

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/08/2024

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until Aug. 18, 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DAS FONTES E INCLUSÕES DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS
NO DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARÇA E PERFIL DE
METALOPROTEÍNAS EM FRANGOS DE CORTE

ARMANDO CARLOS CONTIN NETO

Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Agosto – 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DAS FONTES E INCLUSÕES DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS
NO DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARÇA E PERFIL DE
METALOPROTEÍNAS EM FRANGOS DE CORTE

ARMANDO CARLOS CONTIN NETO
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato

Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Agosto – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Contin Neto, Armando Carlos.

Influência das fontes e inclusões de cobre, zinco e manganês no desempenho, rendimento de carcaça e perfil de metaloproteínas em frangos de corte / Armando Carlos Contin Neto. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Antonio Celso Pezzato

Coorientador: José Henrique Stringhini

Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 50403001

1. Marcadores bioquímicos. 2. Suplementos dietéticos - nutrição animal. 3. Metaloproteínas. 4. Minerais. 5. Proteômica.

Palavras-chave: Biomarcadores; Hidroxicloreto; Metal Binding Protein; Mineral; Proteômica.

Biografia do Autor

Armando Carlos Contin Neto nasceu no dia 02 de setembro de 1993, em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, filho de Silvia Contin. Em março/2012 ingressou no curso de Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu, concluindo em dezembro/2016. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica, e treinamento técnico e participou de projetos de extensão, com bolsa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC), respectivamente. Em março/2017 iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu, com ênfase em nutrição e digestibilidade de dietas de frangos de corte, com bolsa de estudos e financiamento da pesquisa pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), tendo concluído em fevereiro/2019. Em março/2020 iniciou o curso de doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu, também com ênfase em nutrição de frangos de corte e proteômica aplicada à nutrição e metabolismo animal.

Dedicatória

Dedico, especialmente, à minha mãe *Silvia* e ao meu padrasto *Edvaldo* por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Dedico também aos meus avós, sr. *Armando* e sra. *Maria do Carmo*, por entenderem a minha ausência além de serem a minha maior torcida e referência.

Sem o apoio e amor de vocês eu jamais conseguia e por isso esse trabalho também é de vocês e por vocês.

Com todo meu carinho,

Neto

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família pelo grande suporte e torcida. Por entenderem a minha ausência e acreditarem que tudo era para um bem maior.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. *Antonio Celso Pezzato* por ter aceito o desafio de me orientar, pelos conselhos, amizade e toda contribuição para que esta pesquisa se tornasse possível. Agradeço sobretudo à sua disposição em me atender e, sempre transmitir tranquilidade e compreensão. Sem dúvida essas características do senhor muito me ajudaram e me inspiraram!

Agradeço ao meu coorientador prof. Dr. *José Roberto Sartori* por toda a ajuda e conhecimento compartilhado, pela compreensão e apoio em todas as decisões tomadas até a conclusão dessa pesquisa. Agradeço pelos bons anos desde a graduação que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço também o professor Dr. *Pedro de Magalhães Padilha* por ceder gentilmente e prontamente seu laboratório e muito nos ajudar no entendimento dos achados; ao prof. Dr. *José Henrique Stringhini* pela amizade e boas conversas que muito me incentivaram a continuar. Agradeço também ao amigo Dr. *José Cavalcante Sousa Vieira* pela paciência e por toda ajuda durante as análises.

Ao *Programa de Pós Graduação em Zootecnia*, em especial à *Claudia Cristina Moreci* por me ajudar com o cumprimento dos prazos e deveres, sempre com um olhar maternal.

Agradeço aos amigos *Izabela da Cunha Bataglioli (Ximit)* e *Rafael Bernardo de Mello (Preguinho)* por todos esses anos de amizade e por todo o suporte ao longo de todo esse tempo, sempre ouvindo minhas queixas e sempre com uma palavra amiga e de conforto para me acolher. Sem sombra de dúvidas vocês fizeram a diferença na minha caminhada até aqui e por isso sempre estarei presente, seja em pensamento ou oração. Espero compartilhar com vocês o fruto de cada conquista que está por vir!

Agradeço aos amigos *Marcos, Gustavo* e *Daniel* pelos almoços aos domingos, as conversas e os cafés. Vocês ajudaram que tudo se tornasse mais leve.

Às amigas de “trouwalho” *Laura, Taymara* e *Deborah* pela amizade, pela paciência e por me apoiar e acreditarem em mim!

Agradeço aos amigos do *Laboratório de Nutrição de Aves* em todas as atividades do experimento, em especial à amiga *Lais Cordeiro* por toda disposição, proatividade e empenho. À amiga *Julianna Batistioli* por se fazer presente mesmo longe e ser uma amiga que quero levar pra toda a vida.

Agradeço ao amigo *Wanderley Thiago da Silva* por sempre estar presente e muito me aconselhar. Suas “implicancias” fizeram a diferença e sou grato por tudo.

Agradeço a todo pessoal da *Supervisão de Fazendas, Fábrica de Ração e Abatedouro Experimental* pela prontidão em me ajudar.

Agradeço à profa Dra. *Ibiara Correia de Lima Almeida Paz* pelas conversas, amizade e orientação durante o PAADS. A senhora foi fundamental para que tudo isso se concretizasse.

Agradeço à *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Campus de Botucatu por me permitir uma vivência tão rica e prazerosa e por realizar um sonho. Espero, de coração, que muitos outros tenham as mesmas oportunidades que eu tive com ensino, pesquisa e extensão de qualidade e excelência.

Agradeço à empresa *Trouw Nutrition Brasil Nutrição Animal* pelo financiamento dessa pesquisa, em especial à dra. *Karolina Von Zuben Augusto* por confiar em mim para execução do experimento.

À todos os amigos e pessoas que cruzaram por mim durante esses anos na terra dos bons ares. Minha estadia por esta cidade me transformou em uma pessoa melhor e por isso toda minha gratidão e carinho por essa cidade tão especial.

Por fim, agradeço a todos novamente. A contribuição de cada um me motivou e permitiu que esse ciclo chegasse ao fim.

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

EPÍGRAFE

A sorte favorece os corajosos!

Seja forte e corajoso!

RESUMO GERAL

A suplementação de microminerais é indispensável para atender as exigências de frangos de corte. Cobre, Zinco e Manganês desempenham uma série de funções bioquímicas que permitem o bom funcionamento do organismo animal, garantindo suporte estrutural, fisiológico, regulatório e catalítico. Porém nem todas as fontes de microminerais disponíveis comercialmente apresentam características que favoreçam sua absorção. Os hidroximenerais (HCM) representam a terceira geração da suplementação mineral devido suas características químicas diferenciadas das fontes usuais que trazem benefícios sobre os parâmetros de desempenho e saúde das aves. Diversas pesquisas já foram conduzidas a fim de elucidar o efeito das fontes e níveis de microminerais sobre os parâmetros zootécnicos, status de saúde e bem-estar de frangos de corte. No entanto, nenhum estudo avaliou os efeitos das diferentes fontes e níveis de Cu, Zn e Mn sobre o metabolismo de metaloproteínas em frangos de corte. Esta pesquisa corresponde ao estudo de desempenho zootécnico e estudo proteômico de tecido hepático e plasmático de frangos de corte, divididos em três capítulos principais, respectivamente.

Capítulo II – O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes fontes (hidroxicloreto e sulfato) e diferentes níveis de Cobre, Zinco e Manganês sobre o desempenho de frangos de corte, rendimento de partes de carcaça, bem como avaliar o potencial antimicrobiano do Cobre. Foram utilizados 1080 pintos de um dia de idade (COBB 500), distribuídos em quatro tratamentos experimentais: Controle + (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato + 50 ppm de avilamicina), Controle – (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato), Baixo HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn e 40 ppm Mn na forma hidroxicloretos), Alto HCM (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma hidroxicloreto). As avaliações de desempenho foram feitas semanalmente e no 42º dia de criação três aves foram escolhidas ao acaso para avaliação do rendimento de partes. A avaliação de desempenho e rendimento de partes demonstrou que os hidroxicloretos apresentam o mesmo resultado que a fonte sulfato mesmo com adição de aditivo promotor. A suplementação de minerais na forma hidroxicloretos podem ser feitas em 50% do nível recomendado pelos guias nutricionais. Desse modo, é possível dispensar o uso de promotor de crescimento e suplementar Cu, Zn e Mn em 50% abaixo do recomendado quando usado as fontes hidroxicloretos.

Capítulo III – O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o proteoma plasmático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês, utilizando ferramentas metaloproteômicas. Foram considerados três tratamentos: Sulf Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato), Baixo HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn e 40 ppm Mn na forma hidroxicloretos) e HCM Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma hidroxiclreto). Para a pesquisa, foram feitos três *pools* de plasma de 9 aves/tratamento no 42º dia de idade. Os *pools* foram submetidos aos procedimentos de extração proteica para obtenção do proteoma e posterior caracterização, identificação dos níveis funcionais, via metabólicas e interações das proteínas associadas com os minerais estudados. A análise proteômica demonstrou indução de proteínas associadas com sistema imune e o crescimento celular (IGLL1 – imunoglobulina lambda cadeia leve e cadeia pesada e RC3H1 – Ring finger and CCCH-type domains 1), proteínas envolvidas no metabolismo do oxigênio (HBE e HBG2 – hemoglobina subunidade alfa e hemoglobina subunidade beta) e transporte de nutrientes (RBP4 – retinol binding protein 4), sugerindo envolvimento dessas proteínas com os minerais estudados e a chance de serem possíveis biomarcadores.

Capítulo IV – O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o proteoma hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês utilizando ferramentas metaloproteômicas. Foram considerados três tratamentos (Sulf Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma sulfato), Baixo HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn e 40 ppm Mn na forma hidroxicloretos) e HCM Controle (15 ppm Cu, 80 ppm Zn e 80 ppm Mn na forma hidroxiclreto). Para a pesquisa foram feitos três *pools* de fígado de 9 aves/tratamento, no 42º dia de idade. Os *pools* foram submetidos aos procedimentos de extração proteica para obtenção do proteoma e posteriormente caracterização, identificação dos níveis funcionais, via metabólicas e interações das proteínas associadas com os minerais estudados. A análise proteômica demonstrou indução de proteínas associadas os processos biológicos e componente celular, com funções de transporte de nutrientes e produção de energia como a ALDOB (frusctose-biphosfate aldolase B) e ATP Sintetase Subunidade β (ATP5b), respectivamente, sugerindo envolvimento dessas proteínas com os minerais estudados e a chance de serem possíveis biomarcadores.

Palavras Chave: biomarcadores, hidroxiclreto, mineral, *metal binding protein*, proteômica.

ABSTRACT

Micromineral supplementation is essential to meet the requirements of broiler chickens. Copper, Zinc and Manganese perform a series of biochemical functions that allow the animal organism to function properly, ensuring structural, physiological, regulatory and catalytic support. However, not all sources of commercially available microminerals have characteristics that favor their absorption. The hydroxyminerals represent the third generation of mineral supplementation due to their chemical characteristics different from the usual sources that bring benefits on the parameters of performance and health of the birds. Several studies have already been conducted in order to elucidate the effect of sources and levels of microminerals on the zootechnical parameters, health status and well-being of broiler chickens. However, no study has evaluated the effects of different sources and levels of Cu, Zn and Mn on metal binding protein metabolism in broiler chickens. This study corresponds to the study of zootechnical performance and the proteomic study of liver and plasma tissue of broiler chickens, divided into three main chapters, respectively.

Paper II – The objective of this study was to evaluate the effect of different sources (hydroxychloride and sulfate) and different levels of Copper, Zinc and Manganese on the performance of broilers, yield of parts, as well as to evaluate the antimicrobial potential of Copper. A total of 1080 one-day-old chicks (COBB 500) were used, divided into four experimental treatments: Control + (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form + 50 ppm of avilamycin), Control – (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form), Low HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn and 40 ppm Mn in hydroxychloride form), High HCM (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in hydroxychloride form). Performance evaluations were made weekly and on the 42nd day of rearing, three birds were chosen at random to evaluate the yield of parts. The evaluation of the performance and yield of parts showed that the hydroxychlorides present the same result as the sulphate sources even with the addition of a promoter additive. Supplementation of minerals in the form of hydroxychlorides can be done at 50% of the level recommended by nutritional guides. Thus, it is possible to dispense with the use of growth promoter and supplement Cu, Zn and Mn at 50% below the recommended level when using hydroxychloride sources.

Paper III – The aim of this study was to evaluate the plasma proteome of broilers supplemented with different sources and levels of Copper, Zinc and Manganese, using

metalloproteomics tools. Three treatments were considered: Sulf Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form), Low HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn and 40 ppm Mn in hydroxychloride form) and HCM Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in the hydroxychloride form). For the study, three plasma pools of 9 birds/treatment were made. The pools were subjected to protein extraction procedures to obtain the proteome and subsequent characterization, identification of functional levels, metabolic pathways and interactions of proteins associated with the studied minerals. Proteomic analysis demonstrated induction of proteins associated with the immune system and cell growth (IGLL1 – lambda immunoglobulin light chain and heavy chain and RC3H1 – Ring finger and CCCH-type domains 1), involved in oxygen metabolism (HBE and HBG2 – hemoglobin subunit alpha and hemoglobin beta subunit) and nutrient transport (RBP4 – retinol binding protein 4), suggesting involvement of these proteins with the studied minerals and the chance of being possible biomarkers.

Paper IV – The aim of this study was to evaluate the hepatic proteome of broiler chickens supplemented with different sources and levels of Copper, Zinc and Manganese using metalloproteomics tools. Three treatments were considered (Sulf Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in sulfate form), Low HCM (15 ppm Cu, 40 ppm Zn and 40 ppm Mn in hydroxychloride form) and HCM Control (15 ppm Cu, 80 ppm Zn and 80 ppm Mn in the hydroxychloride form). For the study, three liver pools of 9 birds/treatment were made. The pools were submitted to protein extraction procedures to obtain the proteome and later characterization, identification of the functional levels, via Metabolic reactions and interactions of proteins associated with the minerals studied. Proteomic analysis demonstrated induction of proteins associated with biological processes and cellular component, with nutrient transport functions and production of such as ALDOB (fructose-biphosphate aldolase B) and ATP Synthetase Subunit β (ATP5b), respectively, suggesting involvement of these proteins with the minerals studied and the chance of being possible biomarkers.

Key words: biomarkers, hydroxychloride, mineral, metal binding protein, proteomics.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

Figura 1. Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Baixo HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês70

Figura 2. Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Controle HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês72

Figura 3. Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Baixo HCM vs Controle HCM e diferencialmente expressas no plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês73

CAPÍTULO IV

Figura 1. Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Sulf. Contole vs Baixo HCM do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês109

Figura 2. Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Sulf. Contole vs HCM Controle do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês110

Figura 3. Anotação funcional das proteínas identificadas na comparação entre Baixo HCM vs. HCM Controle do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês110

Figura 4. Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs Baixo HCM e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de cprte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês ...111

Figura 5. Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs HCM Controle e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de cprte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês112

Figura 6. Rede de interação entre proteínas identificadas na comparação entre o grupo Sulf. Controle vs HCM Controle e diferencialmente expressas no tecido hepático de frangos de cprte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre, zinco e manganês113

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Níveis de suplementação (mg/kg) e fontes de Cu, Mn e Zn em dietas experimentais de frangos de corte46

Tabela 2. Ingredientes (kg) e composição nutricional (por quilo de ração) das dietas experimentais46

Tabela 3. Desempenho de frangos de corte de 1-21 dias de idade suplementados com diferentes fontes e níveis de minerais Cu, Zn e Mn49

Tabela 4. Desempenho de frangos de corte de 1-42 dias de idade suplementados com diferentes fontes e níveis de minerais Cu, Zn e Mn50

Tabela 5. Rendimentos de cortes de frangos de corte aos 42 dias de idade suplementados com diferentes níveis e fontes de Cu, Zn e Mn51

CAPÍTULO III

Tabela 1. Tratamentos experimentais e níveis de suplementação (mg/kg) e fontes de Cu, Mn e Zn em dietas de frangos de corte67

Tabela S1. Expressão de proteínas frente à análise dos termos de ontologia genética e status de expressão frente às comparações com os tratamentos experimentais85

CAPÍTULO IV

Tabela S1. Expressão de proteínas de tecido hepático de frangos de corte frente à análise dos termos de ontologia genética e status de expressão frente às comparações com os tratamentos experimentais (diferentes níveis e fontes de Cu, Zn e Mn)120

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
1 REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 <i>Minerais Hidroxicloretos</i>	19
1.2 <i>Cobre (Cu)</i>	20
1.3 <i>Manganês (Mn)</i>	22
1.4 <i>Zinco (Zn)</i>	24
1.5 <i>Proteômica aplicada na avicultura</i>	26
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	29
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO II.....	40
<i>“Suplementação de Cobre, Zinco e Manganês sobre o desempenho e rendimento de partes de frangos de corte desafiados com coccidiose”</i>	
RESUMO	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
<i>Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais</i>	45
<i>Avaliação de Desempenho</i>	48
<i>Avaliação Rendimento de Partes de Carcaça</i>	48
<i>Análise Estatística</i>	49
RESULTADOS	49
<i>Desempenho</i>	49

<i>Rendimento de Partes da Carcaça</i>	50
DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO III	62
<i>“Perfil de metaloproteínas de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês”</i>	
RESUMO	63
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS	66
<i>Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais</i>	66
<i>Coleta de Amostras</i>	67
<i>Extração e Quantificação de Proteínas</i>	67
<i>Digestão de Proteínas em Solução</i>	68
<i>Identificação e Análise de Bioinformática e Expressão de Proteínas</i>	69
RESULTADOS	69
DISCUSSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
MATERIAL SUPLEMENTAR	85
CAPÍTULO IV	102
<i>“Perfil de metaloproteínas de fígado de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cobre, Zinco e Manganês”</i>	
RESUMO	103
INTRODUÇÃO.....	104

MATERIAL E MÉTODOS	105
<i>Aves, Dietas e Tratamentos Experimentais</i>	105
<i>Coleta de Amostras</i>	106
<i>Extração e Quantificação de Proteínas</i>	107
<i>Digestão de Proteínas em Solução</i>	107
<i>Identificação e Análise de Bioinformática e Expressão de Proteínas</i>	108
RESULTADOS	109
DISCUSSÃO.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
MATERIAL SUPLEMENTAR	119
IMPLICAÇÕES	123

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A nutrição representa umas das principais ferramentas que permitem resultados satisfatórios ao Brasil em relação à produção de frangos de corte. Além de sua essencialidade, a nutrição contribui significativamente nos custos da produção. Optar por estratégias nutricionais mais acertivas e tecnológicas, que atendam às exigências nutricionais, mantenham bom status de saúde e reduzam os riscos ambientais, permitem melhorar o desempenho de frangos de corte e tornar a produção ainda mais lucrativa.

Dentre todos os componentes da ração, apesar de serem exigidos em pequenas quantidades, os microminerais são indispensáveis para manter a produtividade na avicultura. Os microminerais estão presentes nos ingredientes de dietas de frangos de corte porém são encontrados em pequenas quantidades e, desse modo, a suplementação é obrigatória para atender a demanda fisiológica das aves (SUTTLE, 2010).

Os minerais são vitais para que todas as funções bioquímicas aconteçam normalmente, provendo suporte estrutural, regulatório e catalítico (SUTTLE, 2010), especialmente os microminerais como o Zinco (Zn), essencial para crescimento normal, reprodução, ossificação, síntese de DNA, divisão celular, expressão gênica e melhora da resposta imune através de linfócitos e anticorpos (ABD EL-HACK, 2017); o Cobre (Cu), também é essencial para o crescimento normal, bom funcionamento do sistema nervoso e como cofator de diversas enzimas do sistema imunológico, assim como o Manganês (Mn), mineral traço fundamental para o sistema antioxidante e sistema imune, formação óssea e como cofator de diversas enzimas (SUTTLE, 2010).

A suplementação de minerais em dietas animais começou ainda na década de 1920, tentando encontrar as exigências das aves, e as formas iniciais usadas eram as fontes inorgânicas. Até hoje, as fontes minerais comumente usadas nas dietas são as fontes inorgânicas (sulfatos, carbonatos, cloretos e óxidos). Mas, estes possuem pouca biodisponibilidade e por isso necessitam serem usados em altas concentrações para atender as necessidades fisiológicas das aves. Indiretamente, o excedente dos minerais suplementados que não é absorvido acaba sendo excretado criando problema ambiental, podendo ter efeito detrimental em plantas, microorganismos, animais e seres humanos. (SWAIN et al., 2020).

O fato dos minerais inorgânicos serem menos aproveitados pelo organismo das aves se deve pelas propriedades químicas dessas fontes. Elas são formadas por ligações iônicas altamente reativas que facilmente se dissociam no início do trato gastrintestinal das aves, favorecendo a interação com outros nutrientes, possibilitando a formação de quelatos entre minerais e/ou entre

minerais e proteínas ou aminoácidos por exemplo, reduzindo a absorção (COHEN e STEWARD, 2014; AGAPITO e SEYBOTH, 2017).

Em decorrência dos pontos negativos dos minerais inorgânicos, novas fontes passaram a ser estudadas, como os hidroxicloretos. Eles possuem ligações covalentes entre o mineral e grupos hidroxilas (OH). São menos reativos, e possuem ligações entre suas moléculas suficientemente fortes para evitar interações com outros nutrientes da dieta e as condições do trato gastrointestinal e, suficientemente fracas de modo que facilite sua dissociação e absorção no local desejado, proporcionando maior estabilidade e biodisponibilidade em comparação às demais fontes de minerais (COHEN e STEWARD, 2014; AGAPITO e SEYBOTH, 2017).

Sendo assim, com base na essencialidade dos microminerais Cu, Zn e Mn e, de acordo com as particularidades de cada fonte, esta pesquisa pretende avaliar: 1) o efeito de diferentes níveis e fontes sobre os parâmetros de desempenho e rendimento de partes de frangos de corte; 2) o potencial antimicrobiano do Cu em relação ao aditivo melhorador de crescimento e, 3) perfil de proteínas ligadas a metais (*metal binding protein*) de frangos de corte desafiados com superdosagem de vacina contra coccidiose.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Minerais Hidroxicloretos

A suplementação de microminerais na dieta é crucial para manter bom status de saúde e desempenho na avicultura e, apesar de serem exigidos em pequenas quantidades, são essenciais para manter funcional o sistema antioxidante, imunológico, crescimento, produção e reprodução de frangos de corte.

Os minerais são comumente suplementados em dietas na forma inorgânica, que podem causar irritação na mucosa intestinal, formação de quelatos que reduzem a disponibilidade da dieta e aumentam a excreção por meio das excretas. Já na forma orgânica apresentam maior biodisponibilidade porém seu custo na produção é maior podendo inviabilizar seu uso (MWANGI et al., 2017; SUN et al., 2020).

Os hidroximinerais, apesar de serem considerados minerais inorgânicos por não estarem associados com molécula de carbono em sua estrutura, surgiram com a proposta diferente das fontes usuais (como os sulfatos, óxidos e carbonatos) por serem mais disponíveis. A biodisponibilidade determina a eficiência da forma do mineral usado e é definida pela porção ingerida e absorvida para ser utilizada nas funções metabólicas normais do organismo de frangos de corte. Nos animais monogástricos, os hidroximinerais apresentam baixa interação com

antagonistas no trato gastrointestinal e sua disponibilidade aumenta nas porções iniciais do intestino onde é absorvido e direcionado para diversas funções biológicas no corpo, diferentemente das demais fontes (REDDY et al., 2021).

Os estudos com hidroxicloretos deram início em 1990, quando descobriu-se um novo sal que resultava em um complexo mineral inorgânico hidrolisado, chamado de hidroxiclreto. Os hidroxicloretos, quimicamente formados por uma molécula tridimensional, são altamente estáveis, fazendo ligações covalentes suficientemente fortes para evitar interações negativas com outros nutrientes e ao mesmo tempo, permitem que o mineral esteja disponível no intestino, seu campo de absorção (COHEN & STEWARD, 2014).

Alguns pontos positivos relacionados ao uso de hidroxicloretos em dietas (aumento a estabilidade) e nos animais (melhora a biodisponibilidade e até a palatabilidade) já foram confirmadas em outras pesquisas quando comparadas com fontes inorgânicas convencionais (LU et al., 2010; SHAEFFER et al., 2017; CARAMALAC et al., 2017).

Franklin et al. (2022) constataram que frangos de corte recebendo diferentes fontes e níveis de minerais (Cu, Mn e Zn) apresentaram melhores resultados de ganho de peso final, ganho de peso diário e reduziram a excreção desses minerais quando suplementados com níveis mais baixos e com fontes de hidroxicloretos em comparação às fontes sulfatos. Assim como Oluyinka et al. (2018) também compararam duas fontes de Cu e Zn (sulfato e hidroxiclreto) e dois níveis (80 e 20 ppm) em dietas de frangos de corte com 35 dias de idade, observaram que houve melhora na conversão alimentar e rendimento de peito das aves que receberam a fonte hidroxiclreto.

Santos et al. (2021) observaram que os hidroxicloretos Cu e Zn suplementados em dietas de frangos de corte apresentaram maior biodisponibilidade mineral melhorando o desempenho e garantindo bom rendimento de carcaça, com 150 ppm de Zn e 80 ppm de Cu, respectivamente, devido principalmente às características químicas desses minerais.

Desse modo, busca-se entender a essencialidade e a interação de cada mineral estudado com o organismos dos frangos de corte, bem como os resultados que a sua aplicação tem sobre os parâmetros de saúde e desempenho.

1.2. Cobre (Cu)

A essencialidade do Cu foi identificada pela primeira vez em 1928, relacionando-o com a formação da hemoglobina e prevenção de vários distúrbios clínicos e patológicos em diversas espécies animais (SUTTLE, 2010). Segundo Byerne e Murphy (2022), o Cu está envolvido com diversas reações metabólicas incluindo a respiração celular, pigmentação de tecidos, formação de

células sanguíneas e desenvolvimento de tecidos conectivos, além de ser componente de diversas enzimas metal dependentes e proteger as células contra o estresse oxidativo.

A recomendação de Cu para frangos de corte, segundo Rostagno et al. (2017) é de 11,86mg, 10,54 mg, 8,31mg, 7,79 mg e 6,08 mg/kg de ração durante as fases pré inicial, inicial, crescimento I, crescimento II e final, respectivamente.

Em frangos de corte a absorção do Cu ocorre no pró-ventrículo e no duodeno por meio de difusão simples ou por meio de transportadores metal divalente específicos e não específicos, sendo estes transportadores importantes reguladores das concentrações de cobre de acordo com a necessidade do organismo. Os mecanismos que regulam a absorção do Cu são definidos de acordo com a disponibilidade do mineral na dieta, sendo que em altas concentrações a absorção acontece por difusão simples e, em baixas concentrações o transporte ativo é acionado (GOOF, 2018).

Demais minerais, como o Zn e o Ferro (Fe), também podem competir com o Cu pelos transportadores de membrana, reduzindo sua absorção e, concentrações em excesso desses minerais podem resultar em deficiência de Cu no organismo (LESSON, 2009).

Após absorvido, o Cu se liga a albumina plásmica e é carregado até o fígado e então incorporado com a ceruloplasmina e liberado para a circulação. O Cu pode permanecer estocado para trocas sanguíneas e, segundo Buckley (1991) sua concentração encontrada no fígado é de 8 a 9%. O reaproveitamento do Cu circulante acontece nos tubos renais de forma eficiente e pouco eficiente nas secreções biliares, uma vez que a bile é sua rota de excreção quando as concentrações de Cu no fígado estão em seu nível máximo (LESSON, 2009; BYRNE & MURPHY, 2022).

O Cu participa de diversos processos enzimáticos como cofator, por exemplo, indispensável para a metaloenzima citocromo oxidase que age no processo de respiração celular, é cofator catalítico da enzima superóxido dismutase do sistema antioxidante e está correlacionado com a formação da hemoglobina, servindo como catalisador da ceruloplasmina (SCOTTÁ et al., 2014). Segundo McDowell (2003), 90% de todo o Cu do organismo animal está associado a ceruloplasmina, transportando o mineral para os órgãos alvos, permitindo a oxidação do íon ferroso em íon férrico, ligando-o com a transferrina formando nova molécula de hemoglobina.

Na avicultura o Cu também é usado em níveis supranutricionais por ter a capacidade de melhorar a conversão alimentar e ter efeito melhorador de desempenho. Segundo Mehring et al. (1960) a suplementação de Cu em níveis abaixo do considerado tóxico às aves (500ppm) possui efeito similar aos antibióticos.

O Cu foi proposto como antimicrobiano por liberar íons que induzem a perda do potencial de membrana do conteúdo citoplasmático de bactérias, ocorrendo o influxo de íons de Cu no interior

da célula e posterior dano oxidativo dos componentes celulares e lise do DNA (LUO et al., 2017; PARRA et al, 2018).

Por conta das suas funções, o interesse pelo uso do Cu com ação antimicrobiana se tornou cada vez maior, aliado ao decrescente uso e crescentes restrições impostas aos antimicrobianos convencionais. Segundo Kim et al. (2022) a suplementação de 100 ppm de Cu melhora o desempenho de frangos de corte de modo semelhante a avilamicina, sugerindo o mineral como possível substituto aos antimicrobianos convencionais.

Também é relatado na literatura que o Cu tenha efeito estimulando o ganho de peso de frangos de corte por participar da síntese da hemoglobina, ajudando a melhor oxigenar os tecidos e promover adequado crescimento (KWIECIEN et al., 2014). O Cu também aumenta a expressão de genes do hormônio do crescimento na glândula pituitária, promovendo modificações pós traducionas regulatórias de peptídeos (EIPPER & MAINS, 1988).

Nesse sentido, Nguyen et al. (2020) afirmaram que a suplementação Cu na forma hidroxicloreto nos níveis de 15 ppm e 200 ppm é efetivo em melhorar o desempenho de frangos de corte, aumentando o ganho de peso e a conversão alimentar, justamente por ser mais biodisponível e aumentar as concentrações de Cu nos tecidos.

Lu et al., (2010) também constataram que a suplementação de Cu na forma hidroximineral para frangos de corte melhorou o desempenho das aves devido o efeito promotor de crescimento do Cu em alterar a microbiota intestinal reduzindo a susceptibilidade das aves às doenças e melhorando a absorção de nutrientes por consequência.

1.3. Manganês (Mn)

O Mn é o quinto elemento mineral mais abundante e essencial para os animais. Em frangos de corte, o Mn desempenha importante papel na formação de ossos e em vários processos bioquímicos como ativador de enzimas: como por exemplo a piruvato carboxilase que faz parte do metabolismo de lipídeos produzindo oxalacetato (JASEK et al., 2019) e, a enzima superóxido dismutase importantíssima para o sistema antioxidante neutralizando radicais livres (SUTTLE 2010; ZHU et al., 2016). É essencial para o desenvolvimento embrionário, crescimento normal do corpo e ossos, funções reprodutivas, agindo no metabolismo de carboidratos e lipídeos, além de prevenir a perose (OLGUN, 2017).

A recomendação de Mn para frangos de corte, segundo Rostagno et al. (2017) é de 81,99mg, 73,98mg, 58,36mg, 47,68mg e 42,72 mg/kg de ração durante as fases pré inicial, inicial, crescimento I, crescimento II e final, respectivamente.

Por conta da sua essencialidade, a suplementação de Mn passou a ser uma preocupação aos nutricionistas, principalmente pelo rápido crescimento dos frangos de corte modernos. Normalmente, os ingredientes utilizados nas dietas de frangos de corte são relativamente ricos em Mn, no entanto, a absorção desse micromineral é baixa, principalmente devido à formação de complexos com fitatos e fibras, assim como demais nutrientes da dieta como Cálcio (Ca) e Fósforo (P), que podem inibir absorção do Mn, seja diluindo a concentração desse mineral ou competindo pelo mesmo sítio de absorção (MACARI et al, 2002).

A absorção do Mn acontece nas células da mucosa do intestino delgado, principalmente no íleo, onde transportadores de íons metálicos específicos carregam o Mn do lúmen intestinal para dentro do enterócito, uma vez que sem os transportadores apenas 5% do mineral seria aproveitado de forma passiva (TUFARELLI e LAUDADIO, 2017).

Após a absorção, o Mn é oxidado a Mn^{3+} , ligando-se à transferrina e distribuído aos tecidos. Os tecidos ricos em mitocôndrias são os que possuem maior concentração do mineral uma vez que estas os retém e os direcionam para o metabolismo celular (OBERLEAS et al., 1999).

O Mn está distribuído em vários tecidos, mas o tecido ósseo é o local de maior reserva desse mineral, seguido pelo tecido hepático. Também há altas reservas de Mn em glândulas como a pineal e pituitária e, em pintainhos as maiores concentrações são no fígado, rim e ossos (SUTTLE, 2010).

Frangos de corte possuem capacidade de armazenar o excesso de Mn, principalmente pelos ossos. No entanto, a excreção do Mn excedente é regulada por duas vias, sendo a excreção pela bile a principal delas, onde o fígado absorve rapidamente o Mn e o incorpora com o fluido biliar. Já a outra via é formada através das rotas gastrointestinais auxiliares (SUTTLE, 2010).

Quando a concentração de Mn fica abaixo do exigido nutricionalmente pela ave, frangos de corte apresentam grande redução no desenvolvimento ósseo, causando perose e condrodistrofia. Também pode haver redução na fertilidade e eclodibilidade dos ovos, prejuízo no metabolismo de lipídeos e carboidratos e, em galinhas poedeiras, queda na produção de ovos e piora nos índices de qualidade interna e externa dos ovos (SINGH et al, 2015; TUFARELLI & LAUDADIO, 2017).

A suplementação de Mn, além de agir no sistema enzimático também pode ter efeito sobre os parâmetros de desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Jasek et al. (2019) afirmam que níveis acima de 40ppm de hidroxicloretos de Mn tem impacto positivo no desempenho de frangos de corte, principalmente nas fases finais melhorando a conversão alimentar e aumentando a deposição de Mn nos ossos, atribuindo tal fato à maior exigência de manutenção dos frangos nessa idade além acreção muscular e do rápido crescimento ósseo.

Kim et al. (2022) suplementando diferentes níveis de Mn (60, 120 e 200 ppm) não observaram diferença no desempenho de frangos de corte. No entanto, notou-se redução na porcentagem de gordura abdominal e intramuscular das aves e, redução das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em frangos suplementados com 200ppm, reforçando a interação do Mn com as enzimas do sistema antioxidante, como a superóxido dismutase reduzindo a oxidação lipídica da carne e a atividade de lipoproteína lipase, enzima relacionada com a deposição de gordura, melhorando os parâmetros de qualidade de carne.

Maiores níveis de Mn (100 e 200 ppm) suplementados em dietas de frangos também reduzem a incidência de anormalidade nas patas de frangos de corte em comparação aos frangos sem suplementação, evidenciando os efeitos da deficiência de Mn bem como a sua ação nas enzimas da matriz óssea (LU et al., 2007).

O Mn também é requerido pelas enzimas do sistema imunológico, uma vez que é importante elemento para suporte normal das funções desse sistema (KIDD, 2004) e, interage com neutrófilos e macrófagos, células envolvidas na resposta imune (SUNDER et al., 2006). Burin Junior et al. (2019) observaram que a suplementação de Mn apresentou maior eficiência na resposta imune de frangos de corte após o desafio de vacina contra coccidiose e enterite necrótica, uma vez que o Mn é benéfico durante os desafios entéricos devido ao seu papel na produção de mucopolissacarídeos.

1.4. Zinco (Zn)

O Zn é componente ou cofator em mais de 200 processos enzimáticos além de ser vital para o metabolismo de lipídeos e enzimas, ácidos nucleicos, proteínas e indispensável para diversas metaloenzimas. Possui importante função na ação da insulina, glucagon, hormônios corticotróficos, folículo estimulante e luteinizante (PEZZATO et al., 2004; AO & PIERCE, 2013).

O modo de ação do Zn inclui manter crescimento normal, incluindo bom desenvolvimento esquelético, da pele e saúde das patas, ação imunomoduladora aumentando a resitência à processos infecciosos, alterando o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e, melhora no status antioxidante por meio da expressão de enzimas que atuam no sistema digestivo e antioxidante, respectivamente (TABATABAIE et al., 2007).

Segundo Rostagno et al. (2017) a recomendação de Zn para frangos de corte é de 76,15 mg, 68,72 mg, 54,21 mg, 44,29 mg e 39,67 mg/kg de ração para as fases pré iniciais, iniciais, crescimento I, crescimento II e final, respectivamente.

No entanto, em animais não ruminantes como os frangos de corte, nem todo o Zn da dieta pode ser aproveitado e tal processo pode não ser tão eficiente devido aos fatores antagonistas,

especialmente a presença de fitatos e à forma como esse micromineral é suplementado na dieta das aves, que acabam formando complexos insolúveis com o mineral (SUTTLE, 2010).

Além dos fitatos, a biodisponibilidade do Zn pode ser afetada inclusive por outros minerais com mesma similaridade química, competindo pelos mesmos mecanismos de transporte, facilitando ou impedindo a absorção pelo epitélio (GLOVER et al., 2003).

Os fatores que alteram a disponibilidade do Zn em dietas, seja natural ou suplementar, são classificados como intrínsecos ou extrínsecos, como idade; pH do trato gastro intestinal e fatores como quantidade ingerida; forma química e relações com demais nutrientes da dieta, respectivamente (BALTACI et al., 2019).

É de extrema importância a manutenção dos níveis adequados de Zn no sangue e no fígado. Por isso, quando as concentrações ficam abaixo das exigências requeridas pelos animais de produção ocorre mobilização das reservas ósseas (BALTACI et al., 2019). A ampla via metabólica dependente do Zn ligada à proteínas e suas inter-relações regulam a homeostase e distribuição do mineral. Tais mecanismos regulatórios são efetivos na sua absorção, distribuição e excreção, prevenindo o organismo contra deficiências e excessos de minerais (GLOVER & HOGSTRAND, 2002).

O Zn chega ao trato gastrointestinal via dieta e é absorvido no duodeno pela superfície da borda em escova por um processo ativo, mediado por carreadores (SUTTLE, 2010). Em pintainhos, o Zn pode ser absorvido também pelo pro-ventrículo (MAIORKA & MACARI, 2002).

A concentração de Zn no interior das células é regulada por metalotioneínas intestinais e pela proteína intestinal rica em cisteína (CRIP). Em situações em que a concentração está alta, o mineral se liga as metalotioneínas e, em seguida, é eliminado junto com as fezes e células descamadas. Por outro lado, quando as concentrações de Zn estão baixas, as metalotioneínas regulam a transferência do zinco para as CRIP's, agindo como um carreador intracelular de zinco, aumentando dessa maneira a velocidade de absorção, transportando o Zn em seguida para a corrente sanguínea (MAFRA & COZZOLINO, 2004).

A síntese de metalotioneína é influenciada pela concentração de Zn dietético (sendo este a principal forma de controle), concentração de Zn plasmático e também pela quantidade de Zn absorvido, garantindo a homeostase do mineral (McDOWELL, 2003; COZZOLINO, 2020). As metalotioneínas também agem como principal fonte de armazenamento de Zn no fígado, podendo ser rapidamente mobilizadas durante necessidades metabólicas (MAIORKA & MACARI, 2002).

Após ser absorvido o Zn é liberado dos enterócitos e atravessa até os capilares mesentéricos e chega ao sistema sanguíneo, sendo transportado pela albumina, e então captado pelo

fígado e direcionado ao plasma e aos sítios celulares para executar funções específicas. O Zn no plasma está cerca de 90% associado à albumina e 10% ligado à Alfa-2-macroglobulina e aos aminoácidos, principalmente a cisteína e a histidina (ISLAM & LOOTS, 2007).

De modo geral, os animais de produção assim como as aves, conseguem regular as concentrações de Zn corporal por meio de transportadores detectáveis pelo mRNA (SUTTLE, 2010). O Zn está distribuído em todos os tecidos e em situações de deficiência, há grande redução das concentrações de Zn plasmático. Nessas condições de escassez, metalotioneínas e o Zn reservado nos tecidos ósseos e musculares são mobilizados e possíveis excedentes são liberados para normalizar a homeostase (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

A suplementação ineficiente de Zn caracteriza redução no consumo e na utilização dos nutrientes da dieta, retardando o crescimento das aves (SAHIN & KUCUK, 2003). Nesse sentido, Sahoo et al. (2014) e Akhavan-Salamat & Ghasemi (2019) evidenciaram que a deficiência de Zn afeta negativa o status imunológico e antioxidante de frangos de corte, uma vez que o Zn também está relacionado com a produção e atividade hormonal do timo, anticorpos, sendo considerado micromineral primordial na resposta imunológica primária e na cicatrização, além da proliferação celular uma vez que é cofator da DNA polimerase e RNA transcriptase (COZZOLINO, 2020; VOGT, 2005).

Já em situações de excesso de Zn no organismo, o mineral é armazenado no tecido ósseo e também nas metalotioneínas no fígado, permitindo que seja liberado ao organismo conforme a necessidade. Além dessas duas formas de armazenamntno, o Zn também pode ser armazenado no tecido muscular (FERNANDES, 2012). Apesar disso, as aves tem considerável tolerância às altas concentrações de Zn (SUTTLE 2010). No entanto, Dean e Hargis (1991), suplementando frangos de corte com 500 ppm de Zn observaram que níveis elevados reduziram o consumo e por consequência, houve queda no desempenho, pré dispondo as aves à endocrinopatias. Já Sunder et al. (2008) afirmam que 320 ppm de Zn prejudica a deposição mineral na tíbia.

1.5. *Protômica aplicada na avicultura*

Pesquisas envolvendo o estudo da proteômica iniciaram na década de 1990 em virtude de grande quantidade de sequências peptídicas catalogadas em diversos bancos de dados por meio de áreas como a eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e pesquisa em alta escala com genoma. Esses dados passaram a ser trabalhados com bioinformática, obtendo perfis de expressão de proteínas que são ferramentas chaves para esta linha de estudo (MANSO et al., 2005).

O estudo da proteômica permite compreender as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão e modificações pós traducionais, caracterizando qualitativamente e

quantitativamente o perfil proteico, permitindo a compreensão de mecanismos moleculares que alteram os fenótipos. A síntese proteica permite que um mesmo genoma tenha ampla possibilidade de sintetizar proteínas com diversas funções (NAABY-HANSEN et al., 2001; PRASAD et al., 2017).

Já o termo metaloproteômica é o estudo de proteínas associadas com metais (*metal-binding proteins* ou metaloproteínas) que agem como cofator metálico. Nesses casos, a proteína precisa estar obrigatoriamente ligada ao metal para exercer sua função, diferentemente das proteínas associadas com metais, onde o metal não imprime nenhuma função à proteína (MOUNICOU et al., 2009).

As metaloproteínas representam grande porcentagem dentre todas as proteínas e, segundo Banci (2003), cerca de 40% de todas as proteínas e enzimas dependem de um íon metálico em sua estrutura para desempenharem a função designada (KENNEDY & GIBNEY, 2001). Evidenciando assim a importância e dependência do funcionamento do organismo em relação às metaloproteínas e seus íons metálicos (GARCIA et al., 2006).

A aplicação da proteômica em estudos com animais de produção permite o entendimento da interação de proteínas com características relacionadas à saúde, desempenho produtivo e bem-estar dos animais (ALMEIDA et al., 2015). A proteômica pode auxiliar, por exemplo, na avaliação das interações de diferentes estratégias nutricionais sobre as alterações no proteoma de células, tecidos ou fluídos corporais, elucidando como estas mudanças influenciam as características produtivas ou os produtos gerados (ALMEIDA & BENDIXEN, 2012).

Na avicultura, a proteômica tem grande importância no entendimento de biomecanismos de doenças e patógenos, performance e parâmetros de saúde e bem-estar que impactam economicamente este setor, seja através da caracterização desses patógenos ou identificando biomarcadores que auxiliem na compreensão dos fenômenos biológicos/fisiológicos (MIOTTO et al., 2010).

Em galinhas poedeiras, Qiu et al. (2012) identificaram por meio do estudo proteômico a formação do complexo lisozima-ovoalbumina em decorrência dos dias de armazenamento de ovos sob altas temperaturas que contribui negativamente para durabilidade do ovo, sendo importante indicador para mensurar as características internas de qualidade do ovo.

Em outro estudo também com poedeiras, foi identificado duas proteínas principais na casca dos ovos (inibidor de protease tipo *Kunitz* e ovolixina 32) ambas com funções antimicrobianas que podem ser relevantes para a predição/seleção de ovos mais resistentes ao armazenamento, ou ainda, ao processo de incubação (ROSE-MARTEL et al., 2012).

Já em frangos de corte também é possível identificar biomarcadores associados com a rápida ou lenta taxa de crescimento de diferentes linhagens de frangos de corte (PHONGPAN-NGAN et al., 2011), bem como proteínas associadas com a degradação *post mortem* da carne de frangos de corte (MOLLETE et al., 2003), e identificação de biomarcadores associados com o estresse e bem-estar, ou características de desempenho de frangos de corte (HAZARD et al., 2011), permitindo aplicações futuras como a seleção de aves mais resistentes à doenças, mais produtivas ou com características desejáveis para qualidade de carcaça que tornem a avicultura industrial ainda mais lucrativa.

Ainda nesse sentido, a aplicação da proteômica em suínos identificou que a suplementação de Zn (2.000 mg/kg) causa alta concentração do mineral no fígado e altera a expressão de certos genes, aumentando as proteínas peroxiredoxinas (PXDR4) e glioxalases (GLO1) que estão relacionadas à resposta do corpo animal ao estresse oxidativo (BONDZIO et al., 2013). O acúmulo de Zn no fígado também está associado com redução na expressão de genes de *heat Shock proteins* (HSP70) e aumento de chaperonas – enzimas importantes na resposta causada por situações estressoras (SOTI & CSERMELY, 2003).

A fonte de mineral usada pode alterar o resultado proteômico no metabolismo animal. A suplementação de Zn orgânico em comparação ao Zn inorgânico em dietas de frangos de corte apresentou maior expressão de proteínas relacionadas com o sistema imune e correto metabolismo celular (divisão, transporte e ciclo intracelular), especialmente para os enterócitos, permitindo maior absorção dos nutrientes da dieta convertendo em melhor desempenho (JAROZ et al., 2022).

Além da fonte, o nível de micromineral suplementado em dietas de aves pode modular o metabolismo animal. Frangos de corte suplementados com alto nível de Cu (330 mg/kg) apresentaram maior atividade de apoptose nas células dos rins. Por meio do estudo proteômico foi possível identificar mais de 62 metabólitos *Cu-dependentes* associados com apoptose no tecido renal que resultou em pior desempenho e score de carcaça (LIAO et al., 2021).

Porém, ao suplementar frangos de corte com níveis mais baixos de Cu orgânico (7,5 mg/kg) El-Katcha et al (2020) observaram maior concentração de lisozima no soro, indicando estímulo do sistema imunológico, além de aumentar a expressão de genes específicos de enzimas responsáveis por esse sistema.

As proteínas identificadas a partir da proteômica podem ser consideradas biomarcadores nutricionais pois podem auxiliar no entendimento de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na absorção, transporte e metabolismo de nutrientes. Além disso, podem funcionar como um parâmetro mensurável que relaciona uma exposição específica de um composto alimentar a um estado de saúde e, portanto, oferece um grande potencial para entender a relação

entre nutrição e saúde (KUSSMANN, et al., 2010). Nesse sentido, tecnologias empregadas nos estudos proteômicos em conjunto com uma variedade de técnicas inovadoras de detecção de metais, oferecem um potencial significativo na identificação de proteínas, metaloproteínas ou proteínas ligadas a metais como possíveis biomarcadores (HARVEY & McARDLE, 2008), uma vez que o metaloproteoma pode fornecer informações relevantes sobre o quanto dos minerais ingeridos foram absorvidos e incorporados às biomoléculas funcionais, por exemplo.

Assim, a tecnologia do estudo da proteômica é essencial na identificação de biomarcadores que podem ser ligados à qualidade carne, fatores estressores, presença de patógenos e doenças, proteínas relacionadas com a seleção de aves com melhor perfil produtivo e até mesmo avaliar a nível celular as interferências de fatores externos sobre o desempenho de frangos de corte e poedeiras. Por isso a identificação destes biomarcadores auxiliam para compreensão, mitigação ou ao menos controle de situações que podem ter algum impacto sobre os animais de produção, especialmente as aves.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A utilização de fontes inorgânicas de minerais é menos eficiente que fontes orgânicas em dietas de frangos de corte devido à sua reatividade com outros componentes e baixa disponibilidade. Já as fontes orgânicas não compartilham dos mesmos pontos negativos das fontes inorgânicas, no entanto tem um alto custo que muitas vezes acabam inviabilizando seu uso. Diante desse cenário, surgiu terceira geração de minerais: os hidroxicloretos minerais. Os hidroximerais são formados por ligações covalentes que os conferem baixa reatividade com os demais nutrientes da dieta, maior disponibilidade ao organismo e menor excreção no ambiente quando comparados com as fontes inorgânicas tradicionais. Já o estudo da proteômica permite avaliar o perfil de proteínas alteradas frente às estratégias nutricionais testadas.

Nesse sentido, de acordo com a essencialidade do Cu, Mn e Zn para o correto desenvolvimento de frangos de corte, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação desses microminerais em diferentes níveis e fontes em dietas de frangos de corte.

O Capítulo II foi intitulado “SUPLEMENTAÇÃO DE COBRE, ZINCO E MANGANÊS SOB O DESEMPENHO E RENDIMENTO DE PARTES DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM COCCIDIOSE” e adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico científico British Poultry Science.

O Capítulo III foi intitulado “PERFIL METALOPROTEÔMICO DE PLASMA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE

COBRE, MANGANÊS E ZINCO” e adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico científico *British Poultry Science*.

O Capítulo IV foi intitulado “PERFIL METALOPROTEÔMICO DE FÍGADO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE COBRE, MANGANÊS E ZINCO” e adequado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico científico *British Poultry Science*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HACK, M. E.; ALAGAWANY, M.; ARIF, M.; CHAUDHRY, M. T.; EMAM, M.; PATRA, A. Organic or inorganic zinc in poultry nutrition: a review. **Word's Poultry Science Journal**, v. 73, p. 904 – 915, 2017.

AGAPITO, G. SEYBOTH, L. Hidroxi-minerais – uma nova abordagem para uso em todas as espécies animais. **Avicultura Industrial**, nº 2, 2017.

AKHAVAN-SALAMAT, H.; GHASEMI, H. A. Effect of different sources and contents of zinc on growth performance, carcass characteristics, humoral immunity and antioxidant status of broiler chickens exposed to high environmental temperatures. **Livestock Science**, v. 223, p. 76 – 83, 2019.

ALMEIDA, A. M., BENDIXEN, E. P. Proteomics: a review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4296 – 4314, 2012.

ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHIDE, M.; CEILIANI, F.; CRISTOBAL, S.; ECKERSALL, P. D.; HOLLUNG, K.; LISACEK, F.; MAZZUCHELLI, G.; McLAUGHLIN, M.; MILLER, I.; NALLY, J. E.; PLOWMAN, J.; RENAUT, J.; RODRIGUES, P.; RONCADA, P.; STARIC, J.; TURK, R. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, v. 9, p. 1 – 17, 2015.

AO, T.; PIERCE, J. The replacement of inorganic mineral salts with mineral proteinates in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 5 – 16, 2013.

BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R.; BALTACI, S. B. The role of zinc in the endocrine system. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 231 – 239, 2019.

BANCI, L. Molecular dynamics simulations of metalloproteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 143 – 149, 2003.

BONZIO, A.; PIPER, R.; GABLER, C.; WEISE, C.; SCHULZE, P.; ZENTEK, J.; EINSPANIER, R. Feeding low or pharmacological concentrations of zinc oxide changes the hepatic proteomic profiles in weaned piglets. **PLoS One**, v. 8, p. e81202, 2013.

BUCKLEY, W. T. A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 155 – 166, 1991.

BURIN JUNIOR, A. M.; FERNANDES, N. L. M.; SNAK, A.; FIREMAN, A.; HORN, D.; FERNANDES, J. I. M. Arginine and manganese supplementation on the immune competence of broilers immune stimulated with vaccine against Salmonella Enteritidis. **Poultry Science**, v. 98, p. 2160 – 2168, 2019.

BYRNE, L.; MURPHY, R. A. Relative Bioavailability of Trace Minerals in Nutrition: A Review. **Animals**, v. 12, p. 1981 – 2027, 2022.

CARAMALAC, L. S.; NETTO, A. S.; MARTINS, P. G. M. A.; MORIEL, P.; RANCHES, J.; FERNANDES, H. J.; ARTHINGTON, J. D. Effects of hydroxychloride sources of copper, zinc and manganese on measures of supplement intake, mineral status, and pre and postweaning performance of beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 1739 – 1750, 2017.

COHEN, J.; STEWARD, F. A. Hydroxy Minerals - The newest development in mineral nutrition: feed science. **AFMA Matrix**, v. 23, p. 45-49, 2014.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Manole, 6 ed, 960p, 2020.

DEAN, C. E.; HARGIS, P. S. Effects of zinc toxicity on thyroid function and histology in broiler chicks. **Toxicology Letters**, v. 57, p. 309 – 318, 1991.

EIPPER, B. A.; MAINS, R. E. Peptide α -amidation. **Annual Review of Physiology**, v. 50, p. 333 - 344, 1988.

EL-KATCHA, M. I.; SOLTAN, M. A.; KHALIFA, E.; FADL, S. E.; HASSAN, A.; EL-SHIMEY, O. K.; EL-NAGGAR, K. Immune response of broiler chicks fed on oxidized oil and supplemented with different copper sources and levels. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 66, p. 15 – 26, 2020.

ISLAM, M. S.; LOOTS, D. T. Diabetes, metallothionein and zin interaction: a review. **Biofactors**, v. 29, n. 4, p. 203 – 212, 2007.

FERNANDES, M; N. S. Metabolismo de zinco na nutrição de frangos de corte e suas respostas no desempenho e no sistema imune. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, p. 2104 – 2115, 2012.

FRANKLIN, S. B.; YOUNG, M. B.; CIACCIARIELLO, M. The impact of different sources of Zinc, Manganese and Copper on broiler performance and excreta output. **Animals**, v. 12, n. 1067, p. 1 – 8, 2022.

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analyses. **Talanta**, v. 69, p. 1 – 15, 2006.

GLOVER, C. N.; BURY, N.R.; HOGSTRAND, C. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. **Biochemic et Biophysica Acta**, v. 1614, p. 211 – 219, 2003.

GLOVER, C. H.; HOGSTRAND, C. In vivo characterization f intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 141 – 150, 2002.

GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 2763 – 2813, 2018.

HARVEY, L. J., McARDLE, H. J. Biomarkers of copper status: a brief update. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. S10 – S13, 2008.

HAZARD, D.; FERNANDEZ, X.; PINGUET, J.; CHAMBON, C.; LETISSE, F.; PORTAIS, J.; WADIH-MOUSSA, Z.; REMIGNON, H.; MOLETTE, C. Functional genomics of the muscle response to restraint and transport in chickens. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2717 – 2730, 2011.

JAROZ, L. S.; MICHALAK, K.; MAREK, A.; HEJDYSZ, M.; CISZEWSKI, A.; KACZMAREK, S.; KWIECIEN, M.; GRADZKI, Z. The effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulphate on hepatic proteome profiles in chickens. **Livestock Science**, v. 262, p. 104983, 2022.

JASEK, A.; COUFAL, C. D.; PARR, T. M.; LEE, J. T. Evaluation of increasing manganese hydroxychloride level on male broiler growth performance and tibia strength. **Journal Applied of Poultry Research**, v. 28, p. 1039 – 1047, 2019.

KENNEDY, M. L.; GIBNEY, B. R. Metalloprotein and redox protein design. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 485 – 490, 2001.

KIDD, M. T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v. 85, p. 650 – 657, 2004.

KIM, M. J.; HOSSEINDOUST, A.; KIM, Y.; MOTURI, J.; LEE, J. H.; KIM, T. G.; MUN, J. Y.; CHAE, B. J. Improving the bioavailability of manganese and meat quality of broilers by using hot-melt extrusion nano method. **British Poultry Science**, v. 63, p. 211 – 217, 2022.

KUSSMANN, M., PANCHAUD, A., AFFOLTER, M. Proteomics in nutrition: status quo and outlook for biomarkers and bioactives. **Journal of Proteomic Research**, v. 9, p. 4876 – 4887, 2010.

KWIECIEN, M. A.; WINIARSKA-MIECZAN, K.; ZAWISLAK, K.; SROKA, S. Effect of copper glycinate chelate on biomechanical, morphometric and chemical properties of chicken femur. **Annals of Animal Science**, v. 14, p. 127– 139, 2014.

LEESON, S. Copper metabolism and dietary needs. Reviews. **Word's Poultry Science Association**. v. 65, p. 353 – 366, 2009.

LIAO, J.; YANG, F.; BAI, Y.; YU, W.; QIAO, N.; HAN, Q.; ZHANG, H.; GUO, J.; HU, L.; LI, Y.; PAN, J.; TANG, Z. Metabolomics analyses reveals the effect of copper on mitochondria-mediated apoptosis in kidney of broiler chicken (*Gallus gallus*). **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 224, p. 111581, 2021.

LU, L.; WANG, R. L.; ZHANG, Z. J.; STEWARD, F. A.; LUO, X.; LIU, B. Effect of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on the growth performance, liver copper concentrations of broilers fed in floor pens, and stabilities of vitamin E and phytase in feeds. **Biological Trace Element Research**, v. 138, p. 181 – 189, 2010.

LU, L.; LUO, X. G.; JI, C.; LIU, B.; XU, S. X. Effect of manganese supplementation and source on carcass traits, meat quality. and lipid oxidation in broilers. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 812 – 822, 2007.

LUO, J.; HEIN, C.; MUCKLICK, R.; SOLIOZ, M. Killing of bacteria by copper, cadmium, and silver surfaces reveals relevant physicochemical parameter. **Biointerphases**, v. 12, p. 020301, 2017.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79 – 87, 2004.

MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de Minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviaria aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 375 p. 2002.

MANSO, M. A.; LÉONIL, G. J.; GAGNAIRE, V. Application of proteomics to the characterization of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 845 – 855, 2005.

McDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**, Elsevier, 2 ed, 660 p. 2003.

MEHRING, A. L.; BRUMBAUGH, J. H.; SUTHERLAND, A. J.; TITUS, H. W. The tolerance of growing chickens for dietary copper. **Poultry Science**, v. 39, p. 713 – 719, 1960.

MIOTTO, O.; HEINY, A. T.; ALBRECHT, R.; GARCÍA-SASTRE, A.; TAN, T. W.; AUGUST, J. T.; BRUSIC, V. Complete-Proteome Mapping of Human Influenza A Adaptative Mutatuiins: Implications for Human Transmissibility of Zoonotic Strains. **Plos One**, v. 5: e9025, 2010.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology, **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1119 – 1138, 2009.

MWANGI, S.; TIMMONS, J.; AO, T.; PAUL, M.; MACALINTAL, L.; PESCATORE, A.; CANTOR, A.; FORD, M.; DAWSON, K. A. Effect of zinc imprinting and replacing inorganic zinc with organic zinc on early performance of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 96, n. 4, p. 861 – 868, 2017.

NAABY-HANSEN, S.; WATERFIELD, M. D.; CRAMER, R. Proteomics – post-genomic cartography to understand gene function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 7, p. 376–384, 2001.

NGUYEN, H. T. T.; MORGAN, N.; ROBERTS, J. R.; SWICK, R. A.; TOGHYANI, M. Copper hydroxychloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels. **Poultry Science**, v. 99, p. 6964 – 6973, 2020.

OBERLEAS, D. **Minerals: nutrition and metabolism**. New York: Vantage Press, 1 ed, 244 p. 1999.

OLGUN, O. Manganese in poultry nutrition and its effect on performance and eggshell quality. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, p. 1 – 11, 2017.

OLUYINKA, O. A.; KUJIK, S. V.; HAN, Y. Copper and Zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science**, n. 97, p. 3891 – 3898, 2018.

PARRA, A.; TORO, M.; JACOB, R.; NAVARRETE, P.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA, G.; REYES-JARA, A. Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 113-118, 2018.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, F. E. P. Nutrição de Peixes. In: CYRYNO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo? TecArt**, 2004, p. 74 – 169. SÁ, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. **Aquaculture**, v. 238. p. 385 – 401, 2004.

PHONGPA-NGAN, P.; GRIDER, A.; MULLIGAN, J. H.; AGGREY, S. E.; WICKER, L. Proteomic analysis and differential expression in protein extracted from chicken with a varying growth rate and water-holding capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13181 – 13187, 2011.

PRASAD, T. S. K.; MOHANTY, A. K.; KUMAR, M.; SREENIVASAMURTHY, S. K.; DEY, G.; NIRUJOGI, R. S.; PINTO, S. M.; MADUGUNDU, A. K.; PATIL, A. H.; ADVANI, J.; MANDA, S. S.; GUPTA, M. K.; DWIVEDI, S. B.; KELKAR, D. S.; HALL, B.; JIANG, X.; PEERY, A.; RAJAGOPALAN, P.; YELAMANCHI, S. D.; SOLANKI, H. S.; RAJA, R.; SATHE, G. J.; CHAVAN, S.; VERMA, R.; PATEL, K. M.; JAIN, A. P.; SYED, N.; DATTA, K. K.; KHAN, A. A.; DAMMALLI, M.; JAYARAM, S.; RADHAKRISHNAN, A.; MITCHELL, C. J.; NA, C.-H.; KUMAR, N.; SINNIS, P.; SHARAKHOV, I. V.; WANG, C.; GOWDA, H.; TU, Z.; KUMAR, A.; PANDEY, A. Integrating transcriptomic and proteomic data for accurate assembly and annotation of genomes. **Genome Research**, v. 27, p. 133–144, 2017.

QIU, N.; MA, M.; ZHAO, L.; LIU, W.; LI, Y.; MINE, Y. Comparative proteomic analysis of egg white proteins under various storage temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7746 – 7753, 2012.

REDDY, B. V.; NAYAK, S.; KHARE, A.; PAL, P. P.; SHARMA, R.; CHOURASIYA, A.; NAMDEO, S.; THAKUR, S. Role of hydroxy trace mineral on health and production of livestock: a review. **Journal of Livestock Science**, v. 121, p. 279 – 286, 2021.

ROSE-MARTEL, M.; DU, J.; HINCKE, M. T. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2697–2706, 2012.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I.; DONZELE, J. L.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G.; SARAIVA, A.; ABREU, M. L. T.; RODRIGUES, P. B.; OLIVEIRA, R. F.; BARRETO, S. L. T.; BRITO, C. O. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4a Ed. Viçosa, MG: Departamento de Zootecnia, UFV. 488p.

SAHIN, K.; KUCUK, O. Zinc supplementation alleviates heat stress in laying Japanese quail. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2808 – 2811, 2003

SAHOO, A.; SWAIN, R.; MISHRA, S. K. Effect of inorganic, organic and nano zinc supplemented diets on bioavailability and immunity status of broilers. **International Journal of Advanced Research**, v 2, p. 828 – 837, 2014.

SANTOS, T. S.; AUGUSTO, K. V. Z.; HAN, Y.; SARTORI, M. M. P.; DENADAI, J. C.; SANTOS, T. C.; SOBRAL, N. C.; ROÇA, R. O.; SARTORI, J. R. High levels of copper and zinc supplementation in broiler diets on growth performance, carcass traits and apparent ileal mineral absorption. **British Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 579 – 588, 2021.

SCOTTÁ, B. A.; GOMIDE, A. P. C.; CAMPOS, P. F.; BARROCA, C. C.; FORMIGONI, A. S.; FERREIRA, S. V. Utilização de fitase na alimentação de aves e suínos. **Pubvet**, v. 8, p. 1- 14, 2014.

SHAEFFER, G. L.; LLOYD, K. E.; SPEARS, J. W. Bioavailability of zinc hydroxycloeride relative to zinc sulfate in growing cattle fed a corn – cottonseed hull-based diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, p. 151 – 163, 2017.

SINGH, A. K.; GHOSH, T. K.; HALDAR, S. Effects of methionine chelate- or yeast protein-based supplement of copper, iron, manganese and zinc on broiler growth performance, their distribution in the tibia and excretion into the environment. **Biological Trace Element Research**, v. 164, p. 253-260, 2015.

SOTI, C.; CSERMELY, P. Aging and molecular chaperones. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 1037 – 1040, 2003.

SUN, W.; WANG, G.; PEI, X.; LUI, L.; XIAO, Z.; TAO, W.; PELLETIER, W. Effect of replacing inorganic with respective complexed glycinate minerals on apparent mineral bioavailability and deposition rate in tissues of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 95, p. 1813 – 1824, 2020.

SUNDER, G. S.; PANDA, A. K.; GOPINATH, N. C. S.; RAJU, M. V. L. N.; RAMA RAO, S. V.; KUMAR, C. V. Effect of supplemental manganese and mineral uptake by tissues and immune response in broiler chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 371 – 377, 2006.

SUNDER, G. S.; KUMAR, C. V. Effects of higher level of zinc supplementation on performance, mineral availability, and immune competence in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, p. 79 -86, 2008.

SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 4 ed. Editora: CABI Publishing, Oxfordshire, 2010.

SWAIN, P. S.; PRUSTY, S.; RAO, S. B. N.; RAJENDRAN, D.; PATRA, A. K. Essential Nanominerals and Other Nanomaterial in Poultry Nutrition and Production. *In*: PATRA, A. K. **Advances in Poultry Nutrition Research**. 1 ed. Editora: IntechOpen, 2020. Cap. 5, p. 61-86.

TABATABAIE, M. M.; ALIARABI, H.; SAKI, A. A.; AHMADI, A.; SIYAR, S. A. Effect of different sources and levels of zinc on egg quality and laying hen performance. **Pakistan journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 3476 – 3478, 2007.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO, V. Manganese and its role in poultry: an overview. **Journal of Experimental Biology and Agricultural**, v. 5, p. 749 – 754, 2017.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. The Mineral nutrition of livestock. 3 ed. Wallingford: CAB International, 1999

VOGT, L. K. **Avaliação da imunocompetência e alternativas para a modulação nutricional de frangos de corte**. 2005. 160f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ZHU, Y. W.; LU, L.; LI, W. X.; ZHANG, L. Y.; JI, C.; LIN, X.; LUO, X. G. Effect of dietary manganese on antioxidant status and expressions of heat shock proteins and factors in tissues of laying broiler breeders under normal and high environmental temperatures. **British Journal of Nutrition**, v. 116, p. 1851 – 1860, 2016.