; Ácido fólico (min) 0,5 mg; Biotina (min) 60 mcg; Vitamina B12 (min) 15 mcg; <sup>4</sup>Premix Mineral (níveis de garantia/kg de ração): Ferro (min) 30 mg; Cobre (min) 6 mg; Manganês (min) 70 mg; Zinco (min) 50 mg; Iodo (min) 1 mg; Selênio (min) 0,35 mg; Cobalto (min) 0,2 mg.

## 333 2.6 Análise proteômica do plasma de frangos

334 Alíquotas das amostras de plasma coletadas com 35 dias de idade das  
335 aves (9 animais/tratamento) foram utilizadas para estudo do proteoma  
336 (2D\_PAGE e ESI MS/MS), coletadas imediatamente ao abate, congeladas em  
337 nitrogênio líquido e transportadas para o laboratório de biologia molecular, onde  
338 foram mantidas em freezer a -80°C. Para a realização da análise foi realizado  
339 um *pool*/tratamento de cada grupo experimental. Para o processo de extração  
340 das proteínas das amostras de plasma foram utilizados 200 µl de plasma do *pool*  
341 de cada amostra, onde em microtubos de 2 ml foi adicionado 400 µL de acetona  
342 80% gelada, para precipitação das proteínas e remover os possíveis  
343 interferentes no processo eletroforético, tais como sais e surfactantes aniônicos  
344 e, após 1 h 30 min em geladeira o mesmo foi submetido à centrifugação a 10.000  
345 rpm, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* utilizado para  
346 quantificação de proteínas totais (VIEIRA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2017).

347 A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pelo  
348 método do Biureto (DOUMAS *et al.*, 1981) sendo que, um total de 50 µL de  
349 amostra ou padrão e 2,5 mL do reativo de Biureto foram misturados e levados a  
350 banho-maria a 32°C por 10 min. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as  
351 leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 545nm. Essa quantificação é  
352 realizada para calcular a massa de 375 µg de proteína a serem aplicadas em  
353 cada fita de eletroforese com volume fixo em 250 µL.

354 Eletroforese bidimensional: Todas as determinações de concentração de  
355 proteína total foram feitas antes das análises proteômicas em todos os grupos  
356 experimentais. Na 2D-PAGE, aproximadamente 375 µg de proteínas de cada  
357 *pellet* proteico foram aplicadas em fitas isoeletricas (IEF) de 13 cm contendo gel

358 pré-fabricado e anfólitos de gradiente de pH 3 a 10, a fita ficou em contato com  
359 a amostra aproximadamente 12 horas, em caixa de hidratação contendo óleo  
360 mineral para que não ocorra o ressecamento das fitas (BRAGA *et al.*, 2015).

361 Com o auxílio do equipamento Ettan IPGphor, as fitas que ficaram em  
362 contato com a amostra durante aproximadamente 12 horas, passaram pelo  
363 processo de focalização isoeletrica (1D ou primeira dimensão). Nesse processo,  
364 as proteínas foram separadas com base no seu ponto isoeletrico em função da  
365 passagem de corrente elétrica gerada pelo equipamento. O processo de  
366 focalização isoeletrica durou aproximadamente cinco horas e em seguida, as  
367 fitas foram reidratadas com tampão específico (ureia, SDS, glicerol, Tris-HCl,  
368 azul de bromofenol) em duas etapas: a primeira adicionando Dithiothreitol (DTT)  
369 a essa solução e na segunda substituindo o DTT por iodoacetamida (IAA) .  
370 Posteriormente, as fitas foram transferidas para gel de poliacrilamida (12,5%)  
371 para separação em segunda dimensão (2D). Nessa etapa as proteínas foram  
372 fracionadas no gel de poliacrilamida em função da sua massa molecular. Após a  
373 corrida eletroforética, as proteínas foram fixadas no gel por 40 minutos utilizando  
374 uma solução contendo ácido acético, etanol e água deionizada e coradas com  
375 *Coomassie Blue G-250* por 72 horas. Após esse passo, os géis foram lavados  
376 com água ultrapura para visualização dos *spots* proteicos (CANDIANO *et al.*,  
377 2004).

378 Os géis dos grupos experimentais, todos em triplicata, foram escaneados  
379 e as imagens analisadas por meio do *software Image Master Platinum v.7.0* para  
380 obtenção de parâmetros como número de *spots*, percentual de correlação  
381 (*matching*) entre os géis do mesmo tratamento, ponto isoeletrico e massa

382 molecular dos *spots* proteicos, bem como a expressão desses *spots* proteicos  
383 em diferentes tratamentos (LIMA *et al.*, 2010).

384       Espectrometria de massas: Os *spots* proteicos diferencialmente  
385 expressos entre tratamentos foram extraídos dos géis com auxílio de bisturi,  
386 recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e transferidos para  
387 microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) e submetidos às seguintes  
388 etapas: remoção do corante, redução e alquilação das proteínas e digestão  
389 tríptica utilizando solução de tripsina 10 ng mL<sup>-1</sup>.

390       Os segmentos de gel foram lavados por três vezes, em uma solução  
391 contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM  
392 por 30 minutos, pois os fragmentos de *spots* deveriam estar totalmente  
393 descorados. Em seguida, foram desidratados em ACN 100% por 10 minutos por  
394 duas vezes, deixando evaporar o resíduo remanescente em temperatura  
395 ambiente. Após esse período, os *spots* foram reduzidos com solução de DTT 20  
396 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 minutos a 56 °C, removido o líquido e  
397 substituído por IAA a 55 mM em AmBic 50 mM, incubados por 30 minutos no  
398 escuro, em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram lavados em  
399 AmBic 25 mM e desidratados em ACN 100% (SHEVCHENKO *et al.*, 2006).

400       A digestão tríptica foi feita com 15 µL de solução contendo 150 ng de  
401 tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, EUA) em AmBic 25 mM por  
402 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AmBic 25 mM e incubou-se a  
403 37 °C por 14 horas. Após 14 horas, a ação da tripsina foi interrompida pela adição  
404 de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v) e os  
405 peptídeos eluídos com duas lavagens com solução de eluição A (ACN 50% v/v  
406 e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B

407 (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%,  
408 a 45 °C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40  
409 KHz de frequência fixa e potência de 30W. A solução peptídica resultante foi  
410 concentrada a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) (SHEVCHENKO *et al.*,  
411 2006). Em seguida a amostra passou por um processo de limpeza utilizando  
412 colunas C18 ZipTip (Millipore) com resina (SHEVCHENKO *et al.*, 2006).

413 A identificação das proteínas de cada *spot* foi realizada em nanoACQUITY  
414 UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-  
415 TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi  
416 equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75  
417 mm x 150 mm; 1.8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel  
418 B (100% ACN + 0.1% ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de  
419 um gradiente linear de 7-85% de fase móvel B durante 20 min com fluxo de 0.35  
420 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo  
421 íon positivo, com resolução de pelo menos 20000 FWHM (full-width  
422 halfmaximum) e em modo de aquisição independente de dados (LC-MSE), com  
423 o tempo de aquisição de dados de 20 min por *spot*. Os dados foram coletados a  
424 uma energia de colisão constante de 15 eV no modo MS de baixa energia e 45  
425 eV modo de alta energia. A correção das massas foi realizada utilizando o  
426 calibrante externo (Glu-1-fibrinopeptide B, 1 pmol/mL) infundido através do lock  
427 mass a um fluxo de 300 nL/min e amostrado a cada 30s (SHEVCHENKO *et al.*,  
428 2006).

429 Os espectros de massa foram processados utilizando o software Protein  
430 Lynx Global Server (PLGS) versão 3.0. A identificação das proteínas foi obtida  
431 através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados

432 obtidos foram buscados em banco de dados específico do UniProt (Universal  
433 Protein Resource). Para a busca foram utilizados os seguintes parâmetros:  
434 Carbamidomethyl-C (modificação fixa), oxidation M e phosphoryl STY  
435 (modificações variáveis); precisão de massa igual a 10 ppm, com tolerância do  
436 fragmento igual a 0.1 Da contra a massa teórica de peptídeos, com pelo menos  
437 um peptídeo por proteína, dois íons fragmentos por peptídeo e cinco íons  
438 fragmentos por proteína; clivagens perdidas: 1; False discovery rate: 4 (BRAGA  
439 *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2015).

440 A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se análise de  
441 variância com o auxílio do pacote estatístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2008) e,  
442 quando significativas, as médias foram comparados pelo teste de Tukey a 5%.

## 443 2. Resultados

444 Ao analisar o rendimento de carcaça (%) de frangos de corte abatidos aos  
445 42 dias (Tabela 3) não houve interação entre os fatores temperatura e nível de  
446 inclusão de OSM. Como esperado, o peso vivo ao abate de animais criados em  
447 ambiente termoneutro foi superior ao peso de animais criados em ambiente com  
448 estresse térmico ( $p=0,0011$ ). Houve efeito significativo da temperatura ( $p=0,029$ )  
449 para o rendimento da carcaça e de peito sendo que os frangos criados em  
450 estresse por calor apresentaram maior rendimento de carcaça ( $p= 0,029$ ) mas  
451 um menor rendimento de peito ( $p= 0,024$ ) quando comparado aos criados em  
452 ambiente termoneutro, sendo o peito considerado o principal corte comercial da  
453 carcaça de frangos.

454 Tabela 3 - Rendimento (%) de carcaça de cortes comerciais e deposição de  
 455 gordura abdominal em frangos de corte machos abatidos com 42 dias de idade,  
 456 recebendo diferentes níveis de óleo da semente de maracujá.

Temperatura	Níveis (%) OSM)	Peso vivo (kg)	Carcaça (%)	Peito (%)	Asas (%)	Pernas (%)	GA (%)
Estresse		2,89 b	75,19 a	39,99 b	11,59	29,55	0,821
Termoneutra		3,05 a	74,35 b	40,91 a	11,51	29,36	0,969
	0%	2,96	74,75	40,16	11,69	29,49	0,949
	0,30%	2,95	74,67	40,06	11,50	29,43	0,950
	0,50%	2,96	75,36	40,52	11,28	29,08	0,862
	0,70%	2,93	74,12	40,24	11,74	30,03	0,793
	0,90%	3,05	74,94	41,29	11,52	29,23	0,921
Probabilidades, P ≤							
Temperatura		0,0011	0,029	0,024	0,629	0,535	0,054
Níveis (%)		0,527	0,330	0,308	0,374	0,341	0,639
Temperatura x Níveis (%)		0,0805	0,671	0,864	0,749	0,865	0,590
EPM		0,025	0,186	0,197	0,077	0,150	0,038

457 GA: Gordura abdominal; EPM: Erro Padrão da Média. Médias seguidas por  
 458 diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey  
 459 (P<0,05).

460 Para os resultados de peso absoluto expresso em quilogramas (Tabela  
 461 4), houve interação significativa para o peso absoluto de pernas (p=0,0293) e  
 462 seu desdobramento encontra-se na Tabela 5. Além disso houve efeito  
 463 significativo para todos os cortes comerciais e para o peso da gordura abdominal  
 464 (p>0,05) em relação a temperatura de criação, sendo que animais criados em  
 465 ambiente termoneutro apresentam maior peso de cortes comerciais e também  
 466 de gordura abdominal, em relação a animais criados em ambiente de estresse  
 467 por calor.

468 Tabela 4 - Peso absoluto (kg) de cortes comerciais e deposição de gordura  
 469 abdominal de frangos de corte machos abatidos com 42 dias de idade,  
 470 alimentados com diferentes níveis de óleo da semente de maracujá.

Temperatura	Níveis (%)	Carcaça (kg)	Peito (kg)	Asas (kg)	Pernas (kg)	GA (kg)
		2,187				
Estresse		b	0,865 b	0,250 b	0,642	0,024 b

Termoneutra	2,299 a	0,937 a	0,264 a	0,671	0,029 a
0%	2,22	0,88	0,255	0,65	0,028
0,30%	2,28	0,90	0,259	0,66	0,028
0,50%	2,25	0,90	0,252	0,65	0,027
0,70%	2,17	0,87	0,254	0,65	0,023
0,90%	2,28	0,94	0,263	0,66	0,028
Probabilidades, P ≤					
Temperatura	0,0045	0,0017	0,0009	0,0021	0,013
Níveis (%)	0,327	0,374	0,471	0,800	0,498
Temperatura x Níveis (%)	0,113	0,570	0,415	0,0293	0,706
EPM	0,020	0,011	0,002	0,004	0,001

471 GA: Gordura abdominal; EPM: Erro Padrão da Média. Médias seguidas por  
472 diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey  
473 (P<0,05).

474 Em relação ao desdobramento da interação entre os níveis de OSM e  
475 temperatura sobre o peso absoluto de pernas (Tabela 5). Animais criados em  
476 ambiente termoneutro e recebendo a suplementação de níveis de OSM  
477 apresentam maior peso absoluto de pernas em comparação as aves criadas em  
478 ambiente de estresse por calor apenas para o nível de inclusão de 0,70% de  
479 OSM.

480 Tabela 5 - Desdobramento da interação entre temperatura e níveis de inclusão  
481 do óleo da semente de maracujá do peso absoluto (kg) de pernas de frangos de  
482 corte machos aos 42 dias de idade.

	Níveis de óleo de semente de maracujá (%)				
Temperatura	0,00%	0,30%	0,50%	0,70%	0,90%
Estresse	0,651 ab	0,644 ab	0,654 ab	0,608 b	0,651 ab
Termoneutra	0,655 ab	0,676 a	0,650 ab	0,692 a	0,680 a

483 Médias seguidas por diferentes letras minúsculas, diferem entre si pelo teste  
484 Tukey (P<0,05).

485 Em relação aos resultados de qualidade de carne, não houve interação  
486 significativa para nenhuma variável estudada. Houve diferença significativa para  
487 fatores isolados, em relação aos níveis de OSM para porcentagem de perda de  
488 água por cocção, no qual o nível de inclusão de OSM de 0% apresentou menor

489 porcentagem de perda de água em relação ao tratamento de 0,7%. A variável  
 490 temperatura também apresentou diferença significativa, frangos de corte criados  
 491 em estresse por calor apresentaram valores de a\* menor do que os frangos  
 492 criados em ambiente termoneutro (Tabela 6).

493 Tabela 6 - Parâmetros de qualidade de carne do peito de frangos de corte aos  
 494 42 dias de idade alimentados com dietas contendo níveis de óleo da semente de  
 495 maracujá.

Temperatura	Níveis (%)	Cocção % perda de água	Pressão	Cor			pH	Resistência (kg)
				L*	a*	b*		
Estresse		22,24	14,49	58,76	1,60 b	9,50	6,03	1,32
Termoneutra		21,30	14,56	58,45	2,34 a	9,40	6,03	1,37
	0%	20,40 b	13,91	58,39	1,63	9,26	6,06	1,36
	0,30%	21,64 ab	13,86	58,60	2,08	9,19	6,02	1,45
	0,50%	22,40 ab	15,03	58,46	1,91	9,68	6,03	1,40
	0,70%	22,80 a	14,64	59,02	2,15	9,10	5,98	1,27
	0,90%	21,63 ab	15,16	58,56	2,06	10,00	6,05	1,24
Probabilidades, P ≤								
Temperatura		0,067	0,925	0,575	0,0001	0,781	0,881	0,285
Níveis (%)		0,041	0,722	0,956	0,190	0,470	0,290	0,061
Temperatura x Níveis (%)		0,871	0,480	0,480	0,344	0,747	0,223	0,787
Erro padrão Média		0,262	0,373	0,274	0,083	0,176	0,011	0,025

496 Médias seguidas por diferentes letras minúsculas, diferem entre si pelo teste  
 497 Tukey (P<0,05).

498 Em relação a análise proteômica (2D-PAGE) do plasma sanguíneo para  
 499 resultados voltados a qualidade de carne, a proteína *Actin alpha skeletal muscle*,  
 500 *gene ACTA1* apresentou diferença significativa nos tratamentos com inclusão de  
 501 0,9% de OSM em ambas as temperaturas (estresse por calor e termoneutra) e,  
 502 *Neuropilin-1, gene NRP1* no tratamento com 0% de inclusão de OSM e  
 503 temperatura de criação termoneutro (Tabela 7).

504

505 Tabela 7 – Proteínas diferencialmente expressas para qualidade de carne.

<i>Spot</i>	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	p/MM teórica (kDa)
94, 102,215,254, 266	P681 39	ACTA1	Actin alpha skeletal muscle	182.255 4	5.23/ 42.051
71	P797 95	NRP1	Neuropilin-1	55.2513	5.28/ 102.480

506

507 Com 21 dias de idade foi observado interação significativa (Tabela 8) para  
 508 os valores de títulos de anticorpos ( $p= 0,010$ ). Essa interação mostra que,  
 509 frangos criados em ambiente de estresse que receberam o nível de 0,90% de  
 510 OSM, apresentaram maior valor de titulação vacinal (635,15). Quando se  
 511 observa os valores de titulação aos 28 dias de idade, observou-se que os  
 512 animais que receberam 0,90% de inclusão de OSM e, que foram criados em  
 513 ambiente com estresse e termoneutro, apresentaram maiores valores de títulos  
 514 de anticorpos (1.745,95 e 2.209,52 respectivamente), assim como os animais  
 515 que receberam 0,30% de inclusão de OSM e, foram criados em ambiente  
 516 termoneutro.

517 Além disso, também houve efeito isolado dos níveis de inclusão de óleo  
 518 aos 21 e 28 dias de idade dos frangos para os valores de titulação. Frangos que  
 519 receberam 0,90% de inclusão do OSM em ambas as idades (21 e 28 dias)  
 520 apresentaram maiores valores de titulação em comparação com os demais  
 521 níveis de inclusão.

522 Tabela 8 - Valores de títulos de anticorpos de frangos de corte vacinados contra  
 523 o vírus da Doença de Newcastle, recebendo diferentes níveis de óleo da  
 524 semente de maracujá.

Temperatura	Níveis (%)	Idade		
		21d	28d	35d
Estresse	0%	508,78 abc	1612,89 ab	2599,13
	0,30%	437,30 abc	1018,22 ab	1993,30
	0,50%	499,50 abc	1554,63 ab	2497,94
	0,70%	367,56 bc	1272,30 ab	2179,67

	0,90%	635,15 a	1745,95 a	2502,00
Termoneutra	0%	507,25 abc	1581,42 ab	2725,50
	0,30%	563,71 ab	1911,25 a	2939,57
	0,50%	267,22 c	426,11 b	1972,08
	0,70%	370,83 bc	1029,00 ab	2394,55
	0,90%	471,10 abc	2209,52 a	2950,45
<b>Efeitos principais</b>				
Temperatura				
	Estresse	489,66	1440,80	2354,41
	Termoneutra	436,02	1431,46	2596,43
<b>Níveis (%)</b>				
	0%	508,01 ab	1597,15 ab	2662,31
	0,30%	500,51 ab	1464,74 ab	2466,44
	0,50%	383,36 b	990,37 b	2235,01
	0,70%	369,19 b	1150,65 b	2287,11
	0,90%	553,12 a	1977,74 a	2726,23
<b>Probabilidades, P ≤</b>				
	Temperatura	0,134	0,957	0,290
	Níveis (%)	0,001	0,0007	0,520
	Temperatura x Níveis (%)	0,010	0,0049	0,311
	EPM	0,043	0,056	0,052

525 Idade 21d: Título de anticorpos aos 21 dias de idade; Idade 28d: Título de  
526 anticorpos aos 28 dias de idade; Idade 35d: Título de anticorpos aos 35 dias de  
527 idade; EPM: Erro Padrão da Média. Médias seguidas por diferentes letras  
528 minúsculas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

529 Na análise proteômica do plasma sanguíneo (2D-PAGE) foram  
530 encontradas diversas proteínas que estão relacionadas com o sistema  
531 imunológico dos frangos de corte, complementando os resultados encontrados  
532 na titulação de anticorpos, são elas: *Complement factor B-like protease*  
533 (*Fragment*), essa proteína é requerida na via clássica do sistema imunológico e  
534 no sistema complemento; *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *gene*  
535 *GAPDH*, desempenha papel na regulação positiva da produção de citocinas;  
536 *Mannose-binding protein*, *gene MBL*, participa da resposta imune inata,  
537 funcionando como uma proteína ativadora do sistema complemento; *Zinc finger*  
538 *protein ubi-d4*, *gene REQ*, tem papel no desenvolvimento e maturação de células  
539 linfoides; *Ig lambda chain C region*, regulação positiva da proliferação de células

540 B; *Ig lambda chain V-1 region*, participam da ativação do sistema complemento  
 541 e também da produção de imunoglobulinas; *Apolipoprotein A-I, gene APOA1*, faz  
 542 regulação negativa da resposta inflamatória (Tabela 9).

543 Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas ao sistema  
 544 imunológico.

Spot	Acesso	Símbol o Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
49, 66, 111, 116, 117, 256, 277	P81475	N/A	Complement factor B-like protease (Fragment)	216.1593	27.05 9
102, 199	P00356	GAPD H	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	82.5583	8.70/ 35.704
10	Q98TA 4	MBL	Mannose-binding protein	65.9287	5.85/ 27.396
271	P58268	REQ	Zinc finger protein ubi-d4	40.8643	6.57/ 45.884
1, 4, 7, 8, 9, 99, 104, 179, 180, 181, 183, 230	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	3370.311	6.09/ 11.361
1, 7, 8, 9, 99, 180, 183, 230	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	438.219	5.55/ 11.695
1, 99, 147, 168, 175, 176, 179, 180, 181, 183, 184, 214, 215, 220, 230, 237	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	402.871	5.59/ 30.680

545 Os parâmetros hematológicos e os índices hematimétricos avaliados não  
 546 foram influenciados ( $p > 0,05$ ) pelos níveis de inclusão de OSM. Não houve efeito  
 547 ( $p > 0,05$ ) nos valores de hematócrito (Hct), hemoglobina (He) e nos índices VCM  
 548 ( $p < 0,5065$ ) e HCM ( $p < 0,8050$ ) (Tabela 10). Houve efeito significativo ( $p = 0,029$ )  
 549 da temperatura sobre a concentração da proteína plasmática total. Frangos  
 550 criados em ambiente termoneuro apresentaram maior quantidade (g/dl) de  
 551 proteína plasmática em relação aos frangos criados em ambiente de estresse  
 552 por calor.

553 Tabela 10 - Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de frangos de  
 554 corte, aos 30 dias de idade, alimentados com diferentes níveis de óleo da  
 555 semente de maracujá e desafiados com estresse térmico.

Temperatura	Níveis (%)	Ht(%)	Hb(g/dL)	He (x10 <sup>6</sup> /m <sup>3</sup> )	VCM (fl)	HCM (pg)	PTP g/dl
Estresse		28,75	9,58	1,80	167,51	55,83	5,927 b
Termoneutra		28,95	9,65	1,62	182,91	60,97	5,997 a
	0%	29,05	9,68	1,72	158,91	52,97	6,017
	0,30%	29,00	9,66	1,85	172,81	57,60	5,943
	0,50%	29,11	9,70	1,58	188,00	62,67	5,907
	0,70%	28,94	9,65	1,74	178,56	59,52	6,014
	0,90%	28,17	9,39	1,64	177,77	59,26	5,932
Probabilidade e P ≤							
Temperatura		0,693	0,693	0,077	0,149	0,149	0,029
Níveis (%)		0,752	0,752	0,524	0,535	0,535	0,097
Temperatura x Níveis (%)		0,777	0,775	0,271	0,204	0,204	0,255
EPM		0,245	0,081	0,051	5,358	1,786	0,015

556 Ht: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; He: Hemácia; VCM: Volume Corpuscular  
 557 Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; PTP: Proteína Plasmática Total;  
 558 EPM: Erro Padrão da Média. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas,  
 559 na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

560 Para a contagem diferencial de leucócitos e relação heterófilo:linfócito  
 561 (Tabela 11) não houve efeito significativo para nenhuma das variáveis  
 562 estudadas.

563 Tabela 11 - Contagem diferencial de leucócitos (%) e relação heterófilo:linfócito  
 564 (H:L) de frangos de corte aos 30 dias de idade recebendo diferentes níveis de  
 565 óleo da semente de maracujá e desafiado com estresse térmico.

Temperatura	Níveis (%)	Linfócitos (%)	Heterófilos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	H:L
Estresse		70,66	23,08	2,38	2,90	0,33
Termoneutra		72,29	21,15	1,85	2,55	0,29

0%	69,66	25,38	1,05	3,02	0,34
0,30%	69,16	23,77	2,43	3,18	0,36
0,50%	75,27	19,88	2,16	2,66	0,28
0,70%	70,94	19,89	2,29	2,83	0,28
0,90%	72,33	21,66	2,62	1,91	0,28

Probabilidades,

P ≤

Temperatura	0,42	0,293	0,294	0,381	0,192
Níveis (%)	0,318	0,236	0,296	0,327	0,338
Temperatura x					
Níveis (%)	0,855	0,952	0,417	0,921	0,801
EPM	0,989	0,902	0,251	0,211	0,016

566 H:L: Relação entre Heterofilos e Linfócitos; EPM: Erro Padrão da Média.

567 O ensaio de permeabilidade da mucosa intestinal não mostrou efeito  
568 significativo ( $p < 0,05$ ) independentemente do nível de óleo da semente de  
569 maracujá utilizado na dieta dos frangos e, também de sua temperatura de criação  
570 (Tabela 12).

571 Tabela 12 - Níveis de FITC-d no plasma sanguíneo de frangos de corte  
572 submetidos ao ensaio de permeabilidade intestinal com 21 dias de idade.

Temperatura	Níveis (%)	FITC-d	EPM
Estresse		0,1489	0,008
Termoneutra		0,1543	0,007
	0%	0,1427	0,012
	0,30%	0,1557	0,013
	0,50%	0,1543	0,012
	0,70%	0,1700	0,012
	0,90%	0,1352	0,012

Probabilidades, P ≤

Temperatura	0,6298
Níveis (%)	0,3142
Temperatura x Níveis (%)	0,6227

573 EPM: Erro Padrão da Média.

574 A análise proteômica também apresentou resultados referentes a  
575 manutenção do epitélio gastrointestinal, com a expressão diferencial de *Retinol-*  
576 *binding protein 4, gene RBP4* e, *Homeodomain-only protein*, gene HOPX é uma  
577 proteína homeodomínio atípica que não se liga ao DNA. Pode atuar como co-  
578 chaperona para proteínas chaperonas HSPA1A e HSPA1B e auxiliar no  
579 redobramento de proteínas mediadas por chaperonas (UniProt) (Tabela 13).

580 Tabela 13 - Proteínas diferencialmente expressas relacionadas a manutenção  
581 do epitélio gastrointestinal.

Spot	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
102, 103, 137	P41263	RBP4	Retinol-binding protein 4	397.4926	5.93/22.515
76, 89, 208, 271	Q8JHU0	HOPX	Homeodomain-only protein	170.1757	4.92/8.342

582

### 583 3. Discussão

584 Os resultados de rendimento de carcaça e peso absoluto (kg) de cortes  
585 comerciais, estão de acordo com dados descritos por Mello *et al.*, (2015) que,  
586 estudando períodos de estresse térmico durante a criação de frangos de corte,  
587 constataram que aos 35 dias de idade, o peso corporal dos frangos submetidos  
588 ao estresse térmico foi 18% menor ( $p < 0,05$ ) que o grupo controle, demonstrando  
589 que o estresse térmico afeta negativamente o peso de frangos de corte. Esse  
590 resultado também corrobora com os resultados de consumo de ração (dados não  
591 publicados) que demonstraram que os frangos de corte criados em estresse  
592 térmico apresentaram menor consumo de ração que frangos criados em  
593 ambiente termoneuro.

594 Em relação ao desdobramento da interação entre temperatura e níveis de  
595 inclusão do óleo da semente de maracujá para o peso absoluto (kg) de pernas  
596 de frangos de corte, esse resultado está de acordo com os resultados de  
597 consumo de ração (dados não publicados) onde também houve interação  
598 significativa entre temperatura e níveis de OSM e o tratamento 0,7 de OSM com  
599 temperatura termoneutra apresentou maior consumo médio de ração logo o  
600 resultado do peso absoluto (kg) de pernas de frangos de corte foi maior, assim  
601 como o mesmo nível de inclusão de óleo (0,7 OSM) em estresse térmico  
602 apresentou menor consumo médio de ração ocasionando um menor peso  
603 absoluto (kg) de pernas de frangos de corte.

604 Isso ocorre, pois o calor gerado pelos processos metabólicos e o calor  
605 recebido do ambiente devem ser dissipados do corpo da ave, para que a  
606 homeotermia seja mantida. Essa dissipação de calor é realizada com gasto  
607 mínimo de energia em ambiente termoneutro, porém, quando submetidas a altas  
608 temperaturas, as aves apresentam maior dificuldade em manter sua temperatura  
609 corporal. Em ambiente de temperatura acima de 27°C, segundo diferentes  
610 autores (HURWITZ *et al.*, 1980; LEESON e SUMMERS, 1991; YUNianto *et al.*,  
611 1997), as aves aumentam sua produção de calor e a exigência de energia  
612 necessária para manter os mecanismos de resfriamento corporal. Como  
613 mecanismo de defesa, as aves diminuem o consumo de ração, na tentativa de  
614 reduzir a produção de calor metabólico (LEESON E SUMMERS, 1991; HAN E  
615 BAKER, 1993; e ROSTAGNO, 1995). Cella *et al.* (2001) também observaram  
616 que as aves mantidas no calor apresentaram redução de 11,5% no consumo de  
617 ração em relação às mantidas em conforto térmico. Essa redução do consumo  
618 de ração é acompanhada de piora no ganho de peso e na conversão alimentar,

619 conforme constatado por Baziz *et al.* (1996). O peso da carcaça, o rendimento  
620 dos cortes nobres, a deposição de gordura abdominal, o peso das penas e, dos  
621 órgãos abdominais de frangos de corte também podem ser reduzidos pela alta  
622 temperatura ambiente (BAZIZ *et al.*, 1996). Assim como, Oliveira Neto *et al.*  
623 (2000) verificaram que a alta temperatura ambiente influenciou negativamente o  
624 desempenho, o rendimento de peito e o peso dos órgãos vitais de frangos de  
625 corte.

626 O atributo de cor da carne de frangos de corte pode ser alterado por  
627 diversos fatores, um deles está relacionado com as fibras musculares, o  
628 pigmento mioglobina e a hemoglobina presente no sangue (VENTURINI *et al.*,  
629 2007). Levando em consideração o aumento no índice a\* (que representa a cor  
630 vermelha) de frangos de corte criados em ambiente termoneutro, uma das  
631 proteínas encontradas também no ambiente termoneutro é a *Neuropilin-1 gene*  
632 *NRP1*, que está ligada ao processo de angiogênese. A angiogênese é o  
633 crescimento de vasos sanguíneos da vasculatura existente (ADAIR e MONTANI,  
634 2010), explicando o aumento no teor de a\*. Foi demonstrado que a presença de  
635 *Neuropilin-1* nas células endoteliais aumenta a ligação do VEGF (SOKER *et al.*,  
636 1996; WHITAKER *et al.*, 2001; SOKER *et al.*, 2002; MAC GABHANN e POPEL,  
637 2005). Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma família crítica de  
638 citocinas envolvidas no processo de angiogênese (ou neovascularização), o  
639 crescimento de novos microvasos da vasculatura existente (OLSSON *et al.*,  
640 2006; SHIBUYA e CLAESSION-WELSH, 2006).

641 Além disso, outro *spot* proteico diferencialmente expresso foi *Actin alpha*  
642 *skeletal muscle, gene ACTA1*, nos tratamentos com maior inclusão de OSM em  
643 ambos ambientes de criação. As actinas são proteínas altamente conservadas

644 que estão envolvidas em vários tipos de motilidade celular (UniProt). A  
645 expressão desse *spot* de proteína (ACTA1), tem sido associada com a maciez  
646 da carne de bovinos da raça Norwegian Red (BJARNADÓTTIR *et al.*, 2012) e  
647 também foi observada e associada à maciez da carne de bovinos da raça Nelore  
648 (ROSA *et al.*, 2018). Apesar de não ocorrer resultado significativo em relação a  
649 força de cisalhamento no presente estudo, essa avaliação foi realizada em  
650 frangos de corte que foram criados em gaiolas e, em outro experimento, quando  
651 os frangos de corte foram criados fora da gaiola e sua dieta continha OSM foi  
652 encontrada diferença significativa para todos os tratamentos com inclusão de  
653 OSM para força de cisalhamento (ZANETTI, 2018).

654         Para os resultados de títulos de anticorpos de frangos de corte vacinados  
655 contra o vírus da Doença de Newcastle, o resultado da avaliação da resposta  
656 humoral após a vacinação, pode ser explicado segundo Sijben *et al.* (2001) que,  
657 verificaram que o consumo de óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados n-6  
658 favorece a resposta das citocinas séricas Th2 em relação às Th1. A produção de  
659 anticorpos em resposta à vacina é dependente de células Th2, sendo favorecida  
660 por dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados n-6, como observado no  
661 presente estudo, com o aumento da produção de anticorpos com a inclusão de  
662 OSM. Os anticorpos podem bloquear sítios antigênicos, proteger a mucosa de  
663 várias infecções, facilitar a retirada de antígenos do sangue, ativar o sistema  
664 complemento e facilitar a retirada de patógenos por citotoxicidade dependente  
665 de anticorpo (SIJBEN *et al.*, 2001).

666         Na análise do proteoma plasmático foram encontradas sete  
667 proteínas relacionadas ao sistema imunológico dos frangos de corte:

668           1) *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gene GAPDH: é uma  
669 enzima chave na glicólise que catalisa a primeira etapa da via convertendo D-  
670 gliceraldeído 3-fosfato (G3P) em 3-fosfo-D-gliceroil fosfato. Está liada a resposta  
671 imune humoral e também na regulação positiva da produção de citocinas  
672 (UniProt).

673           2) *Zinc finger protein ubi-d4*, gene REQ: tem papel no desenvolvimento e  
674 maturação das células linfóides (UniProt). REQ, também conhecido como DPF2,  
675 ubi-d4 ou BAF45D, foi inicialmente identificado como um gene essencial para  
676 apoptose após privação de Interleucina 3 em células mieloides e foi nomeado  
677 por seu papel na morte celular (GABIG *et al.*, 1994).

678           3) *Apolipoprotein A-I*, gene APOA1: Participa do transporte reverso do  
679 colesterol dos tecidos para o fígado para sua excreção, promovendo o efluxo do  
680 colesterol dos tecidos e atuando como cofator para a lecitina colesterol  
681 aciltransferase (LCAT). Além disso, participa da regulação negativa da produção  
682 de citocinas envolvidas na resposta imunológica, da regulação negativa da  
683 resposta inflamatória e, da regulação negativa da produção de interleucina-1.

684           4) *Complement factor B-like protease (Fragment)*: Requerido nas vias  
685 clássica e alternativa do sistema complemento. Tem atividade de endopeptidase  
686 do tipo serina e, participa da ativação do sistema complemento tanto pela via  
687 clássica quanto pela via alternativa (UniProt). O sistema complemento (SC) é o  
688 principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. É  
689 constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como  
690 expressas na membrana celular, e é ativado por diversos mecanismos por duas  
691 vias, a clássica e a alternativa (ITURRY-YAMAMOTO e PORTINHO, 2001). O  
692 SC é um complexo proteico polimolecular constituído por várias substâncias que

693 desempenham um papel importante em diferentes tipos de reações  
694 imunoinflamatórias (ADELSBERG, 1987). A ativação da via alternativa depende  
695 dos seguintes fatores: fator D, fator B, properdina e C3. O fator B (pré-ativador  
696 de C3) é uma betaglobulina termolábil, que consiste de uma única cadeia  
697 polipeptídica (ROTHER *et al.*, 1988). O fator D é uma alfa globulina termo lábil,  
698 que consiste de uma cadeia polipeptídica única (ROTHER *et al.*, 1988), uma  
699 enzima que existe no organismo na forma ativada (WILLIAMS *et al.*, 1988), e que  
700 cliva o fator B, formando Bb. A properdina, uma gamaglobulina tetramérica, é  
701 uma das proteínas reguladoras da via alternativa do complemento, sendo sua  
702 principal função estabilizar a convertase de C3 e C5 (LAW e REID, 1988).

703       5) *Mannose-binding protein*, gene MBL: desempenha um papel  
704 importante na resposta imune inata a uma variedade de bactérias, vírus e  
705 parasitas (IP *et al.*, 2009 ). Com seu domínio de reconhecimento de carboidratos,  
706 MBL é capaz de interagir com, por exemplo, resíduos ricos em manose que estão  
707 frequentemente presentes em superfícies de patógenos (GARRED *et al.*, 2009).  
708 Através dessa ligação, MBL funciona como uma proteína ativadora de  
709 complemento, através da via dependente de lectina, mas também pode atuar  
710 diretamente como uma fagocitose de aumento de opsonina e matando  
711 patógenos invasores (IP *et al.*, 2009).

712       6) *Ig lambda chain C region*: ativação do sistema complemento, pela via  
713 clássica e regulação positiva da proliferação de células B (UniProt).

714       7) *Ig lambda chain V-1 region*: ativação do sistema complemento por via  
715 clássica, ativação da resposta imune e, produção de imunoglobulina, resultando  
716 em aumento de seus níveis intracelulares ou extracelulares (UniProt).

717 Algumas situações afetam o sistema imunológico (CASTRUCCI *et al.*,  
718 1994) como por exemplo, as micotoxinas, ou a doença de Gumboro, anemia  
719 infecciosa das galinhas, doença de Marek entre outras. As aves também podem  
720 ser afetadas por fatores ambientais, dentre os quais o estresse gerado por  
721 condições extremas de temperatura e de densidade elevada. Além disso, uma  
722 nutrição inadequada também é importante fator para a redução da capacidade  
723 imunológica das aves (TIZARD, 2002), assim sendo desejável potencializar a  
724 resposta imunológica das aves, para prevenir condições que piorem seu  
725 desempenho. Pois, de fato o estresse afeta de forma significativa a saúde dos  
726 frangos de corte, apesar do seu curto prazo de criação. Dependerá do ambiente  
727 em que esse animal será exposto o interesse ou não em potencializar sua  
728 resposta imunológica.

729 No que se refere aos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos  
730 de frangos de corte, as proteínas plasmáticas do sangue são formadas por:  
731 albumina, globulinas alfa, beta, gama e fibrinogênio e a maioria são sintetizadas  
732 no fígado e, fazem parte de 20% do sangue (CHARLES NORIEGA, 2000). O  
733 estresse por calor, como foi mencionado anteriormente, tem a capacidade de  
734 diminuir o consumo de ração com o objetivo de reduzir a produção de calor  
735 metabólico, como observado por Leeson e Summers (1991), Han e Baker (1993),  
736 Rostagno (1995) e, Cella *et al.* (2001). Essa redução no consumo de ração faz  
737 com que diminua também a síntese hepática de proteínas plasmáticas (KITA *et*  
738 *al.*, 1996).

739 Essa redução também foi reportada em situações de restrição alimentar,  
740 em frangos de corte, quando a síntese hepática de proteínas diminuiu à metade  
741 (RAJMAN *et al.*, 2006). Yaman *et al.* (2000) também observaram redução

742 significativa de proteínas totais no plasma, induzidas por privação alimentar,  
743 demonstrando que, o consumo de ração tem a capacidade de interferir  
744 negativamente sobre a síntese hepática de proteínas plasmáticas.

745 Com o estresse calórico era esperado uma diferença significativa na  
746 relação heterófilo: linfócito, porém os animais foram criados sob estresse desde  
747 o primeiro dia de vida, fazendo com que eles se habituassem. Horowitz (2002)  
748 explicou que, a aclimação ao calor compreende diversos mecanismos  
749 fisiológicos controlados autonomamente, trabalhando em conjunto para  
750 aumentar a resistência ao calor. A aclimação por calor pode ser caracterizada  
751 como expansão da faixa termorreguladora dinâmica da ave (YAHAV, 2009). É  
752 possível que não tenha ocorrido diferença para a relação H:L porque as aves do  
753 estresse por calor já estavam aclimatadas, uma vez que a aclimação ocorre  
754 em um período de 4 a 7 dias de exposição a altas temperaturas (YAHAV *et al.*,  
755 1996).

756 O mesmo resultado foi encontrado por Kodaira *et al.*, (2015) que não  
757 observaram diferença na relação H:L entre galpões climatizado e não  
758 climatizado. Assim como Laganá *et al.*, (2007) verificaram que a relação H:L em  
759 frangos de corte submetidos ao estresse por calor esteve próxima aos valores  
760 considerados normais. Sendo a relação H:L de 0,20, 0,50 e 0,80 consideradas  
761 de baixo, ótimo e alto grau de estresse, respectivamente (MACARI e LUQUETI,  
762 2002). O efeito da aclimação influenciou os resultados pois, os valores  
763 encontrados estão entre baixo e ótimo grau de estresse. Comprovando que os  
764 animais se habituem com os efeitos prolongados de estresse, Gross e Siegel  
765 (1986) estudaram o efeito de períodos de jejum hídrico e alimentar em galinhas  
766 que nunca foram submetidas ao jejum e, constataram que o primeiro período de

767 jejum causou aumento na relação H:L porém, o segundo período de jejum foi  
768 menos estressante que o primeiro.

769         Alterações indesejáveis da microbiota intestinal podem ocorrer em virtude  
770 da exposição a fatores ambientais tais como dieta, estresse, toxinas e patógenos  
771 (TEIRLYNCK *et al.*, 2009). Dependendo da intensidade e cronicidade dos  
772 fatores, há o desenvolvimento de disbiose. O estresse agudo ou crônico induz a  
773 disbiose associada a alterações da permeabilidade intestinal, caracterizadas por  
774 redistribuição temporária das proteínas das junções de oclusão (MATTER e  
775 BALDA, 2003; SONG *et al.*, 2014). Song *et al.* (2014) verificaram que o estresse  
776 calórico em frangos de corte alterou a expressão das proteínas das junções  
777 oclusivas do epitélio intestinal. Segundo esses autores, frangos expostos a altas  
778 temperaturas apresentaram níveis reduzidos de ocludina e proteínas da zonula  
779 ocludente 1, com consequente redução da resistência transepitelial. Assim  
780 também, Cosen-Binker *et al.* (2004) verificaram que o estresse se mantido por  
781 tempo prolongado, produz lesões na mucosa do trato gastrintestinal. Porém, no  
782 presente experimento, o estresse térmico não foi capaz de causar um dano  
783 significativo na permeabilidade intestinal, apesar de que os animais foram  
784 criados sob estresse por calor. Uma das explicações é que na análise proteômica  
785 do plasma sanguíneo (2D-PAGE) o *spot* proteico *Retinol-binding protein 4*, gene  
786 RBP4 foi diferencialmente expresso nos tratamentos com 0,9% de OSM em  
787 ambas temperaturas de criação (estresse térmico e termoneutralidade), também  
788 o *spot* proteico *Homeodomain-only protein*, gene HOPX foi diferencialmente  
789 expresso nos tratamentos 0%, 0,5%, 0,9% de frangos criados em estresse por  
790 calor.

791 RBP4 uma proteína de ligação ao retinol (vitamina A), que medeia o  
792 transporte do retinol no plasma sanguíneo e, também fornece retinol das  
793 reservas hepáticas para os tecidos periféricos (UniProt). A captação de retinol  
794 por sua proteína transportadora plasmática (RBP) e, a ligação retinol-proteína,  
795 para células do intestino delgado do macaco foram estudadas e, foi descoberto  
796 que o retinol foi prontamente entregue a partir do RBP para as células intestinais  
797 (RASK e PETERSON, 1976). É mostrado que o RBP contendo retinol pode  
798 fornecê-lo às células intestinais (RASK e PETERSON, 1976). As células  
799 epiteliais do intestino delgado são dependentes de vitamina A para sua função  
800 adequada (DE LUCA *et al.*, 1970). A toxicidade da vitamina A pode surgir quando  
801 o retinol ocorre no plasma na forma livre, enquanto o retinol fisiológico ligado ao  
802 RBP pode proteger as células de efeitos adversos (MALLIA *et al.*, 1975).

803 HOPX foi identificado no epitélio intestinal e, marca uma população  
804 de células-tronco intestinais quiescentes, de ciclo lento, localizadas em torno da  
805 posição +4 da base da cripta (TAKEDA *et al.*, 2011). Essas células de reserva  
806 dão origem a células-tronco de ciclo rápido localizadas na base da cripta  
807 (denominadas células colunares da base da cripta) que expressam Lgr5  
808 (TAKEDA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014). Por outro lado, as células-tronco colunares  
809 de base de cripta ativa dão origem a células duplamente positivas + 4 / HOPX,  
810 demonstrando uma interconversão entre duas populações de células-tronco  
811 intestinais funcionalmente e molecularmente distintas localizadas em nichos  
812 distintos (TAKEDA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014). Em vários tecidos, a HOPX atua  
813 como um cofator intermediário e regula o equilíbrio entre a proliferação e  
814 diferenciação celular, mantendo assim a homeostase celular e tecidual  
815 (TAKEDA *et al.*, 2011).

816 Dessa maneira, levando em consideração o fato de RBP ser  
817 diferencialmente expresso nos tratamentos com 0,9% de inclusão de OSM e,  
818 que o RBP fornece retinol as células intestinais e, HOPX ser diferencialmente  
819 expresso nos tratamentos 0%, 0,5%, 0,9% de frangos criados em estresse por  
820 calor e, HOPX atuar nas células intestinais regulando o equilíbrio entre a  
821 proliferação e diferenciação celular. Fatores que influenciaram os resultados de  
822 permeabilidade intestinal (FITC-d) a não ocorrer alteração na sua função.

#### 823 4. Conclusão

824 A inclusão de óleo de semente de maracujá apresentou influência no  
825 maior peso (em gramas) das pernas, porém não foi capaz de amenizar os efeitos  
826 negativos que o estresse por calor causa na redução do peso de frangos de  
827 corte. Além disso, o OSM também não influenciou a perda de água por cocção.  
828 A temperatura influenciou a cor da carne, com valores de a\* superiores para  
829 frangos criados em sistema termoneutro. Com 21 dias de idade foi observado  
830 uma interação significativa para titulação de anticorpos, sendo que frangos  
831 criados em ambiente de estresse que receberam o nível de 0,90% de OSM,  
832 apresentaram maior valor de titulação vacinal. Aos 28 dias de idade, novamente  
833 os animais que receberam 0,90% de inclusão de OSM e, independente do  
834 ambiente de criação, apresentaram maiores valores de títulos de anticorpos.  
835 Pelo OSM ser rico em ácidos graxos poliinsaturados n-6, favoreceu a produção  
836 de anticorpos em resposta à vacina e, em algumas situações de criação é  
837 desejável potencializar a resposta imune das aves, para prevenir condições que  
838 afetam o sistema imunológico. O óleo de semente de maracujá tem capacidade  
839 de interferir no rendimento de carcaça e, potencializar a saúde de frangos de  
840 corte, uma vez que aumenta a produção de anticorpos em resposta a vacinação.

842 5. Referências bibliográficas

843 ADAIR TH, MONTANI JP. Angiogenesis. In: Colloquium series on  
844 integrated systems physiology: from molecule to function. Morgan & Claypool Life  
845 Sciences 2010; p. 1-84.

846 ADELSBERG B. A conceptual view of the complement system. *Pediatric*  
847 *Annals* 1987; 16: p. 477-82.

848 ANDRADE PMM, CARMO MGT. Ácidos graxos n-3: um link entre  
849 eicosanóides, inflamação e imunidade. *Revista de Metabolismo e Nutrição*,  
850 2006; 3: p. 135-143.

851 BAZIZ HA, GERAERT PA, GUILLAUMIN, S. Chronic heat exposure  
852 enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler  
853 carcasses. *Poultry Science* 1996; 75: p. 505-513.

854 BJARNADÓTTIR SG, HOLLUNG K, HOY M, BENDIXEN E, CODREA M  
855 C, VEISETH-KENT E. Changes in protein abundance between tender and tough  
856 meat from bovine *Longissimus thoracis* muscle assessed by isobaric Tag for  
857 Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel  
858 electrophoresis analysis. *Journal of Animal Science* 2012; 90: p. 2035–2043.

859 BRAGA CP, BITTARELLO AC, PADILHA CCF, LEITE AL, MORAES PM,  
860 BUZALAF MAR, ZARA LF, PADILHA PM. Mercury fractionation in dourada  
861 (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using  
862 metalloproteomic strategies. *Talanta* 2015; 132: p. 239– 244.

863 BRIDI AM, SILVA CA. Avaliação da carne suína. 2. ed. Londrina:  
864 Midiograf, 2009; p. 120.

865 CALDER PC, KEW S. The immune system: a target for functional foods.  
866 *British Journal of Nutrition*, 2002; 88; p. 165-176.

867 CALDER PC, ALBERSR, ANTOINE JM, BLUM S, BOURDET-SICARD R,  
868 FERNS GA, FOLKERTS G, FRIEDMANN PS, FROST GS, GUARNER F, LØVIK  
869 M. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British*  
870 *Journal of Nutrition* 2009; 101 (S1):1-45.

871 CAMPBELL TW. Common Avian Blood Parasites. In: *Avian Hematology*  
872 *and Cytology*. Iowa State Press, Ames, Iowa 1995; p. 30-34.

873 CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, SANTUCCI L, GHIGGERI G  
874 M, CARNEMOLLA B, RIGHETTI PG. Blue silver: A very sensitive colloidal  
875 Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25 (9):  
876 1327–1333.

877 CASTRUCCI G, FERRARI M, OSBURN BI, FRIGERI F, BARRECA F,  
878 TAGLIATI S, CUTERI V. The use of a non-specific defence mechanism inducer in  
879 calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials. *Comparative*  
880 *Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford 1994; 18 (2): 85-91.

881 CAVITT LC, MEULLENET JF, GANDHAPUNENI RK, YOUM GW,  
882 OWENS CM. Rigor development and meat quality of large and small broilers and  
883 the use of Allo-Kramer shear, needle puncture, and razor blade shear to measure  
884 texture. *Poultry Science* 2005; 84: 113-118.

885 CELLA PS, DONZELE JL, OLIVEIRA RF, ALBINO LF, FERREIRA AS,  
886 GOMES PC, VALERIO SR, APOLONIO LR. Níveis de lisina mantendo a relação  
887 aminoacídica para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade, em  
888 diferentes ambientes térmicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001; 30: 33-439.

889 CHARLES NORIEGA MLV. C. Apuntes de hematología aviar: material  
890 didático para curso de hematología aviária. Departamento de Producción Animal:  
891 Aves, Universidad Nacional Autónoma de México, México 2000; p. 7.

892 COSEN-BINKER LI, BINKER MG, NEGRI G, TISCORNIA O. Influence of  
893 stress in acute pancreatitis and correlation with stress-induced gastric ulcer.  
894 *Pancreatology* 2004; 4 (5): 468-469.

895 DE ABREU PG, ABREU VM. A arte de controle do estresse calórico em  
896 aves. Embrapa Suínos e Aves, 2000.

897 DE LUCA L, SCHUMACHER M, WOLF G. Biosynthesis of a fucose-  
898 containing glycopeptide from rat small intestine in normal and vitamin A-deficient  
899 conditions. *Journal of Biological Chemistry* 1970; 245 (17): 4551-4558.

900 DELVES PJ, ROITT IM. The Immune System. *The New England Journal*  
901 *of Medicine* 2000; 343 (1): 37-50.

902 DOS SANTOS FA, LIMA PM, NEVES RCF, MORAES PM, PÉREZ CA,  
903 SILVA MOA, ARRUDA MAZ, CASTRO GR, PADILHA PM. Metallomic study on  
904 plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by  
905 2D PAGE: initial results. *Microchim Acta* 2011;173: 43-49.

906 DOUMAS BT, BAYSE DD, BORNER K, CARTER RJ, ELEVITCH F,  
907 GARBER CC, WESTGARD JO. A candidate reference method for determination  
908 of total protein in serum. II. Test for transferability. *Clinical Chemistry* 1981; 27  
909 (10): 1651-1654.

910 FRIEDMAN A, SKLAN D. Effect of dietary fatty acids on antibody  
911 production and fatty acid composition of lymphoid organs in broiler chicks. *Poultry*  
912 *science* 1995; 74 (9): 1463- 1469.

913 GABIG TG, MANTEL PL, ROSLI R, CREAN CD. REQUIEM: a novel zinc  
914 finger gene essential for apoptosis in myeloid cells, *Journal of Biological*  
915 *Chemistry* 1994; 269: 29515-29519.

916 GARRED P, HONORÉ C, MA YJ, MUNTHE-FOG L, HUMMELSHØJ T.  
917 MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin  
918 pathway of complement. *Molecular Immunology* 2009; 46 (14): 2737-44.

919 GENNERY AR, CANT AJ. Applied physiology: Immune competence.  
920 *Current Paediatrics* 2001; 11 (6): 458-464.

921 GIUFFRÉ AM. Chemical composition of purple passion fruit (*Passiflora*  
922 *edulis Sims edulis*) seed oil, *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 2007; 84:  
923 87-93.

924 GROSS WB, SIEGEL PB. Effects of Initial and Second Periods of Fasting  
925 on Heterophil/Lymphocyte Ratios and Body Weight. *Avian Diseases* 1986; 30 (2):  
926 345-346.

927 HAN Y, BAKER DH. Effects of sex, heat stress, body weight, and genetic  
928 strain on the dietary lysine requirement of broiler chicks. *Poultry Science* 1993;  
929 72 (4): 701-708.

930 HARBIGE LS, YEATMAN N, AMOR S, CRAWFORD MA. Prevention of  
931 experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel fungal  
932 source of  $\gamma$ -linolenic acid. *British Journal of Nutrition* 1995; 74 (5): 701-715.

933 HONIKEL KO. Reference methods for the assessment of physical  
934 characteristics of meat. *Meat Science* 1998; 49: 447-457.

935 HOROWITZ M. From molecular and cellular to integrative heat defense  
936 during exposure to chronic heat. *Comparative Physiology and Biochemistry*  
937 2002; 131 (3): 475-483.

938 HURWITZ S, WEISELBERG M, EISNER U, BARTOV I, RIESENFELD G,  
939 SHARVIT M, NIV A, BORNSTEIN S. The energy requirements and performance  
940 of growing chickens and turkeys as affected by environmental temperature.  
941 *Poultry Science* 1980; 59: 2290-2299.

942 IP WK, TAKAHASHI K, EZEKOWITZ RA, STUART LM. Mannose-binding  
943 lectin and innate immunity. *Immunological Reviews* 2009; 230: 9-21.

944 ITURRY-YAMAMOTO GR, PORTINHO CP. Sistema complemento:  
945 ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Revista da*  
946 *Associação Médica Brasileira* 2001; 47 (1): 41-51.

947 JASTREBSKI SF, LAMONT SJ, SCHMIDT CJ. Chicken hepatic response  
948 to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome  
949 analysis. *PLoS ONE* 2017;12 (7): e0181900.

950 KINSELLA JE, LOKESH B, BROUGHTON S, WHELAN J. Dietary  
951 polyunsaturated fatty acids and eicosanoids potential effects on the modulation  
952 of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 1990; 6: 24–44.

953 KITA K, MATSUNAMI S, OKAMURA J. Relationship of Protein Synthesis  
954 to mRNA Levels in the Liver of Chicks Under Various Nutritional Conditions.  
955 *Journal of Nutrition* 1996; 126: 1610-1617.

956 KODAIRA V, PEREIRA DF, SOARES NM, BUENO LDF. Concentração  
957 de glicose sanguínea e relação heterófilo: linfócito podem ser utilizados como  
958 indicadores de estresse térmico para aves poedeiras?/Could blood glucose and  
959 heterophil: lymphocyte ratio be used as heat stress indicators for laying hens?.  
960 *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas* 2015; 9 (2): 182-190.

961 LAGANÁ C, RIBEIRO AM, GONZÁLEZ FHD, LACERDA LA, KRATZ LR,  
962 BARBOSA PR. Níveis dietéticos de proteína e gordura e parâmetros  
963 bioquímicos, hematológicos e empenamento em frangos de corte estressados  
964 pelo calor. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 6, p. 1783-1790, 2007.

965 LAW SKA, REID KBM. *Complement*. Oxford Ilpress 1988; 72.

966 LEESON S, SUMMERS JD. *Commercial poultry nutrition*. Guelph, Ontário:  
967 University Books 1991; 335.

968 LEONEL S, LEONEL M, DUARTE-FILHO J. Principais produtos e  
969 subprodutos obtidos do maracujazeiro. *Informe Agropecuário* 2000; 21: 86-88.

970 LIMA PM, NEVES RDCF, DOS SANTOS FA, PÉREZ CA, SILVA MOA,  
971 ARRUDA MAZ, CASTROE GR, PADILHA PM. Analytical approach to the  
972 metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS  
973 after 2D-PAGE separation: preliminary results. *Talanta* 2010; 82: 1052–1056.

974 LIU S, YANG F, LI J, ZHANG C, JI H, HONG P. Physical and chemical  
975 analysis of Passiflora seeds and seed oil from China. *International Journal of*  
976 *Food Sciences Nutrition* 2008; 59: 706-715.

977 LUCAS AM, JAMROZ C. *Atlas of avian hematology*. Washington: U.S.  
978 Department of Agriculture 1961; 271.

979 MAC GABHANN F, POPEL AS. Differential binding of VEGF isoforms to  
980 VEGF receptor 2 in the presence of neuropilin-1: a computational model.  
981 *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory* 2005; 288: H2851–H2860.

982 MACARI M, LUQUETTI BC. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI M;  
983 FURLAN RL; GONZALES E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*.  
984 *Jaboticabal: FUNEP/UNESP* 2002; 17-35.

985 MALACRIDA CR, JORGE N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora*  
986 *edulis f. flavicarpa*): physical and chemical characteristics. *Brazilian Archives of*  
987 *Biology and Technology* 2012; 55: 127-134.

988 MALLIA AK, SMITH JE, GOODMAN DSJ. *Journal of Lipid Research* 1975;  
989 186-188.

990 MATTER K, BALDA MS. Signalling to and from tight junctions. *Nature*  
991 *reviews Molecular cell biology* 2003; 4 (3): 225-237.

992 MAXWELL MH, ROBERTSON GW, SPENCE S, MCCORQUODALE CC.  
993 Comparison of haematological values in restricted-and ad libitum-fed domestic  
994 fowls: White blood cells and thrombocytes, *British Poultry Science* 1990; 31 (2):  
995 399-405.

996 MELLO JLM, BOIAGO MM, GIAMPIETRO-GANECO A, BERTON MP,  
997 VIEIRA LDC, SOUZA RA, FERRARIF, BORBA H. Periods of heat stress during  
998 the growing affects negatively the performance and carcass yield of broilers.  
999 *Archivos de zootecnia* 2015; 64 (248): 339–345.

1000 MOURA DJ. *Ambiência na avicultura de corte*. In: SILVA, I.J.O. *Ambiência*  
1001 *na produção de aves em clima tropical*. Piracicaba: FUNEP 2001: 81-93.

1002 NYANZI SA, CARSTENSEN B, SCHWACK W. A comparative study of  
1003 fatty acid profiles of Passiflora seed oils from Uganda. *Journal of the American*  
1004 *Oil Chemists' Society* 2005; 82: 41-44.

1005 OLIVEIRA NETO ARD, OLIVEIRA RFMD, DONZELE JL, ROSTAGNO  
1006 HS, FERREIRA RA, MAXIMIANO HDC, GASPARINO E. Efeito da temperatura  
1007 ambiente sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte  
1008 alimentados com dieta controlada e dois níveis de energia  
1009 metabolizável. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2000; 29 (1): 183-190.

1010 Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor  
1011 signalling—in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*  
1012 2006; 7: 359 –371.

1013 PARMENTIER HK, AWATI A, NIEUWLAND MGB, SCHRAMA JW,  
1014 SIJBEN JW. Different sources of dietary n-6 polyunsaturated fatty acids and their  
1015 effects on antibody responses in chickens. *British Poultry Science* 2002; 43 (4):  
1016 533-544.

1017 PARMENTIER HK, NIEUWLAND MGB, BARWEGEN MB, KWAKKEL RP,  
1018 SCHRAMA JW. Dietary unsaturated fatty acids affect antibody responses and  
1019 growth of chickens divergently selected for humoral responses to sheep red blood  
1020 cells. *Poultry Science* 1997; 76: 1164–1171.

1021 PERIĆ L, ŽIKIĆ D, LUKIĆ M. Application of alternative of growth promoters  
1022 in broiler production. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2009; 25 (5-6): 387-  
1023 397.

1024 PIOMBO G, BAROUH N, BAREA B, BOULANGER R, BRAT P, PINA M,  
1025 VILLENEUVE P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*),  
1026 passion fruit (*Passiflora eulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux, Corps*  
1027 *Gras, Lipides* 2006; 13: 195-199.

1028 PRASAD J. Pectina and oil from passion fruit waste. *Fiji Agricultural*  
1029 *Journal* 1980; 42: 45-48.

1030 RAJMAN M, JURÁNI M, LAMOSOVA D, MACAJOVA M, SEDLACKOVA  
1031 M, KOSTAL L, JEZOVA D, VYBOH P. The effects of feed restriction on plasma  
1032 biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus*). *Comparative Biochemistry*  
1033 *and Physiology* 2006; Part A (145): 363-371.

1034 RASKLARS, PETERSON PA. In vitro uptake of vitamin A from the retinol-  
1035 binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey's small  
1036 intestine. *Journal of Biological Chemistry* 1976; 251 (20): 6360-6366.

1037 ROSA AF, MONCAU CT, POLETI MD, FONSECA LD, BALIEIRO JCC,  
1038 SILVA SLE, ELER JP. Proteome changes of beef in Nellore cattle with different  
1039 genotypes for tenderness. *Meat Science* 2018; 138:1–9.

1040 ROSTAGNO HS. et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos:  
1041 composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ª edição; 2017; Viçosa, MG:  
1042 Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. p. 488.  
1043 ROSTAGNO HS. Programas de alimentação e nutrição para frangos de  
1044 corte adequados ao clima. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE  
1045 AMBIÊNCIA E INSTALAÇÃO NA AVICULTURA INDUSTRIAL; 1995; Campinas.  
1046 Anais Campinas. p. 11-20.  
1047 ROTHER K, TILL GO. Phases of Complement Research and  
1048 Nomenclature. In Rother K, Till GO ed. The complement system. 1ª ed; 1988;  
1049 Berlin, Springer-Verlag. p. 1-4.  
1050 SANTOS HF, LOVATO M. Doenças das aves; 2018; São Paulo. p. 20.  
1051 SAS INSTITUTE INC. Statistical analysis system user's guide. Version  
1052 9.3. ed; 2008; Cary: SAS Institute, USA.  
1053 SCHALMOW, JAIN NC, CARROLL EJ. Scham's Veterinary Hematology  
1054 4 ed. Philadelphia Lca & Febiger 1986; 1344.  
1055 SHEVCHENKO A, TOMAS H, HAVLI J, OLSEN JV, MANN M. In-gel  
1056 digestion for mass spectrometric characterization of proteins and  
1057 proteomes. Nature protocols 2006; 1 (6): 2856.  
1058 SHIBUYA M, CLAESSION-WELSH L. Signal transduction by VEGF  
1059 receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Experimental  
1060 cell research 2006; 312 (5): 549-56.  
1061 SHINI S, HUFF GR, SHINI A, KAISER P. Understanding stress-induced  
1062 immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in  
1063 chicken peripheral leukocytes. Poultry Science 2010; 89 (4): 841-851.  
1064 SHINI S, KAISER P. Effects of stress, mimicked by administration of  
1065 corticosterone in drinking water, on the expression of chicken cytokine and  
1066 chemokine genes in lymphocytes. Sress 2009; 12 (5) 388-399.  
1067 SHINI S, KAISER P, SHINI A, BRYDEN WL. Biological response of  
1068 chickens (*Gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial  
1069 endotoxin. Comparative Biochemistry and Physiology 2008; 149 (2): 324-333.  
1070 SIJBEN JW, NIEUWLAND MG, KEMP B, PARMENTIER HK, SCRAMA  
1071 JW. Interactions and antigen dependence of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated  
1072 fatty acids on antibody responsiveness in growing layer hens. Poultry Science  
1073 2001; 80 (7): 885-893.  
1074 SIJBEN JWC, DE GROOT H, NIEUWLAND MGB, SCHRAMA JW,  
1075 PARMENTIER HK. Dietary linoleic acid divergently affects immune  
1076 responsiveness of growing layer hens. Poultry Science 2000; 79 (8): 1106-1115.  
1077 SILVA SOBRINHO AG. Body composition and characteristics of carcass  
1078 from lambs of different genotypes and ages at slaughter. Palmerston North:  
1079 Massey University, 1999.  
1080 SILVA AC, JORGE N. Bioactive compounds of oils extracted from fruits  
1081 seeds obtained from agroindustrial waste. European Journal of Lipid Science and  
1082 Technology 2017; 119: 1-5.  
1083 SOKER S, MIAO HQ, NOMI M, TAKASHIMA S, KLAGSBRUN M.  
1084 VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-  
1085 1 that enhance VEGF165-receptor binding. Journal of Cellular Biochemistry  
1086 2002; 85: 357-368.  
1087 SOKER S, TAKASHIMA S, MIAO HQ, NEUFELD G, KLAGSBRUN M.  
1088 Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific  
1089 receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 1998; 92: 735-745.

1090 STAL P, ERIKSSON PO, THORNELL LE. Differences in capillary supply  
1091 between human oro-facial, masticatory and limb muscles. *Journal of Muscle*  
1092 *Research and Cell Motility* 1996; 17: 183–197.

1093 SONG J, XIAO K, KE YL, JIAO LF, HU CH, DIAO QY, SHI B, ZOU ZT.  
1094 Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier  
1095 integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science* 2014; 93: 581-588.

1096 SWAYNE DE. Laboratory manual for the isolation and identification of  
1097 avian pathogens. American Association of Avian Pathologists, University of  
1098 Pennsylvania, 1998.

1099 TAKEDA N, JAIN R, LEBOEUF MR, WANG Q, LU MM, EPSTEIN JA.  
1100 Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct  
1101 niches. *Science* 2011; 334 (6061): 1420-1424.

1102 TEIRLYNCK E, BJERRUM L, EECKHAUT V, HUYGHEBAERT G,  
1103 PASMANS F, HAESEBROUCK F, DEWULF J, DUCATELLE R, VAN  
1104 IMMERSEEL F. The cereal type in feed influences gut wall morphology and  
1105 intestinal immune cell infiltration in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*  
1106 2009; 102: 1453–1461.

1107 TIZARD IR. *Imunologia veterinária-uma introdução*. Editora Roca, 2002.

1108 UniProt- Base de conhecimento de proteínas: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). Acesso  
1109 em: 12 de janeiro de 2020.

1110 VAZ RGMV. Nutrientes funcionais em rações de frangos de corte  
1111 mantidos em ambiente de alta temperatura [Tese]. Viçosa (MG): Universidade  
1112 Federal de Viçosa; dois mil e seis.

1113 VENTURINI KS, SARCINELLIMF, SILVA LC. Características da carne de  
1114 frango. *Boletim Técnico-Pie-Ufes* 2007 (1307).

1115 VICUÑA EA, KUTTAPPAN VA, TELLEZ G, HERNANDEZ-VELASCO X,  
1116 SEEBER-GALARZA R, LATORRE JD, FAULKNER OB, WOLFENDEN AD,  
1117 HARGIS BM, BIELKE LR. Dose titration of FITC-D for optimal measurement of  
1118 enteric inflammation in broiler chicks. *Poultry Science* 2015; 94: 1353-1359.

1119 VIEIRA JCS, BRAGA CP, DE OLIVEIRA G, DO CARMO F, PADILHA C,  
1120 DE MORAES PM, ZARA LF, DE LIMA LEITE A, BUZALAF MAR, PADILHA MP.  
1121 Correction to: mercury exposure: protein biomarkers of mercury exposure in  
1122 Jaraqui fish from the Amazon region. *Biological Trace Element Research* 2017;  
1123 183: 164-171.

1124 VIEIRA JCS, CAVECCI B, QUEIROZ JV, BRAGA CP, PADILHA CCF,  
1125 LEITE AL, FIGUEIREDO WS, BUZALAF MAR, ZARA LF, PADILHA PM.  
1126 Determination of the mercury fraction linked to protein of muscle and liver tissue  
1127 of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon region of Brazil. *Archives of*  
1128 *Environmental Contamination and Toxicology* 2015; 69: 422–430.

1129 WHITAKER GB, LIMBERG BJ, ROSENBAUM JS. Vascular endothelial  
1130 growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is  
1131 responsible for the differential signaling potency of VEGF165 and VEGF121.  
1132 *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 25520 –25531.

1133 WILLIAMS LW, BURKS AW, STEELE RW. Complement: function and  
1134 clinical relevance. *Ann Allergy* 1988; 60: 293-301.

1135 WINTROBE MM. Variations in the size and hemoglobin content of  
1136 erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematologica* 1934; 51  
1137 (32): 32-49.

1138 XU Y, LAI X, LI Z, ZHANG X, LUO Q. Effect of chronic heat stress on some  
1139 physiological and immunological parameters in different breed of broilers. Poultry  
1140 Science 2018; 97: 4073-4082.

1141 YAHAV S. Alleviating heat stress in domestic fowl: different strategies.  
1142 World's Poultry Science Journal 2009; 65: 719-732.

1143 YAHAV S, STRASCHNOW A, PLAVNIK I, HURWITZ S. Effects of  
1144 diurnally cycling versus constant temperatures on chickens growth and food  
1145 intake. British Poultry Science 1996; 37: 43-54.

1146 YAMAN MA, KITA K, OKUMURA J. Different responses of protein  
1147 synthesis to refeeding in various muscles of fasted chicks, British Poultry Science  
1148 2000; 41: 224-228.

1149 YUNianto V, HAYASHI K, KAIWDA S, OHTSUKA A, TOMITA Y. Effect  
1150 of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in  
1151 tube-fed broiler chicken. British Journal of Nutrition 1997; 77 (6): 897-909.

1152 ZANETTI LH. Óleo de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) na  
1153 alimentação de frangos de corte. [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual  
1154 Paulista; dois mil e dezoito.

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

### CAPÍTULO III

1167 Óleo da semente de maracujá aumenta a resposta  
1168 antioxidante de frangos de corte

1169 Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos  
1170 Santos, Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel,  
1171 Cássio Yutto Oura, Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori

1172 Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal –  
1173 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu,  
1174 São Paulo, Brasil. Autor correspondente: ferkaiserlima@gmail.com

1175

1176 Óleo da semente de maracujá aumenta a resposta antioxidante de  
1177 frangos de corte

1178 Fernanda Kaiser de Lima-Krenchinski, Tatiane Souza dos Santos,  
1179 Priscila Michelin Groff-Urayama, Jéssica Moraes Cruvinel, Cássio Yutto Oura,  
1180 Julianna Santos Batistioli, José Roberto Sartori

1181 Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de  
1182 Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

1183 Resumo

1184 Afim de evitar o dano oxidativo ocorrido em função do estresse por calor, o  
1185 objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da suplementação de óleo da  
1186 semente de maracujá (OSM) para avaliação de seu potencial no sistema  
1187 antioxidante de frangos de corte. Para isso foram utilizados 450 pintainhos de 1  
1188 dia de idade, machos, da linhagem Cobb® 500, no qual foram alojados em  
1189 gaiolas de arame galvanizado (0,4 x 0,5 x 0,6m) com comedouros tipo calha e  
1190 bebedouros tipo *nipple*, em duas câmaras climáticas: termoneutra e outra com  
1191 estresse cíclico por calor, com 45 gaiolas cada. O delineamento foi inteiramente  
1192 casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, sendo duas temperaturas (termoneutra  
1193 e estresse cíclico pelo calor) e cinco tratamentos: controle (sem inclusão de  
1194 OSM) + quatro níveis de inclusão de OSM: 0,30; 0,50; 0,70; 0,90%) com nove  
1195 repetições de cinco aves cada. A ração experimental foi desprovida de  
1196 antibióticos como melhorador de desempenho, sendo utilizado anticoccidiano  
1197 em todos os tratamentos. Foram feitas análises para determinação da atividade  
1198 de enzimas do sistema antioxidante no fígado, definição da capacidade  
1199 antioxidante e peroxidação lipídica no sangue e análise proteômica no plasma  
1200 sanguíneo de frangos de corte. Os dados foram tabulados e analisados  
1201 utilizando-se análise de variância com auxílio do SAS 9.2 (*SAS Institute*, 2008).  
1202 Houve maior % de redução de DPPH com a maior inclusão do OSM, assim como  
1203 o gene ADH1, foi diferencialmente expresso nos tratamentos com maior inclusão  
1204 de OSM. O gene HBE teve sua expressão diferenciada no tratamento 0,9% de  
1205 frangos de corte criados em ambiente de estresse, HBE está relacionado com o  
1206 processo de catabolismo do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) assim como a  
1207 enzima catalase, que também apresentou diferença significativa na sua atividade

1208 em relação ao ambiente de criação, sendo maior no ambiente termoneutro. Além  
1209 disso, vários *spots* proteicos relacionados as chaperonas moleculares foram  
1210 diferencialmente expressas nos tratamentos 0,5% e 0,9% de inclusão de OSM  
1211 em ambas as temperaturas de criação. Ainda, o gene PGRMC1 foi  
1212 diferencialmente expresso nos tratamentos de 0,9% de inclusão de OSM em  
1213 ambos os ambientes de criação.

1214 Palavras-chave: Antioxidante, aditivo fitogênico, avicultura.

1215 Abstract

1216 In order to avoid oxidative damage caused by heat stress, the objective of this  
1217 work was to study the effect of passion fruit seed oil (OSM) supplementation to  
1218 evaluate its potential in the antioxidant system of broiler chickens. For this, 450  
1219 1-day-old male chicks of the Cobb® 500 strain were used, which were housed in  
1220 galvanized wire cages (0.4 x 0.5 x 0.6 m) with trough-type feeders and nipple-  
1221 type drinkers, in two climatic chambers: thermoneutral and another with cyclical  
1222 heat stress, with 45 cages each. The design was completely randomized, in a 2  
1223 x 5 factorial scheme, with two temperatures (thermoneutral and cyclic heat stress)  
1224 and five treatments: control (without inclusion of OSM) + four levels of inclusion  
1225 of OSM: 0.30; 0.50; 0.70; 0.90%) with nine replicates of five birds each. The  
1226 experimental food was devoid of antibiotics as a performance enhancer, being  
1227 used anticoccidial in all treatments. Analyzes were carried out to determine the  
1228 activity of enzymes of the antioxidant system in the liver, definition of the  
1229 antioxidant capacity and lipid peroxidation in the blood and proteomic analysis in  
1230 the blood plasma of broiler chickens. Data were tabulated and analyzed using  
1231 analysis of variance with the aid of SAS 9.2 (SAS Institute, 2008). There was a  
1232 greater % reduction of DPPH with the greater inclusion of OSM, as well as the  
1233 ADH1 gene, which was differentially expressed in treatments with greater  
1234 inclusion of OSM. The HBE gene had its expression differentiated in the  
1235 treatment of 0.9% of broilers raised in a stress environment, HBE is related to the  
1236 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) catabolism process as well as the catalase enzyme,  
1237 which also showed a significant difference in its activity in relation to the creation  
1238 environment, being greater in the thermoneutral environment. Furthermore,  
1239 several protein spots related to molecular chaperones were differentially

1240 expressed in the 0.5% and 0.9% OSM inclusion treatments at both rearing  
1241 temperatures. Furthermore, the PGRMC1 gene was differentially expressed in  
1242 treatments with 0.9% inclusion of OSM in both rearing environments.  
1243 Keywords: Antioxidant, phytogetic additive, poultry.

1244 1. Introdução

1245 Vários processos participam da defesa do organismo (PAPPAS *et al.*  
1246 2008). Dentre os quais, as chaperonas moleculares, são proteínas que se ligam  
1247 e estabilizam a conformação de outra proteína cliente instável, possibilitando seu  
1248 correto destino e facilitando os processos de enovelamento, oligomerização,  
1249 transporte para um compartimento subcelular e regulação da conformação em  
1250 estados ativos e inativos (Hendrick e Hartl, 1993).

1251 Neste sentido, as chaperonas são capazes de realizar muitas funções  
1252 celulares fundamentais, entre elas: assegurar que polipeptídeos recém-  
1253 sintetizados atinjam o enovelamento correto do estado nativo, auxiliar a  
1254 associação e dissociação de complexos multiproteicos, translocação através de  
1255 membranas de proteínas destinadas a diferentes compartimentos celulares,  
1256 prevenção da formação de agregados proteicos, reenovelamento de  
1257 polipeptídeos mal enovelados e ressolubilização de agregados formados em  
1258 situações de estresse (Hartl *et al.*, 1992; Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Tiroli-Cepeda  
1259 e Ramos, 2011).

1260 As proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*) fazem parte de uma  
1261 grande família das HSPs e funcionam como chaperonas moleculares as quais  
1262 modulam a resposta ao estresse térmico e minimizam lesões celulares (Castro  
1263 *et al.*, 2013). Para que todas essas funções possam ser realizadas  
1264 eficientemente existem diversos tipos de chaperonas moleculares organizadas  
1265 em cinco famílias principais que são nomeadas de acordo com a massa  
1266 molecular do monômero em Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 e sHsps. O termo  
1267 Hsp (*Heat shock protein*) é derivado do fato de que as primeiras chaperonas  
1268 foram identificadas por terem sua expressão altamente elevada em condições

1269 de estresse térmico (Lindquist e Craig, 1988; Aldea *et al.*, 2007). Na grande  
1270 maioria dos casos, as chaperonas funcionam sendo auxiliadas pelas co-  
1271 chaperonas (Bukau e Horwich, 1998; Taipale *et al.*, 2014).

1272 Dentre as Hsp's induzidas por meio do estresse, a Hsp70 foi estudada  
1273 extensivamente (VALROS *et al.*, 2013). Esta proteína pode ser considerada a  
1274 mais proeminente e abundantemente expressa (MAYER e BUKAU, 2005). As  
1275 Hsp70 atuam com função anti-apoptótica na inibição da formação do ROS  
1276 (PICARD e GAGAOUA, 2017). A proteína Hsp40 codificada pelo gene DNAJA1,  
1277 atua como co-chaperona da Hsp70 e ajuda no dobramento e proteção de novas  
1278 proteínas, no intuito de assegurar o bom funcionamento do músculo sob  
1279 condições de estresse oxidativo (GUILLEMIN *et al.*, 2011).

1280 Alguns alimentos naturais podem desempenhar efeitos moleculares que,  
1281 dependendo de quais genes sejam influenciados, irão causar efeito benéfico ao  
1282 organismo. Nesse sentido, interesse tem sido depositado na capacidade em que  
1283 esses nutrientes têm de alterar a expressão, uma vez que podem atuar em  
1284 diferentes alvos moleculares e modificar todas as etapas da expressão gênica  
1285 (FIALHO *et al.*, 2008). A área de nutrição foi favorecida pelo desenvolvimento e  
1286 aplicação de ferramentas de genômica funcional, destacando-se a  
1287 transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, que estudam, respectivamente,  
1288 o conjunto de transcritos, proteínas e metabolitos que sofrem alterações  
1289 constantes em respostas a diferentes fatores ambientais e nutricionais (FIALHO  
1290 *et al.*, 2008). O óleo da semente de maracujá apresenta em sua constituição  
1291 tocoferóis e, carotenoides que desempenham ação antioxidante no organismo  
1292 (DA SILVA e JORGE, 2017).

1293 Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de  
1294 níveis crescentes de óleo da semente de maracujá (OSM) na dieta de frangos  
1295 de corte criados em estresse por calor e ambiente termoneutro, sobre a atividade  
1296 de enzimas do sistema antioxidante, capacidade antioxidante, peroxidação  
1297 lipídica e, análise do proteoma plasmático. Sob a hipótese de que os compostos  
1298 bioativos, principalmente carotenoides presentes no óleo da semente de  
1299 maracujá, fossem capazes de reduzir os danos oxidativos causados pelo  
1300 estresse por calor.

## 1301 2. Material e métodos

1302 O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
1303 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, no Laboratório de  
1304 Nutrição de Aves. Todos os procedimentos experimentais utilizados foram  
1305 aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, sob o  
1306 protocolo 0106/2019, estando de acordo com os princípios éticos na  
1307 experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação  
1308 Animal (COBEA).

1309 Foram utilizados 450 pintainhos de 1 dia de idade, machos, da linhagem  
1310 Cobb® 500, alojados em gaiolas de arame galvanizado (0,4 x 0,5 x 0,6m) com  
1311 comedouros tipo calha dispostos frontalmente a gaiola e bebedouros tipo nipple,  
1312 alojados em duas câmaras climáticas contendo 45 gaiolas cada: termoneutra  
1313 (Tabela 11) que segue as instruções de temperatura da linhagem e, outra com  
1314 estresse cíclico por calor, os animais foram criados em estresse cíclico por calor  
1315 durante 12 horas por dia seguindo as temperaturas detalhadas na Tabela 14.

1316 Tabela 14 – Temperaturas utilizadas nas câmaras termoneutra e estresse  
1317 térmico.

CÂMARA TERMONEUTRA		CÂMARA ESTRESSE TÉRMICO	
Idade das aves (dias)	Média Temperatura (° C)	Idade das aves (dias)	Média Temperatura (° C)
1-7	31,20	1-7	35,26
8-21	28,29	8-21	33,08
22-35	25,55	22-35	31,54

1318

1319 Todas as aves foram vacinadas no incubatório contra Gumboro, Marek e  
1320 Bouda Aviária. A água e ração foram fornecidas à vontade durante os períodos  
1321 experimentais e o programa de luz seguiu as orientações do manual da linhagem  
1322 de frangos selecionada. O delineamento foi inteiramente casualizado, em  
1323 esquema fatorial 2 x 5 duas temperaturas (termoneutra e estresse cíclico pelo  
1324 calor), e cinco tratamentos: Controle negativo sem óleo da semente de maracujá:  
1325 0% OSM; 0,30% de inclusão de óleo da semente de maracujá: 0,3% OSM;  
1326 0,50% de inclusão de óleo da semente de maracujá: 0,5% OSM; 0,70% de  
1327 inclusão de óleo da semente de maracujá: 0,7% OSM; 0,90% de inclusão de óleo  
1328 da semente de maracujá: 0,9% OSM.

1329 A ração experimental foi desprovida de antibióticos como melhorador de  
1330 desempenho, e foi utilizado anticoccidiano em todos os tratamentos. O OSM foi  
1331 adicionado nas dietas em substituição ao óleo de soja, considerando-se a  
1332 correção pelo valor da EMA que no óleo de soja é 8.790 kcal (Rostagno *et al.*,  
1333 2017) e no OSM é 9.378 kcal/kg (Zanetti, 2018).

1334 A ração foi formulada a base de milho, farelo de soja e farinha de vísceras,  
1335 segundo as recomendações de Rostagno *et al.* (2017) para frangos de corte  
1336 machos de desempenho médio (Tabela 15). O programa de alimentação foi

1337 dividido em três fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias) e crescimento  
1338 (22 a 35 dias).

1339 Foi realizado a aferição da temperatura e umidade relativa do ar, por meio  
1340 de conjunto de termômetros de máxima e mínima, bulbo seco e bulbo úmido e  
1341 de globo negro colocados na altura das aves e, por meio de sensores eletrônicos  
1342 tipo HOBOS instalados em cada câmara.

Tabela 15- Composição percentual e nutricional calculada das dietas experimentais pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias) e crescimento (22 a 33 dias).

Ingredientes	Pré-Inicial					Inicial					Crescimento				
	0%	0,3%	0,5%	0,7%	0,9%	0%	0,3%	0,5%	0,7%	0,9%	0%	0,3%	0,5%	0,7%	0,9%
Milho	54,52	54,55	54,58	54,60	54,63	56,26	56,30	56,32	56,34	56,37	61,43	61,47	61,50	61,52	61,54
Farelo Soja, 46%	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	34,00	34,00	34,00	34,00	34,00	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Óleo soja	1,057	0,725	0,503	0,282	0,060	1,899	1,567	1,346	1,124	0,903	2,973	2,640	2,419	2,198	1,976
Farinha Vísceras	4,766	4,761	4,757	4,754	4,751	4,487	4,482	4,479	4,476	4,472	2,273	2,268	2,265	2,261	2,258
Fosfato bicálcico	1,263	1,263	1,264	1,264	1,265	1,080	1,081	1,081	1,082	1,082	1,170	1,170	1,171	1,171	1,171
Calcário	0,843	0,843	0,843	0,844	0,844	0,765	0,765	0,765	0,765	0,765	0,678	0,678	0,678	0,678	0,678
Bicarbonato de Sódio	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031
OSM <sup>1</sup>	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900	0,000	0,300	0,500	0,700	0,900
DL-Metionina 99%	0,367	0,367	0,367	0,367	0,366	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350	0,314	0,314	0,314	0,314	0,314
L-Lisina HCL 99%	0,227	0,227	0,227	0,227	0,227	0,233	0,233	0,233	0,233	0,233	0,257	0,257	0,257	0,257	0,257
L-Treonina 98,5%	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,092	0,092	0,092	0,092	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091
Anticoccidiano <sup>2</sup>	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
Colina	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,095	0,095	0,095	0,095	0,095	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
Premix Vit. <sup>3</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix Min. <sup>4</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Sal comum	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição nutricional calculada															
EM (kcal/kg)	2975	2975	2975	2975	2975	3050	3050	3050	3050	3050	3150	3150	3150	3150	3150
Proteína Bruta (%)	24,27	24,27	24,27	24,27	24,27	23,31	23,31	23,31	23,31	23,31	20,58	20,58	20,58	20,58	20,58
Cálcio (%)	0,971	0,971	0,971	0,971	0,971	0,878	0,878	0,878	0,878	0,878	0,758	0,758	0,758	0,758	0,758
Fósforo disp. (%)	0,463	0,463	0,463	0,463	0,463	0,419	0,419	0,419	0,419	0,419	0,374	0,374	0,374	0,374	0,374
Potássio (%)	0,597	0,597	0,597	0,597	0,597	0,598	0,598	0,598	0,598	0,598	0,599	0,599	0,599	0,599	0,599

Sódio (%)	0,225	0,225	0,225	0,225	0,225	0,218	0,218	0,218	0,218	0,218	0,208	0,208	0,208	0,208	0,208
Cloro (%)	0,202	0,202	0,202	0,202	0,202	0,194	0,194	0,194	0,194	0,194	0,183	0,183	0,183	0,183	0,183
Lisina dig. (%)	1,441	1,441	1,441	1,441	1,441	1,384	1,384	1,384	1,384	1,384	1,239	1,239	1,239	1,239	1,239
Metionina (%)	0,591	0,591	0,591	0,591	0,591	0,567	0,567	0,567	0,567	0,567	0,508	0,508	0,508	0,508	0,508
Met+Cys dig. (%)	1,066	1,066	1,066	1,066	1,066	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	0,917	0,917	0,917	0,917	0,917
Triptofano, (%)	0,259	0,259	0,259	0,259	0,259	0,249	0,249	0,249	0,249	0,249	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223
Treonina, (%)	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,955	0,955	0,955	0,955	0,955	0,855	0,855	0,855	0,855	0,855

<sup>1</sup>OSM= Óleo da semente de maracujá; <sup>2</sup> Salinomicina (66ppm);<sup>3</sup>Premix vitamínico (níveis de garantia/kg de ração): Vitamina A (min) 10.000 U.I.; Vitamina D3 (min) 2.500 U.I.; Vitamina E (min) 17,5 U.I.; Vitamina K3 (min) 2 mg; Vitamina B1 (min) 1,5 mg; Vitamina B2 (min) 7,5 mg; Niacina (min) 25 mg; Ácido pantatênico 15mg; Vitamina B6 (min) 2 mg; Ácido fólico (min) 0,5 mg; Biotina (min) 60 mcg; Vitamina B12 (min) 15 mcg;<sup>4</sup>Premix Mineral (níveis de garantia/kg de ração): Ferro (min) 30 mg; Cobre (min) 6 mg; Manganês (min) 70 mg; Zinco (min) 50 mg; Iodo (min) 1 mg; Selênio (min) 0,35 mg; Cobalto (min) 0,2 mg.

## 1343 2.1 Atividade das enzimas do sistema antioxidante

1344 Para determinação da atividade da superóxido dismutase, catalase e,  
1345 glutathione peroxidase, foi coletado um fragmento do fígado de 8 aves/tratamento,  
1346 com 35 dias de idade, inserido numa solução tampão fosfato de sódio 110mM  
1347 (pH 7,4). A quantidade de tampão foi na proporção de dez vezes o peso do tecido  
1348 por micrograma. Após a adição do tampão as amostras foram centrifugadas a  
1349 1500 rpm durante 20 minutos na temperatura de 4°C. Após o término da  
1350 centrifugação o sobrenadante foi retirado, transferido em microtubos de plásticos  
1351 e armazenados a -80°C. As análises da atividade das enzimas antioxidantes  
1352 foram realizadas segundo diferentes autores, superóxido dismutase (SOD) de  
1353 acordo com a metodologia de Beauchamp e Fridovich (1971), catalase (CAT)  
1354 de acordo com o método descrito por Sinha (1972) e, glutathione peroxidase  
1355 (GPx) baseada no método descrito por Flohé e Günzler (1984).

## 1356 2.2 Capacidade antioxidante e peroxidação lipídica

1357 A capacidade antioxidante do soro foi avaliada pelo método do DPPH e  
1358 leitura realizada em espectrofotometria UV-visível (CHRZCZANOWICZ *et al.*,  
1359 2008; NASSER *et al.*, 2011). Uma mistura de proporção 1:1 do soro/acetona  
1360 foram homogeneizados e incubados por 2 minutos, posteriormente centrifugadas  
1361 durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C, para desproteinização da amostra. O  
1362 sobrenadante retirado é o soro desproteinizado. Antes do ensaio, uma solução  
1363 0,1 M de DPPH em metanol foi preparada e incubada na ausência de luz. A  
1364 absorvância foi lida a 515nm, 30 minutos após a mistura. A inibição  
1365 (descoloração) do radical DPPH foi calculada como a percentagem relativa de  
1366 absorvância da amostra no momento da leitura e comparada com um branco.

1367 A peroxidação lipídica no sangue foi determinada pela avaliação do  
1368 malonaldeído (MDA) segundo metodologia descrita por Buege e Aust (1984),  
1369 sendo que foram adicionados, em tubos de vidro, 200µL de plasma seguido por  
1370 800µL de solução tampão, preparada anteriormente e 2 ml de solução padrão  
1371 contendo ácido tiobarbitúrico. A mistura foi agitada e, em seguida levada para  
1372 banho maria a 100 C° por 15 minutos. Posteriormente, a solução foi resfriada em  
1373 gelo e centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos a 4C°. A leitura foi realizada em  
1374 espectrofotômetro (532nm).

### 1375 2.3 Análise proteômica do plasma de frangos

1376 Alíquotas das amostras de plasma coletadas com 35 dias de idade das  
1377 aves (9 animais/tratamento) foram utilizadas para estudo do proteoma  
1378 (2D\_PAGE e ESI MS/MS), coletadas imediatamente ao abate, congeladas em  
1379 nitrogênio líquido e transportadas para o laboratório de biologia molecular, onde  
1380 foram mantidas em freezer a -80°C. Para a realização da análise foi realizado  
1381 um *pool*/tratamento de cada grupo experimental. Para o processo de extração  
1382 das proteínas das amostras de plasma foram utilizados 200 µl de plasma do *pool*  
1383 de cada amostra, onde em microtubos de 2 ml foi adicionado 400 µL de acetona  
1384 80% gelada, para precipitação das proteínas e remover os possíveis  
1385 interferentes no processo eletroforético, tais como sais e surfactantes aniônicos  
1386 e, após 1 h 30 min em geladeira o mesmo foi submetido à centrifugação a 10.000  
1387 rpm, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* utilizado para  
1388 quantificação de proteínas totais (VIEIRA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2017).

1389 A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pelo  
1390 método do Biureto (DOUMAS *et al.*, 1981) sendo que, um total de 50 µL de  
1391 amostra ou padrão e 2,5 mL do reativo de Biureto foram misturados e levados a

1392 banho-maria a 32°C por 10 min. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as  
1393 leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 545nm. Essa quantificação é  
1394 realizada para calcular a massa de 375 µg de proteína a serem aplicadas em  
1395 cada fita de eletroforese com volume fixo em 250 µL.

1396 Eletroforese bidimensional: Todas as determinações de concentração de  
1397 proteína total foram feitas antes das análises proteômicas em todos os grupos  
1398 experimentais. Na 2D-PAGE, aproximadamente 375 µg de proteínas de cada  
1399 *pellet* proteico foram aplicadas em fitas isoeletricas (IEF) de 13 cm contendo gel  
1400 pré-fabricado e anfólitos de gradiente de pH 3 a 10, a fita ficou em contato com  
1401 a amostra aproximadamente 12 horas, em caixa de hidratação contendo óleo  
1402 mineral para que não ocorra o ressecamento das fitas (BRAGA *et al.*, 2015).

1403 Com o auxílio do equipamento Ettan IPGphor, as fitas que ficaram em  
1404 contato com a amostra durante aproximadamente 12 horas, passaram pelo  
1405 processo de focalização isoeletrica (1D ou primeira dimensão). Nesse processo,  
1406 as proteínas foram separadas com base no seu ponto isoeletrico em função da  
1407 passagem de corrente elétrica gerada pelo equipamento. O processo de  
1408 focalização isoeletrica durou aproximadamente cinco horas e em seguida, as  
1409 fitas foram reidratadas com tampão específico (ureia, SDS, glicerol, Tris-HCl,  
1410 azul de bromofenol) em duas etapas: a primeira adicionando Dithiothreitol (DTT)  
1411 a essa solução e na segunda substituindo o DTT por iodoacetamida (IAA) .  
1412 Posteriormente, as fitas foram transferidas para gel de poliacrilamida (12,5%)  
1413 para separação em segunda dimensão (2D). Nessa etapa as proteínas foram  
1414 fracionadas no gel de poliacrilamida em função da sua massa molecular. Após a  
1415 corrida eletroforética, as proteínas foram fixadas no gel por 40 minutos utilizando  
1416 uma solução contendo ácido acético, etanol e água deionizada e coradas com

1417 *Coomassie Blue* G-250 por 72 horas. Após esse passo, os géis foram lavados  
1418 com água ultrapura para visualização dos *spots* proteicos (CANDIANO *et al.*,  
1419 2004).

1420 Os géis dos grupos experimentais, todos em triplicata, foram escaneados  
1421 e as imagens analisadas por meio do *software Image Master Platinum v.7.0* para  
1422 obtenção de parâmetros como número de *spots*, percentual de correlação  
1423 (*matching*) entre os géis do mesmo tratamento, ponto isoelétrico e massa  
1424 molecular dos *spots* proteicos, bem como a expressão desses *spots* proteicos  
1425 em diferentes tratamentos (LIMA *et al.*, 2010).

1426 Espectrometria de massas: Os *spots* proteicos diferencialmente  
1427 expressos entre tratamentos foram extraídos dos géis com auxílio de bisturi,  
1428 recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e transferidos para  
1429 microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) e submetidos às seguintes  
1430 etapas: remoção do corante, redução e alquilação das proteínas e digestão  
1431 trípica utilizando solução de tripsina 10 ng mL<sup>-1</sup>.

1432 Os segmentos de gel foram lavados por três vezes, em uma solução  
1433 contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM  
1434 por 30 minutos, pois os fragmentos de *spots* deveriam estar totalmente  
1435 descorados. Em seguida, foram desidratados em ACN 100% por 10 minutos por  
1436 duas vezes, deixando evaporar o resíduo remanescente em temperatura  
1437 ambiente. Após esse período, os *spots* foram reduzidos com solução de DTT 20  
1438 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 minutos a 56 °C, removido o líquido e  
1439 substituído por IAA a 55 mM em AmBic 50 mM, incubados por 30 minutos no  
1440 escuro, em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram lavados em  
1441 AmBic 25 mM e desidratados em ACN 100% (SHEVCHENKO *et al.*, 2006).

1442 A digestão triptica foi feita com 15  $\mu$ L de solução contendo 150 ng de  
1443 tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, EUA) em AmBic 25 mM por  
1444 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 50  $\mu$ L de AmBic 25 mM e incubou-se a  
1445 37 °C por 14 horas. Após 14 horas, a ação da tripsina foi interrompida pela adição  
1446 de 15  $\mu$ L de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v) e os  
1447 peptídeos eluídos com duas lavagens com solução de eluição A (ACN 50% v/v  
1448 e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B  
1449 (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%,  
1450 a 45 °C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40  
1451 KHz de frequência fixa e potência de 30W. A solução peptídica resultante foi  
1452 concentrada a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) (SHEVCHENKO *et al.*,  
1453 2006). Em seguida a amostra passou por um processo de limpeza utilizando  
1454 colunas C18 ZipTip (Millipore) com resina (SHEVCHENKO *et al.*, 2006).

1455 A identificação das proteínas de cada *spot* foi realizada em nano  
1456 ACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas  
1457 Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nano  
1458 ACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3  
1459 column 75 mm x 150 mm; 1.8  $\mu$ m, Waters), previamente equilibrada com 7% da  
1460 fase móvel B (100% ACN + 0.1% ácido fórmico). Os peptídeos foram separados  
1461 através de um gradiente linear de 7-85% de fase móvel B durante 20 min com  
1462 fluxo de 0.35  $\mu$ L/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi  
1463 operado em modo íon positivo, com resolução de pelo menos 20000 FWHM (full-  
1464 width halfmaximum) e em modo de aquisição independente de dados (LC-MSE),  
1465 com o tempo de aquisição de dados de 20 min por *spot*. Os dados foram  
1466 coletados a uma energia de colisão constante de 15 eV no modo MS de baixa

1467 energia e 45 eV modo de alta energia. A correção das massas foi realizada  
1468 utilizando o calibrante externo (Glu-1-fibrinopeptide B, 1 pmol/mL) infundido  
1469 através do lock mass a um fluxo de 300 nL/min e amostrado a cada 30s  
1470 (SHEVCHENKO *et al.*, 2006).

1471 Os espectros de massa foram processados utilizando o software Protein  
1472 Lynx Global Server (PLGS) versão 3.0. A identificação das proteínas foi obtida  
1473 através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados  
1474 obtidos foram buscados em banco de dados específico do UniProt (Universal  
1475 Protein Resource). Para a busca foram utilizados os seguintes parâmetros:  
1476 Carbamidomethyl-C (modificação fixa), oxidation M e phosphoryl STY  
1477 (modificações variáveis); precisão de massa igual a 10 ppm, com tolerância do  
1478 fragmento igual a 0.1 Da contra a massa teórica de peptídeos, com pelo menos  
1479 um peptídeo por proteína, dois íons fragmentos por peptídeo e cinco íons  
1480 fragmentos por proteína; clivagens perdidas: 1; False discovery rate: 4 (BRAGA  
1481 *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2015).

1482 A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se análise de  
1483 variância com o auxílio do pacote estatístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2008) e,  
1484 quando significativas, as médias foram comparados pelo teste de Tukey a 5%.

### 1485 3. Resultados

1486 Em relação aos resultados de porcentagem (%) de redução do radical  
1487 DPPH em amostras de soro sanguíneo de frangos de corte com 21 dias de idade  
1488 (Tabela 16), foi observado interação significativa ( $p=0,0093$ ) entre os fatores  
1489 (temperatura e, níveis de inclusão de OSM). Frangos de corte criados em  
1490 ambiente termoneutro apresentaram uma resposta crescente da % de redução  
1491 de DPPH, sendo que quanto maior o nível de OSM (0,90%) maior a % redução

1492 do radical DPPH. Indicando que os níveis de inclusão de OSM afetam a resposta  
 1493 antioxidante. Não houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao TBARS  
 1494 plasmático.

1495 Na análise proteômica do plasma sanguíneo (2D-PAGE) houve diferença  
 1496 significativa para os tratamentos com maior inclusão de OMS (0,9% em estresse  
 1497 térmico e termoneutralidade) para o *spot Alcohol dehydrogenase 1*, gene ADH1  
 1498 (Tabela 17). A vitamina A (retinol) é um nutriente essencial para regulação do  
 1499 desenvolvimento, mas tóxico em grandes quantidades. Estudos anteriores  
 1500 revelaram que o álcool de-hidrogenase ADH1 é necessária para a eliminação  
 1501 eficiente de excesso de retinol para prevenir a toxicidade (MOLOTKOV *et al.*,  
 1502 2003).

1503 Tabela 16- Porcentagem de sequestro de DPPH (%) e, TBARS plasmático ( $\mu\text{mol}$   
 1504 de MDA/L) em amostras de soro e, plasma sanguíneo de frangos de corte, com  
 1505 21 dias de idade, recebendo diferentes níveis de óleo de semente de maracujá.

		DPPH (%)	TBARS ( $\mu\text{mol}$ de MDA/L)
Temperatura	Níveis (%)		
Estresse	0%	16,31 c	13,95
	0,30%	19,08 c	18,85
	0,50%	16,40 c	9,80
	0,70%	13,98 c	11,83
	0,90%	11,53 c	16,47
Termoneutra	0%	25,97 bc	14,86
	0,30%	30,38 abc	13,13
	0,50%	44,84 ab	10,40
	0,70%	45,92 ab	17,84
	0,90%	48,18 a	13,95
<b>Efeitos principais</b>			
Temperatura			
Estresse		15,46	14,18
Termoneutra		39,06	14,04
<b>Níveis (%)</b>			
	0%	21,14	14,41
	0,30%	24,73	15,99
	0,50%	30,62	10,10
	0,70%	29,95	14,83

	0,90%	29,85	15,21
<b>Probabilidades, P ≤</b>			
Temperatura		<0,0001	0,943
Níveis (%)		0,1950	0,4337
Temperatura x Níveis (%)		0,0093	0,3870
EPM		2,062	0,959

1506 DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazila; TBARS: substâncias reativas ao ácido  
 1507 tiobarbitúrico; EPM: Erro Padrão da Média; Médias seguidas por diferentes letras  
 1508 minúsculas e, maiúsculas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey  
 1509 (P<0,05).

1510  
 1511 Tabela 17- Proteína relacionada ao retinol, diferencialmente expressa em  
 1512 frangos de corte.

Spot	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
167, 168, 169, 170, 171, 246	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	1313.948	6.21/36.849

1513 Spots proteicos relacionados ao estresse oxidativo (Tabela 18) foram  
 1514 diferencialmente expressos na análise proteômica (2D-PAGE) do plasma  
 1515 sanguíneo, como *DnaJ homolog subfamily B member 6*, gene DNAJB6: As  
 1516 proteínas da família DNAJ são amplamente conhecidas por atuarem como co-  
 1517 chaperona da maquinaria HSP70, um componente central do sistema de controle  
 1518 de qualidade proteico que garante a homeostase celular através de ciclos de  
 1519 (re)-enovelamento de proteínas (KAMPINGA *et al.*, 2010). *Apolipoprotein A-I* ,  
 1520 gene APOA1: participa do transporte reverso do colesterol dos tecidos para o  
 1521 fígado para excreção, também tem ligação de proteína de choque térmico,  
 1522 interagindo seletivamente e não covalentemente com uma proteína de choque  
 1523 térmico, além disso participa do desenvolvimento da glândula adrenal e do  
 1524 glicocorticoides. *Creatine kinase*, gene CKM: resposta ao calor, como resultado  
 1525 de um estímulo de calor, um estímulo de temperatura acima da temperatura ideal  
 1526 para aquele organismo. *Homeodomain-only protein*, gene HOPX: Proteína  
 1527 homeodomínio atípica que não se liga ao DNA. O homeobox da proteína apenas

1528 homeodomínio (HOPX, anteriormente HOP). Pode atuar como co-chaperona  
 1529 para proteínas chaperonas HSPA1A e HSPA1B e auxiliar no redobramento de  
 1530 proteínas mediadas por chaperonas (UniProt).

1531 Tabela 18 – Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, diferencialmente  
 1532 expressas em frangos de corte.

Spot	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
196	Q5F3Z5	DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6	21.516	8.86/36.675
1, 99, 147, 168, 175, 176, 179, 180, 181, 183, 184, 214, 215, 220, 230, 237	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	402.871	5.59/30.680
14, 15, 91, 211	P00565	CKM	Creatine kinase M-type	414.9688	6.50/43.328
76, 89, 208, 271	Q8JHU0	HOPX	Homeodomain-only protein	170.1757	4.92/8.342

1533 Em relação aos resultados da atividade enzimática, com 35 dias de idade  
 1534 dos frangos de corte, foi observado diferença significativa ( $p=0,0037$ ) para o fator  
 1535 temperatura, sobre a atividade da enzima catalase (CAT) de frangos de corte,  
 1536 que foi maior em ambiente termoneutro quando comparado ao ambiente de  
 1537 estresse por calor.

1538 Tabela 19 - Atividade de enzimas do sistema antioxidante de frangos de corte,  
 1539 com 35 dias de idade, recebendo diferentes níveis de óleo de semente de  
 1540 maracujá.

Temperatura	Níveis (%)	SOD (U/mg proteína)	CAT (U/mg proteína)	GPx (U/mg proteína)
Estresse		31,82	1,85 b	5,34
Termoneutra		31,90	2,51 a	5,32
	0%	31,19	1,80	4,90
	0,30%	32,12	2,22	5,13
	0,50%	31,48	1,85	5,22
	0,70%	30,56	2,70	5,54
	0,90%	33,97	2,34	5,89

Probabilidades,  $P \leq$

Temperatura	0,954	0,0037	0,948
Níveis (%)	0,677	0,06	0,242
Temperatura x Níveis (%)	0,842	0,133	0,849
EPM	0,849	0,121	0,144

1541 SOD: Superóxido Dismutase; CAT: Catalase; GPx: Glutathione Peroxidase; EPM:  
1542 Erro Padrão da Média. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas, na  
1543 mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).  
1544

1545 Além disso, na análise proteômica do plasma sanguíneo (2D-PAGE) a  
1546 proteína *Hemoglobin subunit epsilon*, gene HBE foi diferencialmente expressa,  
1547 essa proteína participa do processo catabólico de peróxido de hidrogênio, assim  
1548 como a enzima catalase. Assim como a proteína *Nuclear receptor coactivator 7*,  
1549 gene NCOA7 que foi diferencialmente expressa em resposta ao estresse  
1550 oxidativo (Tabela 20), podendo ser resultante da exposição a níveis elevados de  
1551 espécies reativas de oxigênio, por exemplo, ânions superóxidos, peróxido de  
1552 hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais hidroxila (UniProt).

1553 Tabela 20 - Proteínas relacionadas ao processo catabólico de peróxido de  
1554 hidrogênio, diferencialmente expressas em frangos de corte.

Spot	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
248	P02128	HBE	Hemoglobin subunit epsilon	92.027 4	9.07/16.603
154	Q5ZMS4	NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7	23.116 5	5.54/102.062

1555 Além disso, foram diferencialmente expressos *spots* proteicos  
1556 relacionados a estímulo e regulação do citocromo P450 (Tabela 21). *Cytochrome*  
1557 *P450 2H1*, gene CYP2H1: As principais enzimas CYP envolvidas no  
1558 metabolismo hepático em aves são as isoformas CYP1A1 (Klein *et al.*, 2003) e  
1559 CYP2H1 (Hamilton *et al.*, 1993). Foi demonstrado que a superexpressão dessas  
1560 isoformas de CYP induz estresse oxidativo crônico ao gerar mais ROS (HARI  
1561 KUMAR E KUTTAN, 2006). *Membrane-associated progesterone receptor*  
1562 *component 1*, gene PGRMC1: Componente de um complexo de proteínas de

1563 ligação à progesterona. Tem muitas funções celulares relacionadas (homeostase do  
 1564 heme, interação com CYPs) (UniProt). Dados sugerem um papel para esta  
 1565 família de proteínas de ligação ao heme na regulação das enzimas do citocromo  
 1566 P450 (HUGHES *et al.*, 2007).

1567 Tabela 21- Proteínas relacionadas ao estímulo e regulação do citocromo P450,  
 1568 diferencialmente expressas em frangos de corte.

Spot	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
87	P05180	CYP2H1	Cytochrome P450 2H1	208.277 2	6.45/56.261
209	Q5ZKN 2	PGRMC 1	Membrane-associated progesterone receptor component 1	86.5684	9.05/29.909

1569 Como citado anteriormente os géis foram realizados em triplicata (Tabela  
 1570 22), sendo representado pelas letras A, B e C.

1571 Tabela 22 - Percentual de correlação (PercentMatches) entre as repetições de  
 1572 cada tratamento e quantidade spot em cada repetição de cada tratamento.

Temperatura	Tratamento	Repetição	Número de spots	PercentMatches
Termoneutra	0%	A	200	96
		B	186	87
		C	206	87
	0,5%	A	54	83
		B	55	75
		C	48	84
	0,9%	A	145	91
		B	148	94
		C	149	92
Estresse	0%	A	116	81
		B	122	73
		C	98	95
	0,5%	A	35	88
		B	38	90
		C	39	93
	0,9%	A	125	97
		B	125	95
		C	128	96

1573

1574 4. Discussão

1575 Diversos compostos foram identificados no óleo da semente de maracujá,  
1576 tais como tocoferóis, fitoesteróis, carotenoides e compostos fenólicos, que são  
1577 conhecidos por proteger o organismo contra a ação de oxidantes (PIOMBO *et*  
1578 *al.*, 2006; DA SILVA e JORGE, 2017). De Santana *et al.* (2015), estudando a  
1579 composição química do óleo da semente de maracujá de diferentes espécies e  
1580 variedades, sendo uma espécie de sementes doada pela empresa Extrair  
1581 (mesma empresa fornecedora do óleo de semente de maracujá do presente  
1582 estudo), constataram a presença de compostos com ação antioxidante, entre  
1583 eles o  $\beta$ -caroteno nos níveis de 75,63 mg/100g de óleo. O *spot* proteico *Alcohol*  
1584 *dehydrogenase 1*, gene ADH1, foi diferencialmente expresso nos tratamentos  
1585 com maior inclusão de OSM (0,9%). Estudos anteriores (MOLOTKOV *et al.*,  
1586 2003) revelaram que o *alcohol dehydrogenase 1* ADH1 é necessária para a  
1587 eliminação eficiente de excesso de retinol para prevenir sua toxicidade,  
1588 demonstrando assim que o mecanismo envolve a oxidação do excesso de retinol  
1589 para ácido retinóico (RA). A vitamina A (retinol) é um nutriente essencial para  
1590 regulação do desenvolvimento, mas tóxico em grandes quantidades. ADH1  
1591 desempenha um papel dominante na primeira etapa da via de eliminação  
1592 (oxidação de retinol para retinaldeído) (MOLOTKOV *et al.*, 2003).

1593 Dada a função desses compostos, os mesmos podem ter influenciado os  
1594 valores de % de redução do radical DPPH, pois sendo o DPPH um radical que  
1595 na presença de compostos antioxidantes muda sua coloração e é reduzido, o  
1596 maior o valor de redução do DPPH indica maior presença de substâncias  
1597 antioxidantes na amostra. Assim, o resultado encontrado apresentou maior % de  
1598 redução de DPPH com o maior nível de inclusão do OSM. Porém, quando  
1599 observamos os resultados dos animais criados em estresse por calor o OSM não

1600 foi capaz de gerar a mesma resposta. Confirmando a presença do retinol nas  
1601 amostras de 0,9% de inclusão de OSM com a expressão diferenciada de ADH1,  
1602 componente que possivelmente causou a alteração nos valores de DPPH das  
1603 amostras do tratamento 0,9% de inclusão de OSM.

1604 O aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante é  
1605 considerado como resposta protetora contra o estresse oxidativo (MATES *et al.*,  
1606 1999; DEVI *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2000). Além disso na análise proteômica  
1607 do plasma sanguíneo a proteína *Hemoglobin subunit epsilon*, foi  
1608 diferencialmente expressa no tratamento 0,9% de frangos de corte criados em  
1609 ambiente de estresse, essa proteína participa do processo catabólico de  
1610 peróxido de hidrogênio (UniProt) assim como a enzima catalase. Outro *spot*  
1611 diferencialmente expresso foi o *nuclear receptor coactivator 7*, gene NCOA7  
1612 que foi diferencialmente expresso no tratamento 0% de frangos de corte criados  
1613 em ambiente termoneutro, esse *spot* foi diferencialmente expresso em resposta  
1614 ao estresse oxidativo, podendo ser resultante da exposição a níveis elevados de  
1615 espécies reativas de oxigênio, por exemplo, ânions superóxidos, peróxido de  
1616 hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais hidroxila (UniProt). NCOA7, tem atividade  
1617 antioxidante, é um membro da família OXR de proteínas de resistência à  
1618 oxidação (YU *et al.*, 2015). O produto do gene NCOA7 é uma proteína associada  
1619 ao receptor de estrogênio que é altamente semelhante ao produto do gene OXR1  
1620 humano, que atua na resistência à oxidação. Durand *et al.* (2007) descobriram  
1621 que NCOA7, como OXR1 pode suprimir o fenótipo mutador oxidativo.

1622 A expressão diferenciada de HBE no tratamento 0,9% de frangos de corte  
1623 criados em ambiente de estresse e, a expressão diferenciada NCOA7 no  
1624 tratamento 0% de frangos de corte criados em ambiente termoneutro, explica o

1625 resultado encontrado para a atividade da enzima catalase. Pois HBE está  
1626 relacionada com o processo de catabolismo do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
1627 assim como a enzima catalase, sua expressão diferenciada em ambiente de  
1628 estresse por calor justifica a menor atividade da enzima catalase nesse  
1629 ambiente, pois essa enzima também é responsável pela decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
1630 (CHELIKANI *et al.*, 2004). Assim como a expressão diferenciada de NCOA7 em  
1631 ambiente termoneutro, pois NCOA7 pode ser resultante da exposição a níveis  
1632 elevados de espécies reativas de oxigênio, por exemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, justificando a  
1633 maior atividade da enzima catalase nesse ambiente.

1634       Devemos lembrar que não apenas as enzimas do sistema antioxidantes  
1635 atuam na proteção do organismo contra os oxidantes, mas também, compostos  
1636 não enzimáticos. As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem moléculas  
1637 com capacidade de sequestrar ERO (FINKEL *et al.*, 2000; VALKO *et al.*, 2007)  
1638 contendo compostos sintetizados pelo próprio organismo (glutathiona, bilirrubina,  
1639 piruvato, coenzima Q, melatonina, ácido úrico) e, compostos obtidos a partir da  
1640 dieta (retinol, tocoferol, ascorbato, carotenoides, flavonoides) (HALLIWELL *et al.*,  
1641 2015).

1642       Além disso, vários *spots* proteicos relacionados as chaperonas  
1643 moleculares foram diferencialmente expressas nos tratamentos: 0,3%, 0,5% e,  
1644 0,9% de inclusão de OSM em ambas as temperaturas de criação:

1645       1) *Apolipoprotein A-I*, gene APOA1: participa do transporte reverso do  
1646 colesterol dos tecidos para o fígado para excreção, promovendo o efluxo do  
1647 colesterol dos tecidos e também tem ligação com proteína de choque térmico.  
1648 Interagindo seletivamente e não covalentemente com uma proteína de choque

1649 térmico, qualquer proteína sintetizada ou ativada em resposta ao choque térmico  
1650 (UniProt).

1651 2) *Creatine kinase M-type*, gene CKM: catalisa reversivelmente a  
1652 transferência de fosfato entre ATP e vários fosfogênicos (por exemplo, fosfato de  
1653 creatina). É resultado de um estímulo de calor, um estímulo de temperatura  
1654 acima da temperatura ideal para o organismo (UniProt).

1655 3) *DnaJ homolog subfamily B member 6*, gene DNAJB6: é uma subfamília  
1656 de HSP40, também conhecida como DNAJ, é uma subdivisão do grande grupo  
1657 de Heat Shock Proteins (HSPs), o qual contém proteínas com função de  
1658 chaperonas moleculares que conduzem o sistema de controle de qualidade  
1659 proteico das células (BALCHIN *et al.*, 2016; MUSSKOPF *et al.*, 2018). Além disso  
1660 DNAJB6 não requer uma regulação positiva simultânea de Hsp70 para sua  
1661 atividade chaperona, (DAI *et al.*, 2007). Hageman *et al.*, (2010) sugerem que as  
1662 proteínas do tipo DNAJB6 agem como pequenas proteínas HSP. Mas, ao  
1663 contrário dos HSPs que não têm domínios conhecidos para recrutar HSPA para  
1664 processamento posterior, as proteínas do tipo DNAJB6 podem recrutar HSPA  
1665 por meio de seu domínio J para ligar o complexo substrato-chaperone para a  
1666 degradação de proteínas. Por meio desse modo duplo de ação, as proteínas do  
1667 tipo DNAJB6 estão entre os mais fortes protetores contra a toxicidade da  
1668 proteína associada à agregação de proteínas detectada até agora (DAI *et al.*,  
1669 2007).

1670 4) *Homeodomain-only protein*, gene HOPX: Proteína homeodomínio  
1671 atípica que não se liga ao DNA. O homeobox da proteína apenas homeodomínio  
1672 (HOPX, anteriormente HOP). Pode atuar como co-chaperona para proteínas

1673 chaperonas HSPA1A e HSPA1B e auxiliar no redobramento de proteínas  
1674 mediadas por chaperonas (UniProt).

1675 Dada a importância das chaperonas moleculares e o seu papel na  
1676 fisiologia animal, sua expressão diferenciada nos tratamentos com inclusão de  
1677 OSM é de grande importância, uma vez que, as chaperonas moleculares são  
1678 consideradas proteínas relacionadas a tolerância ao estresse (Schirmer *et al.*,  
1679 1996).

1680 Também *spots* relacionados a produção e regulação do citocromo P450.  
1681 *Membrane-associated progesterone receptor component 1*, gene PGRMC1:  
1682 Componente de um complexo de proteínas de ligação à progesterona. Tem  
1683 muitas funções celulares relatadas (homeostase do heme, interação com CYPs)  
1684 (UniProt). São *chaperone* heme intracelular. Regula a síntese de heme por meio  
1685 de interações com FECH e atua como um doador de heme para pelo menos  
1686 algumas hemoproteínas. Essa família de proteínas desempenha um papel na  
1687 regulação das enzimas do citocromo P450. PGRMC1 pode funcionar como um  
1688 regulador geral do citocromo P450. A presença de *PGRMC1* em plantas, moscas  
1689 e vermes sugerem que esta regulação das enzimas do citocromo P450 pode ser  
1690 amplamente conservada (HUGHES *et al.*, 2007). Observações sugerem que  
1691 PGRMC1 modula a atividade das enzimas P450 (Mallory *et al.*, 2005). Esse *spot*  
1692 foi diferencialmente expresso nos tratamentos de 0,9% de inclusão de OSM em  
1693 ambos os ambientes de criação (termoneutralidade e estresse por calor).

1694 *Cytochrome P450 2H1*, gene CYP2H1: As principais enzimas CYP  
1695 envolvidas no metabolismo hepático em aves são as isoformas CYP1A1 (Klein  
1696 *et al.*, 2003) e CYP2H1 (Hamilton *et al.*, 1993). Foi demonstrado que a  
1697 superexpressão dessas isoformas de CYP induz estresse oxidativo crônico ao

1698 gerar mais ROS (Hari Kumar e Kuttan, 2006). É evidente que a ativação  
1699 transcricional das isoformas CYP1A1 e CYP2H1, tem o potencial de aumentar o  
1700 estresse oxidativo (HUGHES *et al.*, 2007). Esse spot proteico foi  
1701 diferencialmente expresso no tratamento 0% de inclusão de OSM de animais  
1702 criados em ambiente termoneutro.

1703 Dessa maneira é evidente que a inclusão de OSM tem efeitos positivos  
1704 sobre o estresse oxidativo, uma vez que a proteína PGRMC1 foi expresso nos  
1705 tratamentos com maior inclusão de OSM e, têm a capacidade de controlar a  
1706 atividade de citocromo P450, que por sua vez foi expresso no tratamento sem a  
1707 inclusão de OSM e, induz o estresse oxidativo pois gera mais ROS, assim  
1708 aumentando o estresse oxidativo.

## 1709 5. Conclusão

1710 Houve maior % de redução de DPPH com a maior inclusão do OSM, assim  
1711 como a proteína ADH1, foi diferencialmente expresso nos tratamentos com maior  
1712 inclusão de OSM (0,9%), afirmando a presença de retinol no tratamento 0,9% de  
1713 inclusão de OSM que, provavelmente foi responsável pela maior % de redução  
1714 do DPPH. Além disso, a expressão diferenciada da proteína HBE no tratamento  
1715 0,9% de frangos de corte criados em ambiente de estresse, explica o resultado  
1716 encontrado para a atividade da enzima catalase. Pois HBE está relacionada com  
1717 o processo de catabolismo do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) assim como a  
1718 enzima catalase, sua expressão diferenciada em ambiente de estresse por calor  
1719 justifica a menor atividade da enzima catalase nesse ambiente. Além disso,  
1720 vários *spots* proteicos relacionados as chaperonas moleculares foram  
1721 diferencialmente expressas nos tratamentos 0,5% e 0,9% de inclusão de OSM  
1722 em ambas as temperaturas de criação, sua expressão diferenciada nos

1723 tratamentos com inclusão de OSM é de grande importância, uma vez que, as  
1724 chaperonas moleculares são consideradas proteínas relacionadas a tolerância  
1725 ao estresse. Ainda, a proteína PGRMC1 foi diferencialmente expresso nos  
1726 tratamentos de 0,9% de inclusão de OSM em ambos os ambientes de criação,  
1727 essa proteína modula a atividade das enzimas P450 que induz estresse oxidativo  
1728 crônico ao gerar mais ROS. O OSM se apresentou como grande aliado ao  
1729 combate do estresse, seja incluindo retinol no organismo, catabolizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  
1730 participando do enovelamento, oligomerização, transporte para um  
1731 compartimento subcelular e regulação da conformação em estados ativos e  
1732 inativos das proteínas, assim como modulando a atividade do citocromo P450.  
1733

- 1735 ALDEA M, GARÍ E, COLOMINA N. Control of cell cycle and cell growth by  
1736 molecular chaperones. *Cell Cycle* 2007; 6 (21): 2599-603.
- 1737 BALCHIN D, HAYER-HARTL M, HARTL FU. In vivo aspects of protein  
1738 folding and quality control. *Science* 2016; 353 (6294): 4354.
- 1739 BEAUCHAUMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assay  
1740 and applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1971; 44: 276-287.
- 1741 BRAGA CP, BITTARELLO AC, PADILHA CCF, LEITE AL, MORAES PM,  
1742 BUZALAF MAR, ZARA LF, PADILHA PM. Mercury fractionation in dourada  
1743 (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using  
1744 metalloproteomic strategies. *Talanta* 2015; 132: 239– 244.
- 1745 BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation, *Methods. Methods*  
1746 *in*, 1984.
- 1747 BUKAU B, HORWICH AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.  
1748 *Cell* 1998; 92: 351-366.
- 1749 CANDIANO G, BRUSCHIM, MUSANTE L, SANTUCCIL, GHIGGERI GM,  
1750 CARNEMOLLA B, RIGHETTI PG. Blue silver: A very sensitive colloidal  
1751 Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25 (9):  
1752 1327–1333.
- 1753 CASTRO SV, LOBO CH, FIGUEIREDO JR. Proteínas de choque térmico  
1754 Hsp70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinária*  
1755 *Brasileira* 2013; 7: 261-271.
- 1756 CHELIKANIP, FITA I, LOEWEN PC. Diversity of structures and properties  
1757 among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004; 61: 192-208.
- 1758 CHRZCZANOWICZ J, GAWRON A, ZWOLINSKA A, DE GRAFT-  
1759 JOHNSON J, KRAJEWSKI W, KROL M, MARKOWSKI J, KOSTKA T, NOWAK  
1760 D. Simple method for determining human serum 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl  
1761 (DPPH) radical scavenging activity—possible application in clinical studies on  
1762 dietary antioxidants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2008; 46 (3):  
1763 342-349.
- 1764 DA SILVA AC, JORGE N. Bioactive compounds of oils extracted from fruits  
1765 seeds obtained from agroindustrial waste. *European Journal of Lipid Science and*  
1766 *Technology* 2017; 119 (4): 1600024.
- 1767 DAI C, WHITESELL L, ROGERS AB. Lindquist S. Heat shock factor 1 is a  
1768 powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 2007; 130: 1005-1018.
- 1769 DE SANTANA FC, SHINAGAWA FB, ARAUJO EDS, COSTA AM,  
1770 MANCINI-FILHO J. Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian  
1771 *Passiflora* seed oils. *Journal of food science* 2015; 80 (12): C2647-C2654.
- 1772 DEVI GS, PRASAD MH, SARASWATHI I, RAGHU D, RAO DN, REDDY  
1773 PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of  
1774 leukemias. *Clinical Chimica Acta* 2000; 293 (1-2): 53-62.
- 1775 DOUMAS BT, BAYSE DD, BORNER K, CARTER RJ, ELEVITCH F,  
1776 GARBER CC, WESTGARD JO. A candidate reference method for determination  
1777 of total protein in serum. II. Test for transferability. *Clinical Chemistry* 1981; 27  
1778 (10): 1651–1654.
- 1779 DURAND M, KOLPAK A, FARRELL T, ELLIOTT NA, SHAO W, BROWN  
1780 M, VOLKERT MR. The OXR domain defines a conserved family of eukaryotic  
1781 oxidation resistance proteins. *BMC cell biology* 2007; 8 (1): 1-10.
- 1782 FIALHO E, MORENO F, ONG T. Nutrição no pós-genoma: fundamentos  
1783 e aplicações de ferramentas omicas. *Revista de Nutrição* 2008; 21: 757-766.

1784 FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of  
1785 ageing. *Nature* 2000; 408 (6809): 239-247.

1786 FLOHÉ L, GÜNZLER WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods*  
1787 *Enzymology* 1984; 105: 114.

1788 FORTI N, DIAMENT J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos  
1789 metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização  
1790 para os clínicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2006; 87 (5): 671-679.

1791 GUILLEMIN N, BONNET M, JURIE C, PICARD B. Variations in the  
1792 abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and  
1793 animal type. *Animal* 2011; 5: 885-894.

1794 HAGEMAN J, RUJANO MA, VAN WAARDE MAWH, KAKKAR V, DIRKS  
1795 RP, GOVORUKHINA N, OOSTERVELD-HUT HMJ, LUBSEN NH, KAMPINGA  
1796 HH. A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses  
1797 toxic protein aggregation. *Molecular cell* 2010; 37 (3): 355-369.

1798 HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. Free radicals in biology and medicine.  
1799 Oxford University Press, USA, 2015.

1800 HAMILTON JW, LOUIS CA, DOHERTY KA, HUNT SR, REED MJ,  
1801 TREADWELL MD. Preferential alteration of inducible gene expression in vivo by  
1802 carcinogens that induce bulky DNA lesions. *Molecular carcinogenesis*, 8(1), 34-  
1803 43. Preferential alteration of inducible gene expression in vivo by carcinogens  
1804 that induce bulky DNA lesions *Molecular Carcinogenic* 1993; 8 (1): 34-43.

1805 HARI KUMAR KB, KUTTAN R. Inhibition of drug metabolizing enzymes  
1806 (cytochrome P450) in vitro as well as in vivo by *Phyllanthus amarus* Schum &  
1807 Thonn *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 1310-1313.

1808 HARTL FU, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol: from  
1809 nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295:1852–1858.

1810 HARTL FU, MARTIN J, NEUPERTW. Protein folding in the cell: the role  
1811 of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*  
1812 1992; 21: 293–322.

1813 HENDRICK JP, HARTL FU. Molecular chaperone functions of heat-shock  
1814 proteins. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 49–384.

1815 HUGHES AL, POWELL DW, BARD M, ECKSTEIN J, BARBUCH R, LINK  
1816 AJ, ESPENSHADE PJ. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450  
1817 enzymes. *Cell metabolism* 2007; 5 (2): 143-149.

1818 KAMPINGA HH, CRAIG E A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins  
1819 as drivers of functional specificity. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2010;  
1820 11 (8): 579–92.

1821 KLEIN PJ, VAN VLEET TR, HALL JO, COULOMBE JR RA. Effects of  
1822 dietary butylated hydroxytoluene on aflatoxin B1-relevant metabolic enzymes in  
1823 turkeys. *Food and chemical toxicology* 2003; 41 (5): 671-678.

1824 LARKINS NT, MURPHY RM, LAMB GD. Influences of temperature,  
1825 oxidative stress, and phosphorylation on binding of heat shock proteins in skeletal  
1826 muscle fibers. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2012; 303: 654–  
1827 665.

1828 LIMA PM, NEVES RDCF, DOS SANTOS FA, PÉREZ CA, Silva MOA,  
1829 ARRUDA MAZ, CASTROE GR, PADILHA PM. Analytical approach to the  
1830 metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SRXRF and FAAS  
1831 after 2D-PAGE separation: preliminary results. *Talanta* 2010; 82: 1052–1056.

1832 LIN H, DECUYPERE E, BUYSE J. Effect of thyroid hormones on the redox  
1833 balance of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2008;  
1834 21 (6): 794-800.

1835 LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*  
1836 1988; 22: 631-677.

1837 MALACRIDA CR, JORGE N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora*  
1838 *edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. *Brazilian Archives of*  
1839 *Biology and Technology* 2012; 55:127-134.

1840 MALLORY JC, CRUDDENG, JOHNSON BL, MO C, PIERSON CA, BARD  
1841 M, CRAVEN RJ. Dap1p, a heme-binding protein that regulates the cytochrome  
1842 P450 protein Erg11p/Cyp51p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and*  
1843 *cellular biology* 2005; 25 (5): 1669-1679.

1844 MATÉS JM, PÉREZ-GÓMEZ C, DE CASTRO I. N. Antioxidant enzymes  
1845 and human diseases. *Clinical biochemistry* 1999; 32 (8): 595-603.

1846 MAYER M, BUKAU B. Hsp70 chaperones: cellular functions and  
1847 molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62: 670–684.

1848 MOLOTKOV A, DUESTER G. Genetic evidence that retinaldehyde  
1849 dehydrogenase Raldh1 (*Aldh1a1*) functions downstream of alcohol  
1850 dehydrogenase *Adh1* in metabolism of retinol to retinoic acid. *Journal of*  
1851 *Biological Chemistry* 2003; 278 (38): 36085-36090.

1852 MUJAHID A, PUMFORD NR, BOTTJE W, NAKAGAWA K, MIYAZAWA T,  
1853 AKIBA Y, TOYOMIZU M. Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal  
1854 muscle induced by acute heat stress. *The Journal of Poultry Science* 2007; 44  
1855 (4): 439-445.

1856 MUSSKOPF MK, MATTOS EPD, BERGINK S. HSP40 / DNAJ  
1857 Chaperones. eLS c, John Wiley & Sons 2018, Ltd., p. 1–11.

1858 NASSER ALM, DOURADO GK, MANJATE DA, CARLOS IZ, CÉSAR TB.  
1859 Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco  
1860 de laranja. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2011; 275-279.

1861 NYANZI SA, CARSTENSEN B, SCHWACKWA comparative study of fatty  
1862 acid profiles of *Passiflora* seed oils from Uganda. *Journal of the American Oil*  
1863 *Chemists' Society* 2005; 82: 41-44.

1864 PAPPAS AC, ZOIDIS E, SURAI PF, ZERVAS G. Selenoproteins and  
1865 maternal nutrition. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2008; 151: 361-  
1866 372.

1867 PICARDB, GAGAOUA M. "Proteomic Investigations of Beef Tenderness."  
1868 *Proteomics in food science: From farm 555 to fork*. Academic Publisher 2017;  
1869 177- 197.

1870 PIOMBO G, BAROUH N, BAREA B, BOULANGER R, BRAT P, PINA M,  
1871 VILLENEUVE P. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*),  
1872 passion fruit (*Passiflora eulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux, Corps*  
1873 *Gras, Lipides* 2006; 13:195-199.

1874 ROSTAGNO HS. et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos:  
1875 composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ª edição. Viçosa, MG:  
1876 Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa 2017; 488.

1877 SHEVCHENKO A, TOMAS H, HAVLI J, OLSEN JV, MANN M. In-gel  
1878 digestion for mass spectrometric characterization of proteins and  
1879 proteomes. *Nature protocols* 2006; 1 (6): 2856.

1880 SINHA AK. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry* 1972;  
1881 47: 389-394.

1882 TAIPALE M, TUCKER G, PENG J, KRYKBAEVA I, LIN ZY, LARSEN B,  
1883 CHOI H, BERGER B, GINGRAS AC, LINDQUIST S. A quantitative chaperone  
1884 interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis  
1885 pathways. *Cell* 2014; 158 (2): 434-448.

1886 THOMAS MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*  
1887 (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 2000; 16 (7-8): 716-718.

1888 TIROLI-CEPEDA AO E RAMOS CHI. An overview of the role of molecular  
1889 chaperones in protein homeostasis. *Protein Pept Lett* 2011; 18: 101–109.

1890 UniProt- Base de conhecimento de proteínas: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). Acesso  
1891 em: 12 de janeiro de 2020.

1892 VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER  
1893 J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human  
1894 disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39 (1):  
1895 44-84.

1896 VALROS A, MUNSTERHJELM C, PUOLANNE E, RUUSUNEN M,  
1897 HEINONEN M, PELTONIEMI OA, PÖSÖ AR. Physiological indicators of stress  
1898 and meat and carcass characteristics in tail bitten slaughterpigs. *Acta Veterinaria*  
1899 *Scandnava* 2013; 30: 55-75.

1900 VIEIRA JCS, BRAGA CP, DE OLIVEIRA G, DO CARMO FEDERICI  
1901 PADILHA C, DE MORAES PM, ZARA LF, DE LIMA LEITE A, BUZALAF MAR,  
1902 DE MAGALHÃES PADILHA P. Correction to: mercury exposure: protein  
1903 biomarkers of mercury exposure in Jaraqui fish from the Amazon region. *Biol*  
1904 *Trace Elem Res* 2017; 183: 164-171.

1905 VIEIRA JCS, CAVECCI B, QUEIROZ JV, BRAGA CP, PADILHA CCF,  
1906 LEITE AL, FIGUEIREDO WS, BUZALAF MAR, ZARA LF, PADILHA PM.  
1907 Determination of the mercury fraction linked to protein of muscle and liver tissue  
1908 of Tucunará (*Cichla spp.*) from the Amazon region of Brazil. *Arch Environ Contam*  
1909 *Toxicol* 2015; 69: 422–430.

1910 WALLDIUS G, JUNGNER I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk  
1911 indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy.  
1912 *Journal of Internal Medicine* 2004; 255 (2): 188-205.

1913 YU L, CROZE E, YAMAGUCHI KD, TRAN T, REDER AT, LITVAK V,  
1914 VOLKERT MR. Induction of a unique isoform of the NCOA7 oxidation resistance  
1915 gene by interferon  $\beta$ -1b. *Journal of interferon & cytokine research* 2015; 35 (3):  
1916 186-199.

1917 ZANETTI LH. Óleo de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) na  
1918 alimentação de frangos de corte. [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual  
1919 Paulista; dois mil e dezoito.

## APÊNDICE

Tabela 23- Proteínas identificadas por espectrometria de massa, no plasma sanguíneo de frangos de corte.

Spot	Acesso	Símbolo Gene	Proteína	Escore	pI/MM teórica (kDa)
1	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	10278.48	5.59/30.680
	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	458.8656	6.09/11.361
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	282.9199	5.55/11.695
	P21869	N/A	Casein kinase II subunit alpha'	51.7898	8.24/41.246
2	P19121	ALB	Albumin	3342.51	5.51/69.918
3	O93510	GSN	Gelsolin	3901.907	5.93/85.832
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	62.0375	6.07/48.174
4	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	905.5515	6.09/11.361
			Neuronal-glia cell adhesion molecule	120.977	5.46/136.571
6	Q03696	N/A	Protein NEL	36.1394	5.23/90.969
	Q90827	NEL	Protein NEL	36.1394	5.23/90.969
7	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	1017.805	6.09/11.361
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	340.4528	5.55/11.695
8	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	358.0059	6.09/11.361
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	190.5477	5.55/11.695
9	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	955.9057	6.09/11.361
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	244.4516	5.55/11.695
10	P19121	ALB	Albumin	199.3368	5.51/69.918
	Q98TA4	MBL	Mannose-binding protein	65.9287	5.85/27.396
12	P19121	ALB	Albumin	42.6187	5.51/69.918
14	P00565	CKM	Creatine kinase M-type	1245.868	6.50/43.328
15	P00565	CKM	Creatine kinase M-type	730.9126	6.50/43.328
17	P07322	ENO3	Beta-enolase	784.1884	7.28/47.196
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	625.7251	5.69/82.438
	P51913	ENO1	Alpha-enolase	412.8586	6.17/47.305
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	154.5098	7.18/52.678
18	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	233.5792	5.69/82.438
19	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	2984.645	5.69/82.438
20	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	916.9442	5.69/82.438
21	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	210.692	5.69/82.438
22	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	2957.5	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	198.1938	7.18/52.678
23	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	6256.922	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	316.7034	7.18/52.678
	Q9I969	TXLNB	Beta-taxilin	103.1773	4.90/77.021
24	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	3620.123	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	822.0448	7.18/52.678
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	129.3882	4.94/46.082
25	P01875	N/A	Ig mu chain C region	148.2306	6.07/48.174
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	56.1318	5.69/82.438
26	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	2137.629	5.69/82.438

	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	100.7209	7.18/52.678
27	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1664.303	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	326.0969	7.18/52.678
29	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1049.02	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	32.1367	7.18/52.678
30	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	691.7341	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	567.3664	5.69/82.438
31	P19121	ALB	Albumin	61.6774	5.51/69.918
32	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	827.7747	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	186.8845	5.69/82.438
34	P10184	SPINK5	Ovoinhibitor	169.3121	6.44/57.005
35	P19121	ALB	Albumin	10391.33	5.51/69.918
	Q9PW71	DUSP4	Dual specificity protein phosphatase 4	98.9495	8.53/41.052
	Q5ZKJ4	FGFR1OP2	FGFR1 oncogene partner 2 homolog	86.2695	5.96/25.198
	Q9YGV8	TBPL1	TATA box-binding protein-like 1	85.4634	9.63/20.533
37	P02789	N/A	Ovotransferrin	7808.769	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	2037.992	6.07/48.174
	O93510	GSN	Gelsolin	667.8718	5.93/85.832
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	326.1338	5.69/82.438
	P19121	ALB	Albumin	210.693	5.51/69.918
38	P02789	N/A	Ovotransferrin	1323.553	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	270.3704	6.07/48.174
	P19121	ALB	Albumin	262.7492	5.51/69.918
40	P01875	N/A	Ig mu chain C region	112.0085	6.07/48.174
	P02789	N/A	Ovotransferrin	42.0694	6.85/77.777
42	O93510	GSN	Gelsolin	223.7361	5.93/85.832
	P02789	N/A	Ovotransferrin	36.0333	6.85/77.777
43	P02789	N/A	Ovotransferrin	5422.592	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	1709.406	5.51/69.918
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	512.599	6.07/48.174
	O93510	GSN	Gelsolin	35.0677	5.93/85.832
44	P02789	N/A	Ovotransferrin	160.3274	6.85/77.777
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	107.1896	4.94/46.082
	O93532	N/A	Keratin_ type II cytoskeletal cochlear	83.8727	5.97/53.803
45	P02789	N/A	Ovotransferrin	25.0896	6.85/77.777
49	P81475	N/A	Complement factor B-like protease (Fragment)	944.5046	-/27.059
51	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	78.2619	5.69/82.438
54	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	40.4185	5.69/82.438
66	P02789	N/A	Ovotransferrin	211.8998	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	122.3695	5.51/69.918
	P81475	N/A	Complement factor B-like protease (Fragment)	79.0168	-/27.059
67	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	3970.262	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1122.449	5.69/82.438

	P00548	PKM	Pyruvate kinase PKM	734.7426	7.29/58.015
	P19121	ALB	Albumin	121.9807	5.51/69.918
	Q9I9R0	HABP4	Intracellular hyaluronan-binding protein 4	36.8908	8.74/39.968
68	P19121	ALB	Albumin	133.0457	5.51/69.918
69	P19121	ALB	Albumin	3014.235	5.51/69.918
70	P19121	ALB	Albumin	14272.57	5.51/69.918
	P51890	LUM	Lumican	195.4813	6.06/38.642
71	P19121	ALB	Albumin	1599.38	5.51/69.918
	O73775	FBLN1	Fibulin-1	78.3756	4.95/78.138
	P79795	NRP1	Neuropilin-1	55.2513	5.28/102.480
72	P19121	ALB	Albumin	444.5857	5.51/69.918
74	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	5573.672	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	1302.933	7.18/52.678
	P19121	ALB	Albumin	138.5832	5.51/69.918
	P00548	PKM	Pyruvate kinase PKM	68.9751	7.29/58.015
75	P19121	ALB	Albumin	169.3086	5.51/69.918
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	30.2375	5.69/82.438
76	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	7691.317	5.69/82.438
	Q8JHU0	HOPX	Homeodomain-only protein	174.3281	4.92/8.342
77	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	945.9792	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	151.5574	7.18/52.678
78	P41366	VMO1	Vitelline membrane outer layer protein 1	324.8052	8.82/20.234
80	P27731	TTR	Transthyretin	1518.121	5.07/16.309
83	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	1201.694	7.18/52.678
84	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	146.8049	4.94/46.082
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	28.3922	5.02/50.986
85	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	138.1585	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	117.0304	5.69/82.438
86	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	14105.66	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	687.2985	5.69/82.438
	P12275	N/A	Arylamine N-acetyltransferase_ liver isozyme	103.3287	5.56/32.915
87	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	12673.68	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1118.314	5.69/82.438
	P05180	CYP2H1	Cytochrome P450 2H1	208.2772	6.45/56.261
88	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	19784.3	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	6639.411	5.69/82.438
89	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	11101.61	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	6295.743	5.69/82.438
	Q8JHU0	HOPX	Homeodomain-only protein	267.8177	4.92/8.342
	Q5ZML1	KPNA1	Importin subunit alpha-5	202.4729	4.93/60.195
90	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	3110.186	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	2541.352	5.69/82.438
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	183.1839	4.94/46.082

		General transcription and DNA repair factor IIIH helicase subunit XPB	56.2588	6.11/89.680
	Q5ZKK7 ERCC3			
	P00548 PKM	Pyruvate kinase PKM	29.9026	7.29/58.015
91	P14448 FGA	Fibrinogen alpha chain	3504.213	5.69/82.438
	Q02020 FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	407.1343	7.18/52.678
	P07322 ENO3	Beta-enolase	153.6646	7.28/47.196
	Q5ZJI0 TPST2	Protein-tyrosine sulfotransferase 2	36.8004	9.15/42.042
	P51913 ENO1	Alpha-enolase	29.9615	6.17/47.305
92	P00565 CKM	Creatine kinase M-type	414.9688	6.50/43.328
	P14448 FGA	Fibrinogen alpha chain	131.8687	5.69/82.438
	O93256 KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	124.0562	4.94/46.082
	Q02020 FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	81.0329	7.18/52.678
	Q6PVZ1 KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	23.5468	5.02/50.986
94	Q5ZMQ2 ACTG1	Actin_ cytoplasmic 2	2053.802	5.31/41.793
	P53478 N/A	Actin_ cytoplasmic type 5	2053.802	5.30/41.836
	P60706 ACTB	Actin_ cytoplasmic 1	2053.802	5.29/41.737
	P68139 ACTA1	Actin_ alpha skeletal muscle	1240.31	5.23/42.051
	P68034 ACTC1	Actin_ alpha cardiac muscle 1	1240.31	5.23/42.019
	P08023 ACTA2	Actin_ aortic smooth muscle	1240.31	5.24/41.995
	P63270 ACTG2	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	1192.112	5.31/41.877
	P19121 ALB	Albumin	237.5117	5.51/69.918
	O93256 KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	51.9107	4.94/46.082
95	Q03352 SERPINC1	Antithrombin-III (Fragment)	333.7148	10.29/11.281
96	O93256 KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	88.4306	4.94/46.082
	Q6PVZ1 KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	23.5707	5.02/50.986
99	P20763 N / D	Ig lambda chain C region	5499.998	6.09/11.361
	P04210 N/A	Ig lambda chain V-1 region	1030.015	5.55/11.695
	P08250 APOA1	Apolipoprotein A-I	633.7396	5.59/30.680
102	P41263 RBP4	Retinol-binding protein 4	7165.561	5.93/22.515
	P68139 ACTA1	Actin_ alpha skeletal muscle	720.9074	5.23/42.051
	P68034 ACTC1	Actin_ alpha cardiac muscle 1	720.9074	5.23/42.019
	P08023 ACTA2	Actin_ aortic smooth muscle	720.9074	5.24/41.995
	P63270 ACTG2	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	700.485	5.31/41.877
	Q5ZMQ2 ACTG1	Actin_ cytoplasmic 2	316.0427	5.31/41.793
	P53478 N/A	Actin_ cytoplasmic type 5	316.0427	5.30/41.836
	P60706 ACTB	Actin_ cytoplasmic 1	316.0427	5.29/41.737
	P02605 N/A	Myosin light chain 3_ skeletal muscle isoform	274.8606	4.52/16.710
	P02604 N/A	Myosin light chain 1_ skeletal muscle isoform	274.8606	4.96/20.899
	P02565 MYH1B	Myosin-1B	134.9216	5.64/222.817
	N/A	Myosin heavy chain_ skeletal muscle_ adult	123.3503	5.62/223.145
	P13538	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	111.9167	8.70/35.704
	P00356 GAPDH			

	P02609	MYLPP N/A	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	99.6498	4.74/18.839
	P29616		Myosin heavy chain_ cardiac muscle isoform (Fragment)	64.0512	5.17/128.009
103	P41263	RBP4	Retinol-binding protein 4	197.7224	5.93/22.515
104	Q5ZLN1	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	1746.194	7.02/28.898
	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	1224.48	6.09/11.361
105	P19121	ALB	Albumin	81.977	5.51/69.918
	O93532	N/A	Keratin_ type II cytoskeletal cochlear	76.5257	5.97/53.803
107	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	312.0034	7.18/52.678
108	P01875	N/A	Ig mu chain C region	1351.193	6.07/48.174
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	49.1255	4.94/46.082
109	P19121	ALB	Albumin	599.5192	5.51/69.918
111	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	55.1002	4.94/46.082
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	7.5426	5.02/50.986
112	O93510	GSN	Gelsolin	660.2259	5.93/85.832
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	91.2252	4.94/46.082
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	28.7541	5.02/50.986
113	P01875	N/A	Ig mu chain C region Complement factor B-like protease (Fragment)	984.3152	6.07/48.174
114	P81475	N/A	protease (Fragment)	1052.214	/27.059
115	P19121	ALB	Albumin	1305.422	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	457.091	6.85/77.777
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain Complement factor B-like protease (Fragment)	44.838	5.69/82.438
116	P81475	N/A	protease (Fragment)	2630.677	/27.059
	P02789	N/A	Ovotransferrin	594.3812	6.85/77.777
	O93510	GSN	Gelsolin Complement factor B-like protease (Fragment)	96.5637	5.93/85.832
117	P81475	N/A	protease (Fragment)	346.5391	/27.059
118	P19121	ALB	Albumin	2640.284	5.51/69.918
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	419.6558	5.69/82.438
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	98.5967	4.94/46.082
	P02789	N/A	Ovotransferrin	64.0121	6.85/77.777
	P02197	MB	Myoglobin	41.3293	7.96/17.422
119	P02789	N/A	Ovotransferrin	18004.3	6.85/77.777
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	257.5192	5.69/82.438
120	P02789	N/A	Ovotransferrin	7330.292	6.85/77.777
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	371.5157	5.69/82.438
	P19121	ALB	Albumin	213.6765	5.51/69.918
	P02609	MYLPP	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	142.1003	4.74/18.839
121	P19121	ALB	Albumin	2802.492	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin Serine/threonine-protein phosphatase PP1 -beta catalytic subunit	724.646	6.85/77.777
	P62207	PPP1CB	subunit	62.1671	5.84/37.187
122	P02789	N/A	Ovotransferrin	421.2103	6.85/77.777

123	P19121	ALB	Albumin	3508.294	5.51/69.918
124	P19121	ALB	Albumin	4790.178	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	51.6467	6.85/77.777
125	P19121	ALB	Albumin	7892.527	5.51/69.918
126	P19121	ALB	Albumin	507.2249	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	230.477	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	115.8472	6.07/48.174
127	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	972.4377	7.18/52.678
	P19121	ALB	Albumin	38.1305	5.51/69.918
128	P19121	ALB	Albumin	362.675	5.51/69.918
	P10184	SPINK5	Ovoinhibitor	51.789	6.44/57.005
130	P19121	ALB	Albumin	7309.331	5.51/69.918
132	P19121	ALB	Albumin	1777.051	5.51/69.918
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	640.1736	6.07/48.174
134	P02789	N/A	Ovotransferrin	927.1273	6.85/77.777
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	910.0054	7.18/52.678
	P19121	ALB	Albumin	607.1276	5.51/69.918
135	P19121	ALB	Albumin	1876.964	5.51/69.918
136	P19121	ALB	Albumin	231.8672	5.51/69.918
137	P41263	RBP4	Retinol-binding protein 4	397.4926	5.93/22.515
139	P19121	ALB	Albumin	557.2815	5.51/69.918
			Vitelline membrane outer layer		
140	P41366	VMO1	protein 1	304.5338	8.82/20.234
141	P01875	N/A	Ig mu chain C region	160.0793	6.07/48.174
142	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	244.2202	4.94/46.082
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	155.3631	7.18/52.678
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	71.3638	5.02/50.986
		N/A	Keratin_ type II cytoskeletal		
	O93532		cochlear	63.9935	5.97/53.803
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	43.7466	5.69/82.438
			Glutamine-dependent NAD(+)		
	Q5ZMA6	NADSYN1	synthetase	16.1005	6.49/79.227
143	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	3817.722	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	132.3156	5.69/82.438
145	P19121	ALB	Albumin	76.3805	5.51/69.918
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	65.8362	7.18/52.678
147	P19121	ALB	Albumin	856.7781	5.51/69.918
	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	609.7817	5.59/30.680
	P10184	SPINK5	Ovoinhibitor	316.4849	6.44/57.005
148	P19121	ALB	Albumin	14973.27	5.51/69.918
149	P19121	ALB	Albumin	1579.156	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	544.973	6.85/77.777
150	P19121	ALB	Albumin	12585.99	5.51/69.918
			Sigma non-opioid intracellular		
	Q5ZL84	SIGMAR1	receptor 1	150.5628	5.88/24.602
151	P19121	ALB	Albumin	1388.262	5.51/69.918
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	54.7851	4.94/46.082

152	P19121	ALB	Albumin	412.7157	5.51/69.918
153	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	3329.222	7.18/52.678
	P19121	ALB	Albumin	81.6964	5.51/69.918
154	P19121	ALB	Albumin	8401.21	5.51/69.918
	P05083	ASL2	Argininosuccinate lyase	30.8233	5.88/51.044
	Q5F4B2	SWAP70	Switch-associated protein 70	28.5501	6.02/68.411
	Q8QG60	CRY2	Cryptochrome-2	25.5264	8.90/66.097
	Q5ZMS4	NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7	23.1165	5.54/102.062
155	P00548	PKM	Pyruvate kinase PKM	1062.423	7.29/58.015
	P19121	ALB	Albumin	233.9002	5.51/69.918
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	63.1418	7.18/52.678
156	P19121	ALB	Albumin	70.9831	5.51/69.918
157	P19121	ALB	Albumin	5826.012	5.51/69.918
158	O93525	NOG	Noggin	191.0011	8.97/25.596
	O42479	FECH	Ferrochelatase_mitochondrial	190.6798	9.10/45.430
159	P19121	ALB	Albumin	907.2752	5.51/69.918
160	P10184	SPINK5	Ovoihibitor	7205.98	6.44/57.005
	P19121	ALB	Albumin	1719.662	5.51/69.918
	Q8JG30	SULT1B1	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	123.2035	6.67/34.074
	Q90762	CDH6	Cadherin-6	100.0574	4.73/88.660
161	P10184	SPINK5	Ovoihibitor	2566.791	6.44/57.005
	P19121	ALB	Albumin	1367.242	5.51/69.918
162	P10184	SPINK5	Ovoihibitor	234.4199	6.44/57.005
	P19121	ALB	Albumin	63.2853	5.51/69.918
164	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	85.2475	5.69/82.438
	O93510	GSN	Gelsolin	17.4925	5.93/85.832
167	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	1594.342	6.21/36.849
168	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	2150.006	5.59/30.680
	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	912.595	6.21/36.849
169	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	249.1523	6.21/36.849
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	80.7836	5.69/82.438
170	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	86.7317	6.21/36.849
171	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	55.6041	6.21/36.849
		N/A	Keratin_type II cytoskeletal cochleal		
172	O93532			696.6794	5.97/53.803
	O93256	KRT19	Keratin_type I cytoskeletal 19	480.0268	4.94/46.082
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_type I cytoskeletal 14	281.3801	5.02/50.986
173	O93256	KRT19	Keratin_type I cytoskeletal 19	75.6036	4.94/46.082
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	47.9318	5.69/82.438
		N/A	Keratin_type II cytoskeletal cochleal		
	O93532			31.1058	5.97/53.803
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_type I cytoskeletal 14	7.2476	5.02/50.986
174	P19121	ALB	Albumin	1273.1	5.51/69.918
	P51890	LUM	Lumican	105.9945	6.06/38.642
	O93256	KRT19	Keratin_type I cytoskeletal 19	89.0665	4.94/46.082
175	P19121	ALB	Albumin	2596.667	5.51/69.918

	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	484.9691	5.59/30.680
	Q03696	N/A	Neuronal-glia cell adhesion molecule	397.2567	5.46/136.571
	Q76189	NDC80	Kinetochore protein NDC80 homolog	24.2795	5.43/73.741
176	P19121	ALB	Albumin	1616.309	5.51/69.918
	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	482.3241	5.59/30.680
177	P01875	N/A	Ig mu chain C region	632.1032	6.07/48.174
	P19121	ALB	Albumin	302.2137	5.51/69.918
			Vitelline membrane outer layer		
178	P41366	VMO1	protein 1	224.2154	8.82/20.234
179	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	1084.421	5.59/30.680
	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	822.7345	6.09/11.361
180	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	1450.501	6.09/11.361
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	1311.395	5.55/11.695
	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	807.3671	5.59/30.680
181	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	1132.794	5.59/30.680
	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	908.7134	6.09/11.361
183	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	9309.057	5.59/30.680
	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	4017.162	6.09/11.361
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	1057.437	5.55/11.695
	P28675	DCN	Decorin	86.0416	8.71/39.687
	Q1T7B7	CENPP	Centromere protein P	62.0851	5.04/32.914
184	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	300.2617	5.59/30.680
188	P19121	ALB	Albumin	6995.206	5.51/69.918
189	P19121	ALB	Albumin	152.5261	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	102.0503	6.85/77.777
194	P01875	N/A	Ig mu chain C region	621.6377	6.07/48.174
	P19121	ALB	Albumin	23.7665	5.51/69.918
195	P02789	N/A	Ovotransferrin	208.3185	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	88.5905	6.07/48.174
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	77.7824	7.18/52.678
	P19121	ALB	Albumin	70.0826	5.51/69.918
196	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	3213.954	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	1419.231	7.18/52.678
	P00548	PKM	Pyruvate kinase PKM	219.8652	7.29/58.015
			Protein-tyrosine sulfotransferase		
	Q5ZJI0	TPST2	2	46.3711	9.15/42.042
			DnaJ homolog subfamily B		
	Q5F3Z5	DNAJB6	member 6	21.516	8.86/36.675
197	P19121	ALB	Albumin	4153.538	5.51/69.918
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	54.8003	5.69/82.438
	P02789	N/A	Ovotransferrin	53.6811	6.85/77.777
	Q7ZUA6	LMBR1	Limb region 1 protein homolog	45.1375	5.41/55.084
	Q679P3	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	38.7199	9.02/45.724
			Vitelline membrane outer layer		
198	P41366	VMO1	protein 1	532.6071	8.82/20.234

199	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	82.5583	8.70/35.704
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	68.9292	4.94/46.082
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	12.8929	5.02/50.986
200	Q03352	SERPINC1	Antithrombin-III (Fragment)	179.0228	10.29/11.281
201	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	1050.64	6.07/48.174
	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	158.4458	6.85/77.777
	O93510	GSN	Gelsolin	61.3835	5.93/85.832
	Q5F3X0	LCLAT1	Lysocardiolipin acyltransferase 1	31.0184	8.81/44.448
203	P51890	LUM	Lumican	295.536	6.06/38.642
	Q03352	SERPINC1	Antithrombin-III (Fragment)	255.2984	10.29/11.281
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	202.2245	5.69/82.438
	P19121	ALB	Albumin	175.0153	5.51/69.918
207	P19121	ALB	Albumin	4940.736	5.51/69.918
208	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	7136.016	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	5293.257	7.18/52.678
	Q8JHU0	HOPX	Homeodomain-only protein	1003.681	4.92/8.342
	Q90X25	HOXA13	Homeobox protein Hox-A13	188.7423	9.24/31.944
	Q90965	RAB2A	Ras-related protein Rab-2A	140.1222	5.98/23.522
	P27177	PRNP	Major prion protein homolog	125.1133	9.05/29.909
209	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	3754.755	6.85/77.777
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1365.317	5.69/82.438
	P19121	ALB	Albumin	576.3815	5.51/69.918
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	161.0473	7.18/52.678
	Q5ZKN2	PRNP	Membrane-associated progesterone receptor component 1	86.5684	9.05/29.909
210	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	71.0412	6.85/77.777
211	P00565	CKM	Creatine kinase	95.4364	6.50/43.328
213	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	210.7867	4.94/46.082
	Q6PVZ1	KRT14	Keratin_ type I cytoskeletal 14	28.9377	5.02/50.986
214	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	951.0492	5.59/30.680
	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	549.8384	6.07/48.174
215	P19121	ALB	Albumin	985.2855	5.51/69.918
	P68139	ACTA1	Actin_ alpha skeletal muscle	473.5603	5.23/42.051
	P68034	ACTC1	Actin_ alpha cardiac muscle 1	473.5603	5.23/42.019
	P08023	ACTA2	Actin_ aortic smooth muscle	473.5603	5.24/41.995
	P63270	ACTG2	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	449.4176	5.31/41.877
	P60706	ACTB	Actin_ cytoplasmic 1	300.2132	5.29/41.737
	Q5ZMQ2	ACTG1	Actin_ cytoplasmic 2	293.3659	5.31/41.793
	P53478	<i>N/A</i>	Actin_ cytoplasmic type 5	293.3659	5.30/41.836
	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	142.2986	5.59/30.680
	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	Neuronal-glia cell adhesion molecule	488.8876	5.46/136.571
218	Q03696	<i>N/A</i>	Neuronal-glia cell adhesion molecule	488.8876	5.46/136.571
	Q90827	NEL	Protein NEL	77.0211	5.23/90.969
	P19121	ALB	Albumin	22.495	5.51/69.918
220	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	210.423	5.59/30.680

228	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	73.4457	5.69/82.438
230	P20763	N/A	Ig lambda chain C region	3370.311	6.09/11.361
	Q5ZLN1	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	2217.941	7.02/28.898
	P04210	N/A	Ig lambda chain V-1 region	438.219	5.55/11.695
	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	153.062	5.59/30.680
231	P02789	N/A	Ovotransferrin	5169.573	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	2418.158	5.51/69.918
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	910.5436	6.07/48.174
	O93510	GSN	Gelsolin	138.5865	5.93/85.832
232	P02789	N/A	Ovotransferrin	1008.015	6.85/77.777
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	192.0651	5.69/82.438
233	P19121	ALB	Albumin	3694.292	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	192.5896	6.85/77.777
234	P19121	ALB	Albumin	2771.146	5.51/69.918
237	P08250	APOA1	Apolipoprotein A-I	402.871	5.59/30.680
238	P19121	ALB	Albumin	65.8236	5.51/69.918
242	P02789	N/A	Ovotransferrin	14776.42	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	628.316	6.07/48.174
	Q9I9R0	HABP4	Intracellular hyaluronan-binding protein 4	108.4903	8.74/39.968
	Q5F3R7	DCAF12	DDB1- and CUL4-associated factor 12	50.6597	9.24/47.618
243	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	6331.043	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	954.7752	5.69/82.438
	P02789	N/A	Ovotransferrin	470.9244	6.85/77.777
244	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1470.919	5.69/82.438
	P02789	N/A	Ovotransferrin	104.8316	6.85/77.777
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	102.3622	7.18/52.678
246	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	8261.576	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	1970.427	5.69/82.438
	P00330	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	1313.948	6.21/36.849
247	P02789	N/A	Ovotransferrin	15647.53	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	247.242	6.07/48.174
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	144.3586	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	124.674	7.18/52.678
248	P02789	N/A	Ovotransferrin	2467.128	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	197.0748	5.51/69.918
	P02128	HBE	Hemoglobin subunit epsilon Hydroxyacylglutathione hydrolase-like protein	92.0274	9.07/16.603
	Q5ZLY2	HAGHL	Hydroxyacylglutathione hydrolase-like protein	82.5444	6.03/32.228
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	70.9615	5.69/82.438
249	P19121	ALB	Albumin	645.3977	5.51/69.918
	P02789	N/A	Ovotransferrin	537.0554	6.85/77.777
251	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	1841.205	7.18/52.678
	P00548	PKM	Pyruvate kinase PKM	1359.055	7.29/58.015
	P02789	N/A	Ovotransferrin	303.2449	6.85/77.777
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	72.6801	5.69/82.438

252	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	1152.981	6.85/77.777
253	P19121	ALB	Albumin	303.2892	5.51/69.918
	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	99.5529	6.85/77.777
254	Q5ZMQ2	ACTG1	Actin_ cytoplasmic 2	3146.722	5.31/41.793
	P53478	<i>N/A</i>	Actin_ cytoplasmic type 5	3146.722	5.30/41.836
	P60706	ACTB	Actin_ cytoplasmic 1	3146.722	5.29/41.737
	P68139	ACTA1	Actin_ alpha skeletal muscle	1753.041	5.23/42.051
	P68034	ACTC1	Actin_ alpha cardiac muscle 1	1753.041	5.23/42.019
	P08023	ACTA2	Actin_ aortic smooth muscle	1753.041	5.24/41.995
	P63270	ACTG2	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	1729.452	5.31/41.877
	P19121	ALB	Albumin	318.0641	5.51/69.918
	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	81.2027	6.85/77.777
255	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	4186.515	6.07/48.174
	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	45.2259	6.85/77.777
	O93510	GSN	Gelsolin	45.1774	5.93/85.832
		<i>N/A</i>	Complement factor B-like protease (Fragment)	1651.669	7.27/059
256	P81475	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	294.5805	6.85/77.777
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	55.6422	4.94/46.082
	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	43.6255	6.07/48.174
	P20785	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	18.4183	5.63/107.984
	P13538	<i>N/A</i>	Myosin heavy chain_ skeletal muscle_ adult	17.4861	5.62/223.145
	Q01841	TGL2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	15.732	4.90/77.970
257	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	2551.667	7.18/52.678
259	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	3797.153	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	3710.614	5.51/69.918
	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	589.0931	6.07/48.174
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	277.7514	7.18/52.678
260	P19121	ALB	Albumin	39.4715	5.51/69.918
261	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	8042.198	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	379.6893	5.51/69.918
	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	288.1642	6.07/48.174
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	162.0565	5.69/82.438
	P79765	NEUROD1	Neurogenic differentiation factor 1	155.1055	5.21/38.809
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	127.0352	7.18/52.678
	Q92010	ZBTB14	Zinc finger and BTB domain-containing protein 14	102.3945	5.86/51.050
	Q9PTR5	PAFAH1B1	Lissencephaly-1 homolog	83.636	6.97/46.664
262	P02789	<i>N/A</i>	Ovotransferrin	9084.689	6.85/77.777
	P19121	ALB	Albumin	1404.831	5.51/69.918
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	740.4574	5.69/82.438
	P01875	<i>N/A</i>	Ig mu chain C region	132.3301	6.07/48.174
263	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	7023.691	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	1237.081	7.18/52.678

	P02789	N/A	Ovotransferrin	643.5668	6.85/77.777
264	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	3014.248	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	458.9699	7.18/52.678
	P02789	N/A	Ovotransferrin	162.4428	6.85/77.777
	Q5ZLA9	TMEM263	Transmembrane protein 263	81.1194	9.30/11.712
	P28497	CAPZA2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	44.7253	5.54/32.845
265	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	16.6886	5.69/82.438
266	P68139	ACTA1	Actin_ alpha skeletal muscle	182.2554	5.23/42.051
	Q5ZMQ2	ACTG1	Actin_ cytoplasmic 2	182.2554	5.31/41.793
	P68034	ACTC1	Actin_ alpha cardiac muscle 1	182.2554	5.23/42.019
	P63270	ACTG2	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	182.2554	5.31/41.877
	P08023	ACTA2	Actin_ aortic smooth muscle	182.2554	5.24/41.995
	P53478	N/A	Actin_ cytoplasmic type 5	182.2554	5.30/41.836
	P60706	ACTB	Actin_ cytoplasmic 1	182.2554	5.29/41.737
269	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	138.8839	4.94/46.082
271	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	5743.185	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	2562.035	7.18/52.678
	P00548	PKM	Pyruvate kinase PKM	254.1833	7.29/58.015
	Q8JHU0	HOPX	Homeodomain-only protein	170.1757	4.92/8.342
	P58268	REQ	Zinc finger protein ubi-d4	40.8643	6.57/45.884
272	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	165.3767	5.69/82.438
	O93256	KRT19	Keratin_ type I cytoskeletal 19	75.4914	4.94/46.082
273	P19121	ALB	Albumin	1750.318	5.51/69.918
274	P19121	ALB	Albumin	1377.234	5.51/69.918
275	P02789	N/A	Ovotransferrin	1904.608	6.85/77.777
276	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	2574.051	7.18/52.678
	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	48.0836	5.69/82.438
	P02789	N/A	Ovotransferrin	37.835	6.85/77.777
277	P02789	N/A	Ovotransferrin	6318.591	6.85/77.777
	P01875	N/A	Ig mu chain C region	378.5493	6.07/48.174
	P81475	N/A	Complement factor B-like protease (Fragment)	216.1593	/27.059
	Q5ZHV7	SPRYD7	SPRY domain-containing protein 7	48.8658	6.28/21.735
	Q90Y35	ZNF622	Zinc finger protein 622	44.8703	5.20/46.109
	Q5ZJ41	MARCHF5	E3 ubiquitin-protein ligase MARCHF5	35.0398	9.10/31.422
278	P02789	N/A	Ovotransferrin	63.2487	6.85/77.777
279	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	3839.373	5.69/82.438
	Q02020	FGB	Fibrinogen beta chain (Fragment)	1526.527	7.18/52.678
280	P14448	FGA	Fibrinogen alpha chain	55.0614	5.69/82.438
284	P19121	ALB	Albumin	147.9799	5.51/69.918
	O57401	SOX1	Transcription factor SOX-1	63.8744	9.70/37.935
	Q679P3	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	54.8496	9.02/45.724
	P53352	INCENP	Inner centromere protein	43.7749	9.54/100.941

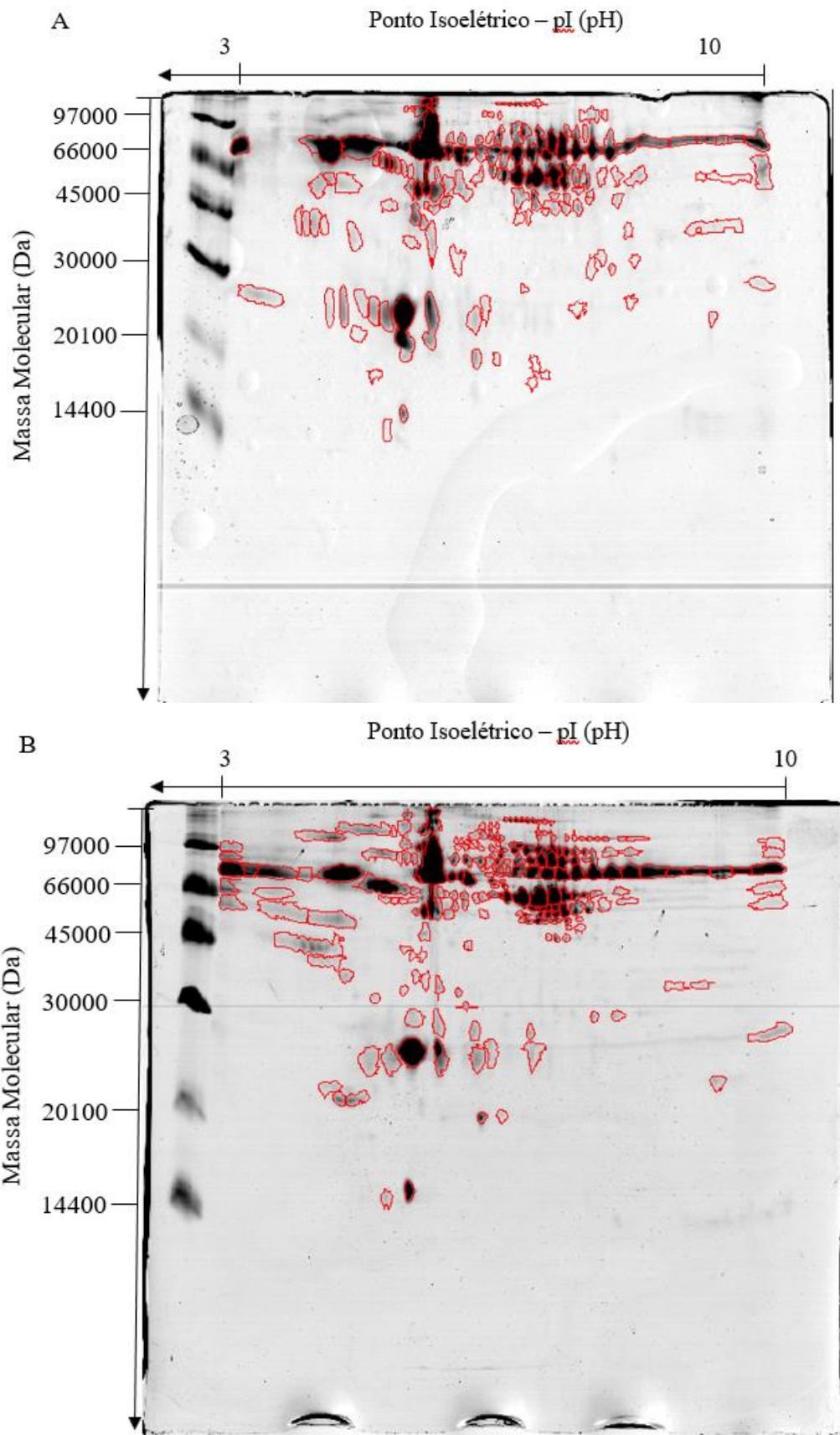


Figura 1 - Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de plasma sanguíneo, A: tratamento 0% OSM Estresse térmico; B: tratamento 0% OSM Termoneutro.

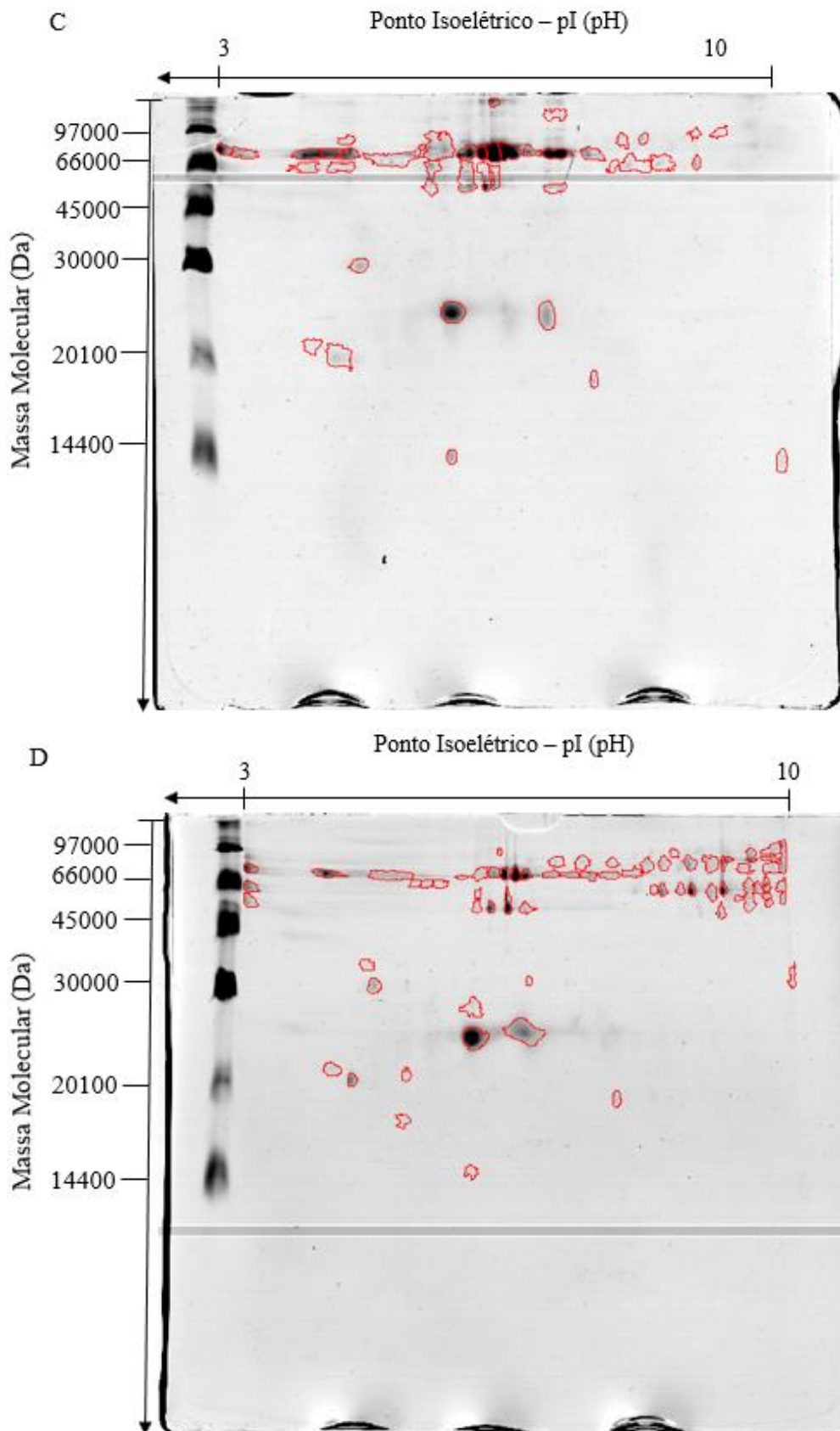


Figura 2- Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de plasma sanguíneo, C: tratamento 0,5% OSM Estresse térmico; D: tratamento 0,5% OSM Termoneuro.

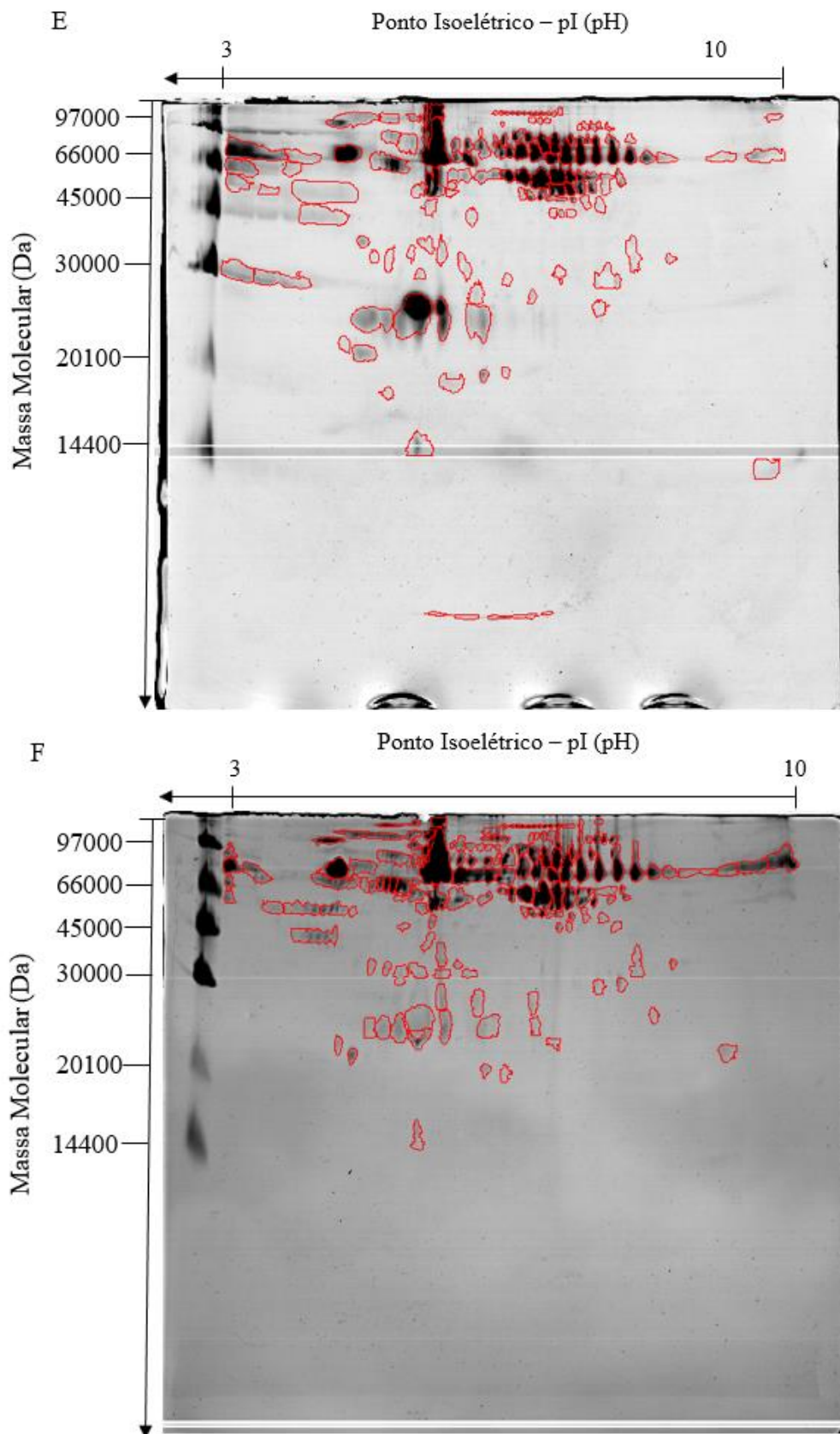


Figura 3 - Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) obtido por eletroforese 2D-PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de plasma sanguíneo, E: tratamento 0,9% OSM Estresse térmico; F: tratamento 0,9% OSM Termoneutro.

## CAPÍTULO IV

## IMPLICAÇÕES

Apesar da crise financeira causada pelo Covid-19 durante o ano de 2020, o consumo de carne de frangos deve aumentar tanto por conta de suas características de carne magra/saudável, quanto pelo seu preço acessível.

O Brasil se beneficiará desse aumento no consumo de carne de frangos, pois o país já tem produção consolidada e, se beneficia com destaque também na produção de grãos, usados na alimentação animal. Apesar disso, o Brasil enfrenta problemas com o estresse por calor por conta do seu clima. Buscando uma solução, várias pesquisas são feitas utilizando aditivos fitogênicos para tentar controlar os efeitos negativos causados pelo estresse.

Em contrapartida, o óleo da semente de maracujá que é um subproduto, apresenta constituintes que podem melhorar a imunidade dos frangos de corte, com a maior produção de anticorpos. Podendo ser aliado a avicultura dependendo do meio de criação desses animais. Além disso, o uso desse subproduto na alimentação animal gera destino ambientalmente correto e agrega valor ao produto até então considerado descarte da indústria.

Apesar dos benefícios alcançados com o uso do óleo de semente de maracujá, tanto no presente estudo, como também em estudos anteriores, que foram importantes para o descobrimento das funções do óleo, cabe agora o interesse por parte das empresas em utilizar as propriedades oferecidas por esse subproduto, para o desenvolvimento de um produto comercial mais puro, destinação e agregação de valor ao óleo de semente de maracujá.