



EDWIN ALBERTO CAÑAS MENDOZA

**DIETARY METHIONINE SOURCES BIOEFFICACY IN
BROILERS: EFFECT OF ACIDIFIED DIET AND REARING
SYSTEM**

LAVRAS-MG

2019

EDWIN ALBERTO CAÑAS MENDOZA

**DIETARY METHIONINE SOURCES BIOEFFICACY IN BROILERS:
EFFECT OF ACIDIFIED DIET AND REARING SYSTEM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Cañas, Edwin Alberto.

Dietary methioninesources bioefficacy in broilers: effect of
acidified diet and rearing system / Edwin Alberto Cañas. - 2019.
89 p. : il.

Orientador(a): Antonio Gilberto Bertechini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Metionina. 2. Bioeficácia. 3. Ácidos Orgânicos. I. Bertechini,
Antonio Gilberto. II. Título.

EDWIN ALBERTO CAÑAS MENDOZA

**DIETARY METHIONINE SOURCES BIOEFFICACY IN BROILERS: EFFECT OF
ACIDIFIED DIET AND REARING SYSTEM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 29 de março de 2019.

Dr. Antônio Gilberto Bertechini

DZO / UFLA

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

DZO / UFLA

Dra Suely de Fatima Acosta

DMV/UFLA

Dra Helenice Mazzuco

EMBRAPA

Dr. Alexandre De Oliveira Teixeira

UFSJ

Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

*A Deus por iluminar, guiar e me dar tranquilidade para seguir em
frente em cada um dos meus objetivos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francisco Antonio Cañas e Rosa Myriam Mendoza, pelo amor, apoio, paciência e entrega incondicional mesmo estando distantes. Seus ensinamentos e conselhos se tornaram a maior ferramenta para alcançar cada um dos meus objetivos.

Às minhas irmãs, Yaira e Yohana, que sempre me apoiaram e animaram a continuar percorrendo esse longo caminho. Além de serem minhas irmãs são minhas melhores amigas.

Às minhas sobrinhas, Laura e Lucía, pois, mesmo sem saber, suas ligações alegravam meus dias e enchiam meu coração de amor e força.

Ao Brasil, por me receber de portas abertas e brindar a oportunidade de realizar meus estudos de pós-graduação e, ainda, por ser o lugar onde vivenciei muitas experiências enriquecedoras em cada área de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do DZO/UFLA, pela oportunidade concedida para a realização dos meus estudos de pós-graduação.

Ao programa estudantes-convênio de pós-graduação da CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini, pela orientação, dedicação, paciência, conselhos e, principalmente, pela sua amizade durante todo o Doutorado. A realização deste projeto teria sido impossível sem seu apoio e guia.

Aos professores, Márvio Lobão Teixeira de Abreu, Marcio Gilberto Zangeronimo, Raymundo Vicente Souza (*in memoriam*), Alcineia de Lemos e Suely de Fatima Costa pelos ensinamentos, orientação e apoio durante meus estudos de pós-graduação.

Aos meus amigos Andressa Carvalho e Fabio Tarazona: muitíssimo obrigado! Vocês foram meus pilares e o apoio incondicional foi essencial neste projeto.

Também aos meus amigos Marcos Paulo Viveiros, Bernardo Rocha, Veronica Gabriela, Robert Costa, Luis Freitas, Ariane Nogueira, Cristian Plaza, Jorge Yair, Dayana Melo, Marcus Cardoso, muito obrigado pela amizade, apoio e paciência.

Ao pessoal que fez e faz parte do melhor núcleo de estudos (NECTA): obrigado por compartilharem comigo seus conhecimentos, pela oportunidade de desenvolver minhas habilidades e pelo apoio na condução do experimento e atividades do doutorado.

Às pessoas que fizeram parte da minha vida em Lavras.

Muito obrigado!!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioeficácia e efeitos da suplementação de diferentes fontes de metionina sobre o desempenho, *status redox*, desenvolvimento e pH do trato gastrointestinal (TGI) e concentrações plasmáticas de ácido úrico e creatina kinase em frangos mantidos em diferentes sistemas de criação (chão e gaiola). Os tratamentos foram: 1) Dieta basal (DB) sem suplementação de Metionina, 2-6) Suplementação de 0.05; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35% de DLM, 7-11) Suplementação de 0.05; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35% de DLM + AO, 12-16) suplementação de 0.05; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35% de HMTBA. No artigo 1 são apresentados os resultados correspondentes a frangos criados no chão. Considerando todo o período experimental, a bioeficácia da HMTBA e DLM + AO foram de 70% e 121%, respectivamente. A força de cisalhamento aumentou em peitos das aves que receberam as dietas deficientes de Met. Todas as aves alimentadas com qualquer fonte de Met apresentaram aumento ($P < 0.05$) nas concentrações hepáticas e intestinais de glutathiona peroxidase (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e redução ($P < 0.05$) da peroxidação lipídica quando comparados com frangos alimentados com a DB sem suplementação. Na fase inicial (1-21 dias) os frangos suplementados com DLM e DLM + AO mostraram aumentos ($P < 0.05$) na relação Vilo/Cripta quando comparados com os frangos alimentados com HMTBA. Porém, com 42 dias, as aves suplementadas com HMTBA e DLM+AO exibiram melhor desenvolvimento intestinal ao apresentarem aumento ($P < 0.05$) na relação Vilo/Cripta. O pH de moela e jejuno foram menores nos frangos que receberam HMTBA e DLM+AO. A suplementação de qualquer fonte de Met diminuiu significativamente ($P < 0.05$) os níveis plasmáticos de CK. No entanto, no dia 42 HMTBA e DLM + AO mostraram menor atividade de CK no sangue. Por outro lado, as concentrações de ácido úrico (AU) aumentaram significativamente ($P < 0.05$) no dia 42 nas aves que receberam qualquer fonte de metionina. Assim, a suplementação de Met melhora o desempenho, o *status redox* e desenvolvimento intestinal. Finalmente, o uso de ácido orgânico potencializou a bioeficácia da DLM. No artigo 2, são discutidos os resultados correspondentes a frangos criados nas gaiolas. A bioeficácia da HMTBA foi de 59% e da DLM + AO de 132%. A força de cisalhamento aumentou ($P < 0.05$) para a DB e houve tendência dos frangos alimentados com níveis deficientes de Met. A suplementação de qualquer fonte de Met estimulou a produção ($P < 0.05$) de GSH, CAT, SOD e, conseqüentemente, diminuiu ($P < 0.05$) a peroxidação lipídica. No dia 21 os frangos alimentados com DLM e DLM + AO mostraram aumentos ($P < 0.05$) na relação Vilo/Cripta quando comparados aos frangos alimentados com HMTBA. Já no dia 42 não houve diferença significativa entre as fontes de Met. O pH da moela e jejuno foram menores ($P < 0.05$) nos frangos que receberam HMTBA e DLM+AO. Não houve influência significativa ($P > 0.05$) dos tratamentos sobre os níveis de AU durante o período experimental. Aos 21 dias a suplementação de DLM e DLM + AO diminuiu ainda mais os níveis de CK ($P < 0.05$). No entanto, aos 42 dias não houve diferença significativa ($P > 0.05$) entre as fontes. Dessa forma, pode-se concluir que independente do sistema de criação, a adição do ácido orgânico acrescentou a bioeficácia da DLM e, conseqüentemente, o desempenho e os parâmetros fisiológicos das aves.

Palavras-chave: Bioeficácia. Aminoácidos Sulfurados. Ácido orgânico.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the bioefficacy and the effects of the supplementation of different sources of methionine on the performance, redox status, development and pH of the gastrointestinal tract (TGI) and plasma concentrations of uric acid and creatine kinase in Broilers maintained in different breeding systems. (floor and cage). The treatments were: 1) basal diet (DB) without methionine supplements, 2-6) 0.05 supplements; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35% DLM, 7-11) Supplementation 0.05; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35% DLM + AO, 12-16) 0.05 supplementation; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35% HMTBA. Article 1 presents the results for broilers. Considering the entire experimental period, the bioefficacy of HMTBA and DLM + AO was 70% and 121%, respectively. The shear force increased in the breasts of birds that received diets deficient in Met. All birds fed any source of Met showed an increase ($P < 0.05$) in hepatic and intestinal concentrations of glutathione peroxidase (GSH), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and a reduction ($P < 0.05$) of lipid peroxidation in comparison with chickens fed with DB without supplementation. In the initial phase (1-21 days) broilers supplemented with DLM and DLM + AO showed increases ($P < 0.05$) in the Vilo / Crypt ratio compared to chickens fed with HMTBA. However, at 42 days, birds supplemented with HMTBA and DLM + AO exhibited a better intestinal development by presenting an increase ($P < 0.05$) in the Vilo / Crypt ratio. The pH of the gizzard and jejunum was lower in broilers that received HMTBA and DLM + AO. Supplementation of any source of Met significantly decreased ($P < 0.05$) plasma CK levels. However, on day 42, HMTBA and DLM + AO showed lower CK activity in the blood. On the other hand, uric acid (AU) concentrations increased significantly ($P < 0.05$) on day 42 in birds that received any source of methionine. Therefore, Met supplementation improves performance, redox status and intestinal development. Finally, the use of organic acid improved the bioefficacy of DLM. In Article 2, the results corresponding to broilers are discussed. The bioefficacy of HMTBA was 59% and DLM + AO 132%. The shear force increased ($P < 0.05$) for BD and there was a tendency for chickens fed with deficient levels of Met. Supplementation of any source of Met stimulated the production of GSH, CAT, SOD ($P < 0.05$) and, consequently, decreased ($P < 0.05$) lipid peroxidation. On day 21, chickens fed DLM and DLM + AO showed increases ($P < 0.05$) in the Vilo / Crypt ratio compared to chickens fed HMTBA. Already on day 42 there were no significant differences between the sources of Met. The pH of the gizzard and jejunum were lower ($P < 0.05$) in broilers that received HMTBA and DLM + AO. There was no significant influence ($P > 0.05$) of treatments at UA levels during the experimental period. At 21 days, supplementation with DLM and DLM + AO further decreased CK levels ($P < 0.05$). However, at 42 days there were no significant differences ($P > 0.05$) between the sources. Therefore, it can be concluded that, regardless of the breeding system, the addition of organic acid adds the DLM bioefficacy and, consequently, the performance and physiological parameters of the birds.

Keywords: Bioefficacy, Organic acid, Total sulfur amino acids.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Elaborado por **Edwin Alberto Cañas Mendoza** e orientado por **Antônio Gilberto Bertechini**

A metionina é um aminoácido sulfurado essencial e primeiro limitante em dietas para frangos de corte à base de milho e farelo de soja. Muitos trabalhos comprovam a participação da metionina no desenvolvimento corporal, como doadora de grupos metil, substância antioxidante, formadora de aminoácidos não essenciais, na síntese proteica, entre outras. Uma das principais fontes de metionina industrial, mais utilizada nas formulações de dietas para frangos de corte, é a DL-metionina com 99% de atividade de metionina. Todavia, outros compostos (análogos de metionina) também são utilizados, tais como a metionina hidroxianáloga encontrada na forma líquida (DL-HMTBA 88%). A bioeficácia dessas fontes de metionina tem gerado discussão quando comparada a DL-Met como fonte de metionina.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de comparar os efeitos da suplementação dietética de DLM, DLM + ácido orgânico e HMTBA sobre o desempenho, bioeficácia, rendimento de carcaça, qualidade de carne, *status redox* e morfologia intestinal em frangos de corte de 1 a 42 dias. Ao comparar as fontes de metionina, houve diferenças no desempenho entre as fontes, observando-se melhores resultados nas aves suplementadas com DLM + AO seguida de DLM e HMTBA. Igualmente, todas as fontes melhoraram o *status redox* e o desenvolvimento intestinal quando comparadas com as aves que não receberam suplementação. Assim, a suplementação de ácido orgânico potencializou a bioeficácia, tornando-se uma alternativa para conseguir melhor desempenho dos frangos de corte.

Fontes de Metionina			
	DLM	DLM + AO	HMTBA
Desempenho	++	+++	+
Rendimento Carcaça	=	=	=
Qualidade de Carne	=	=	=
Morfologia Intestinal	++	+++	++
Status Redox	++	+++	++
pH TGI	++	+++	+++

Principais efeitos da suplementação de diferentes fontes de metionina na produção de frangos de corte
Tese de Doutorado em Zootecnia na UFPA, defendida em 29/03/2019

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da DL-Metionina 99% e Metionina Hidróxianóloga 88%.	15
Figura 2 – Aminoácidos sulfurados e seu papel no controle do estresse oxidativo.	20
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo da GSH.....	21
Figura 4 – Contribuição dos sistemas Cys / CySS e GSH / GSSG no <i>status redox</i> do intestino.	24

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Fontes de metionina	15
2.2 Metabolismo da metionina	16
2.3 Funções da metionina na nutrição de frangos de corte	18
2.4 Bioeficácia das fontes de metionina.....	19
2.5 Aminoácidos sulfurados e estresse oxidativo	20
2.6 Aminoácidos sulfurados e <i>status redox</i> intestinal.....	22
REFERÊNCIAS.....	25
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	32
ARTIGO 1 – DIETARY METHIONINE SOURCES AND LEVELS on Growth performance, Meat quality, gut health, redox status of broilers floor rearing	33
ARTIGO 2 – DIETARY METHIONINE SOURCES AND LEVELS on Growth performance, Meat quality, gut health, redox status of broilers CAgEs rearing ...	62

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma importante posição no *ranking* mundial na produção e na exportação de carne de frangos de corte. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018), a produção brasileira de carne de frango foi, em 2017, de 13,5 milhões de toneladas, mantendo o país na posição de maior exportador mundial e de segundo maior produtor de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos.

A grande produção de milho e soja no Brasil permitiu ao setor avícola o uso desses grãos como base fundamental na formulação da ração. No entanto, esses ingredientes apresentam na sua composição níveis de aminoácidos que não atendem às exigências nutricionais das aves, tornando-se necessária a utilização de aminoácidos industriais na suplementação, tais como a Metionina (Met).

A metionina é um aminoácido essencial e pode ser considerado o primeiro limitante nas dietas para aves, pois, além de participar do empenamento, participa de inúmeras reações biológicas, tais como: doação de grupos metil, deposição proteica, formação de moléculas de alto valor biológico e no sistema imune (VAZQUEZ-ANON *et al.*, 2006; ZHAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008).

Na suplementação de metionina em dietas de frangos de corte são utilizadas, normalmente, duas fontes: A DL-Metionina em pó (DLM), que possui um grupo amino (NH_3) e está composta por 99% de monômeros do aminoácido; e a metionina hidroxianáloga ácido livre (HMTBA), que na forma líquida contém um grupo hidroxila (OH) e está composta por 88% de monômeros, dímeros e oligômeros de HMTBA e 12% de água (VIANA *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm avaliado a bioequivalência relativa dessas fontes de Met, porém, não existe um consenso nos resultados obtidos nas pesquisas (VIANA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Alguns autores atribuem a menor eficiência da HMTBA ao processo de absorção intestinal. Segundo Esteve-Garcia e Austic (1993) e Drew *et al.* (2003), a HMTBA apresenta menor absorção quando comparada com a DLM. Por outro lado, em frangos (SWENNEN *et al.*, 2011) e em leitões (KAEWTAPEE *et al.*, 2016) os estudos mostraram como a natureza ácida da HMTBA reduziu o pH do intestino, inibindo a população de *E. Coli* e promovendo a colonização de *Lactobacillus spp*, aumentando, dessa forma, as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, o tamanho das vilosidades intestinais e a absorção de nutrientes, o que, conseqüentemente, melhorou o desempenho dos animais.

Frente ao exposto, este estudo foi conduzido com o objetivo de comparar os efeitos da suplementação dietética de DLM, DLM + AO e HMTBA sobre o desempenho (bioeficácia), o rendimento de carcaça, a qualidade de carne, o *status redox* e a morfologia intestinal em frangos de corte de 1 a 42 dias.

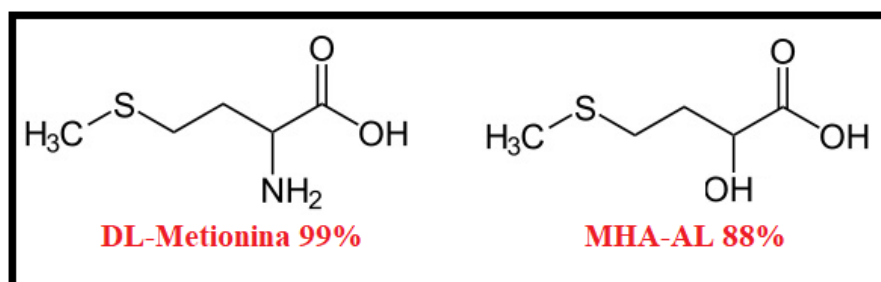
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fontes de metionina

A metionina é um aminoácido proteínogênico que serve também como fonte de enxofre na síntese de outros aminoácidos – tais como a cisteína – e de radicais metil em animais e seres humanos (WARNICK; ANDERSON, 1968). Devido a presença de enxofre em sua composição, a metionina e a cisteína são responsáveis pela formação de pontes dissulfeto que, entre outras funções, estabilizam as estruturas terciárias das proteínas. Sendo assim, os frangos de corte utilizam grandes quantidades de aminoácidos sulfurados que precisam ser suplementados na dieta destes animais (WEN *et al.*, 2017).

As duas principais fontes comerciais de metionina sintéticas usadas na alimentação de frango de corte são a DL-metionina (DLM) em pó e a metionina hidroxianáloga na forma líquida como ácido livre (MHA-AL) (LEITE *et al.*, 2009). A DLM, como todos os aminoácidos, contém um átomo de carbono central com quatro grupos que se ramificam a partir dele, quais sejam: um grupo carboxila, um grupo amina, um átomo de hidrogênio e um grupo R. Por sua vez, a MHA-AL possui uma molécula de hidroxila (OH) no lugar do grupo amina (FIGURA 1). Dessa forma, as duas fontes apresentam diferentes características físicas e metabólicas até serem absorvidas e transformadas em L-metionina (RICHARDS *et al.*, 2005).

Figura 1 – Estrutura da DL-Metionina 99% e Metionina Hidroxianáloga 88%.



Fonte: Absolute Pharmacy.

A DL-Metionina é produzida, principalmente, por síntese química de metilmercaptano, acroleína e cianeto de hidrogênio (PACK 2004). Como resultado é obtido um composto monomérico, o qual apresenta uma pureza de 99% nas formas D-dextrógiras (50%) e L-levógiras (50%) (KARAU; GRAYSON, 2014). Por outro lado, a MHA-AL é um líquido transparente âmbar com 88% de pureza, distribuída em 65% de monômeros, 18% de dímeros,

3% de trímeros, 2% de oligômeros e 12% de água. Os dímeros e oligômeros ligam-se por reações entre a hidroxila de uma molécula com a carboxila da outra, por meio de uma ligação tipo éster. No caso da MHA-AL, as ligações ésteres são reversíveis (PENZ JR., 1994).

Estima-se que nos últimos anos, a *Evonik Degussa* (Alemanha) é responsável por, aproximadamente, 60% do total da DLM produzida no mundo. Por outro lado, a *Novus International* (Estados Unidos) é a maior produtora de MHA-AL. Em 2013, o mercado mundial atingiu 600 mil toneladas/ano e a maior parte da metionina produzida foi utilizada para alimentação animal (WILLKE, 2014).

2.2 Metabolismo da metionina

Uma vez ingeridos, os aminoácidos industriais são absorvidos rapidamente no intestino, no entanto, os mecanismos de absorção das fontes são diferentes. A absorção da DLM ocorre no intestino delgado de maneira ativa por meio de diferentes sistemas dependentes de Na^+ , o que permite que os isômeros D e L sejam transportados contra gradientes de concentração. Segundo Martin-Venegas *et al.* (2008), os receptores b_0 , ^+AT , $LAT1/LAT2$, $y+LAT1/y+LAT2$, ATB_0 , $SAT1/SAT2$ possuem a capacidade de transportar a DLM para o interior dos enterócitos. Por sua vez, a absorção da MHA se dá ao longo do intestino, entretanto, em sua maioria, é absorvida na alça proximal do duodeno e no jejuno médio (RICHARDS, 2005). Diferente da DLM, a MHA-AL é absorvida, principalmente, de forma passiva por difusão simples (FIGURA 2), sendo o receptor MCT1 dependente de H^+ o seu maior transportador.

Posterior a absorção, a L-Metionina é diretamente incorporada ao metabolismo da ave e pode ser metabolizada entre 20% a 30 % durante a sua primeira passagem no intestino (FANG *et al.*, 2010). Já o isômero D da DLM e a MHA-AL precisam ser convertidos em L-metionina para serem, posteriormente, incorporados e utilizados no metabolismo intermediário (BARBI *et al.*, 2004).

Assim, no interior da célula a D-metionina sofre, inicialmente, um processo de oxidação mediado pela enzima peroxisomal D-aminoácido oxidase (D-AAOX). Nessa reação a D-metionina perde seu grupo amino, tornando-se um α -cetoácido análogo da metionina (KMB) (BRACHET & PUIGSERVER, 1992). Posteriormente, o KMB é convertido em L-metionina pela transferência de nitrogênio vindo de aminoácidos doadores e catalisada por uma transaminase. As transaminases são onipresentes em todas as células do corpo e, portanto, essa

reação não é considerada como limitante no processo de transformação, embora isso não tenha sido definitivamente demonstrado (ZHANG *et al.*, 2015).

De modo semelhante, a HMTBA também é oxidada originando o KMB. No entanto, essa reação é mediada por dois sistemas enzimáticos. A L-HMTBA é o substrato da L-2-hidroxi-ácido oxidase (L-HAOX) localizada nos peroxissomos de fígado e rins das aves (FERJANCIC-BIAGINI *et al.*, 1998). Já a D-HMTBA é oxidada pela enzima mitocondrial D-2-hidroxi-ácido desidrogenase (D-HADH). Como a D-HADH está localizada na mitocôndria, a D-HMTBA pode ser usada por qualquer órgão para a síntese de proteínas, incluindo o intestino delgado e o músculo esquelético (DUPUIS *et al.*, 1990). Subsequente a oxidação, o KMB sofre um processo de transaminação formando, assim, a L-Metionina.

O metabolismo da L-metionina encontra-se dividido em três diferentes rotas, conhecidas como metilação, remetilação e transulfuração (MARTINEZ-CUESTA *et al.*, 2013).

No processo de metilação, a metionina é convertida em S-adenosil-metionina (SAM) por meio da enzima metionina-adenosil-transferase. O SAM é o maior doador de grupos metil (CH_3), necessários na síntese de moléculas de alto valor biológico e em vários processos metabólicos, como exemplo a metilação do DNA, a qual é mediada pela enzima metil-transferase formando a S-adenosil-homocisteína (SAH) (OLIVEIRA-NETO, 2014).

A homocisteína é um aminoácido sulfurado presente no sangue e nos tecidos, mas não incorporado na proteína. Ele é sintetizado a partir da metionina, que pode ser remetilada ou pode condensar com serina para formar cistationina pelo processo de transulfuração (WATERLAND, 2006).

A remetilação é o processo por meio do qual a homocisteína transforma-se novamente em metionina. Essa reação é mediada via vitamina B₁₂ e ácido fólico, e catalisada pelas enzimas metionina-sintase e metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR) (HALSTED *et al.*, 2012)

Por último, a transulfuração é o processo que transforma a homocisteína em cisteína. Tal processo ocorre, inicialmente, por meio reação irreversível entre homocisteína e L-serina catalisada pela enzima cistationa β -sintase, que resulta na formação da cistationa (PILLAI *et al.*, 2006). Posteriormente, a cistationa β -liase transforma a cistationa em cisteína. A metionina é 100% eficiente como um precursor de cisteína (SHOVELLER *et al.*, 2005).

Cabe destacar que a cisteína faz parte da glutatona peroxidase, principal antioxidante da célula animal e precursora da taurina. A cisteína é considerada um aminoácido não essencial, cuja disponibilidade é dependente da ingestão de metionina (STIPANUK *et al.*, 2004).

2.3 Funções da metionina na nutrição de frangos de corte

A metionina é considerada o principal aminoácido na avicultura moderna. Devido ao seu rápido crescimento os frangos de corte possuem uma alta demanda de aminoácidos, sendo a metionina vital no alcance do desempenho desejável para essa espécie. Assim, o conteúdo de metionina nas dietas dos frangos deve ser adaptado às suas exigências com o intuito de manter um equilíbrio adequado de aminoácidos no corpo que estimule o crescimento, maximize o rendimento de carcaça, reduza a deposição de gordura e promova a ingestão adequada de ração (BUNCHASAK, 2009).

Dentre as várias funções da metionina, a principal delas é participar da síntese proteica. Segundo Wen *et al.*, (2017), níveis adequados metionina promovem a expressão dos fatores miogênicos tais como mTOR, fatores reguladores miogênicos (MRF4, Myf5) e fator intensificador de miócitos 2 (MEF2A e MEF2B). Além disso, a metionina é precursora de outros aminoácidos sulfurados, como a cisteína, que também é utilizada na síntese de proteína corporal, na formação da pele e das penas (BUNCHASAK *et al.*, 2009).

Após o processo de metilação, a metionina dá origem a S-adenosilmetionina – maior doador de radicais metil no organismo das aves –, sendo necessária para biossíntese de várias substâncias tais como a síntese de carnitina, de colina, de betaína, de creatina, de poliaminas, de epinefrina e de melatonina, que são componentes fundamentais para o desenvolvimento dessa espécie (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Precursora da cisteína, a metionina atua, por meio desse aminoácido, como precursora da glutathione peroxidase, principal enzima antioxidante do organismo animal e que protege as células das espécies reativas ao oxigênio (ROS) (TESSERAUD *et al.*, 2009). A metionina também é precursora da sarcosina, que está presente nas estruturas de várias proteínas (imunoglobulinas, insulina) ao ligar as cadeias polipeptídicas por meio de pontes dissulfeto (CORZO *et al.*, 2006)

A metionina é importante para o sistema imunológico, pois a ingestão desse aminoácido em quantidades adequadas favorece e auxilia a síntese de proteínas do sistema imunológico (GRIMBLE, 2006). Por meio da S-adenosilmetionina, a metionina promove a síntese de espermidina e da espermina, substâncias importantes na proliferação e diferenciação de linfócitos (FLYNN *et al.* 2002). Além disso, a metionina é um substrato para a síntese de colina e, conseqüentemente, da fosfatidilcolina e acetilcolina, os quais são essenciais para a função nervosa e para o metabolismo de leucócitos das aves (KIM *et al.* 2007).

2.4 Bioeficácia das fontes de metionina

Inúmeras pesquisas utilizando diferentes fontes e níveis de metionina na alimentação de frangos de corte foram desenvolvidas nas últimas décadas, mostrando resultados controversos. De acordo com Penz Jr. (1994), existem vários fatores que influenciam a bioeficácia das fontes de metionina, como a DLM e a MHA-AL, pois suas rotas metabólicas não ocorrem de forma semelhante e podem ser alteradas por diversos fatores, tornando-se um dos temas mais controversos na nutrição das aves, visto que a metionina, além de ser essencial, é o primeiro aminoácido limitante na dieta.

Payne *et al.*, (2006) não observaram diferenças entre os tratamentos com DLM ou HMTBA, sendo que os frangos de corte alimentados com MHA-AL apresentaram a bioeficácia de 68% na base de produto em relação aqueles alimentados com DL-metionina para ganho de peso. Um comportamento diferente das fontes foi observado no trabalho desenvolvido por Sagali *et al.*, (2010). Os autores concluíram que a MHA-AL apresentou bioeficácia relativa de 42%, quando comparada com a DLM em base ao produto em frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. Por outro lado, Visentini *et al.* (2005) evidenciaram que a suplementação de MHA-AL (88%) ou de DLM não apresentou diferenças significativas entre as formas de metionina investigadas sobre o desempenho de frangos de corte de 1 a 44 dias de idade.

Yodseranee e Bunchasak (2012) não observaram diferença significativa entre a suplementação de DLM e MHA-AL no desempenho de frangos de corte criados em condições tropicais. Já o trabalho de Willemsen *et al.*, (2011) mostrou que a suplementação de MHA-AL reduziu parcialmente os efeitos negativos no desempenho ocasionados pela exposição crônica ao calor quando comparada a DLM. Os autores concluíram que a MHA-AL é mais eficiente no alívio do estresse oxidativo causado pelo estresse por calor, o que, conseqüentemente, melhorou o desempenho dos animais.

Ao comparar o efeito de uma fonte natural e outra sintética de metionina no desempenho de frangos de corte, Halder e Roy (2007) relataram que não houve diferenças significativas ao utilizar uma fonte de metionina natural H-Met® e uma sintética DLM no mesmo nível de suplementação na dieta. Em contrapartida, Itoe *et al.* (2010) demonstraram que frangos de corte alimentados com a metionina natural eram inferiores em ganho de peso e conversão alimentar em relação as suplementadas com DLM.

Wen *et al.* (2014) relataram como as dietas suplementadas com metionina melhoraram o rendimento muscular de peito de frangos da linhagem *Arbor Acres*. De modo semelhante,

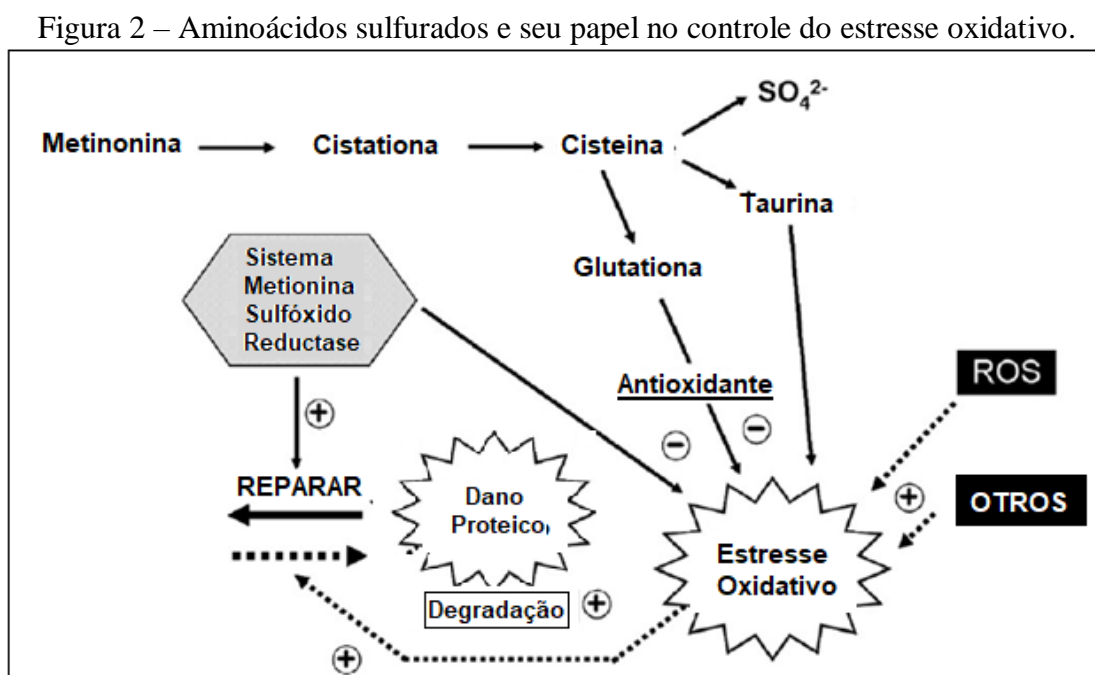
Ahmed e Abbas (2011) observaram como o desempenho de frangos suplementados com níveis de 120 e 130% foi maior em comparação com o tratamento controle (sem suplementação). Esses autores também corroboraram com os achados de Wen *et al.* (2014) de que os frangos que receberam níveis acima do que é recomendado pelo NRC, apresentaram: aumento significativo do peso absoluto, aumento relativo do peito e significativa redução da gordura abdominal.

Contudo, Ribeiro *et al.* (2005) ao compararem o efeito das duas fontes de metionina (DLM e MHA-AL) na alimentação de frangos de corte, machos, não observaram efeito das fontes de metionina no rendimento de carcaça.

2.5 Aminoácidos sulfurados e estresse oxidativo

A função de metionina não se limita ao seu papel na síntese de proteína. A S-adenosilmetionina (SAM) é o maior doador do grupo metilo e um precursor da homocisteína que, conforme dito anteriormente, pode ser transulfurada para formar a cisteína (Cis) (INGENBLEEK; KIMURA, 2013).

A Cis é um aminoácido precursor de substâncias que exercem um papel importante no sistema antioxidante do organismo, como a glutatona peroxidase (GSH) (MARI *et al.*, 2009) e a Taurina (JONG *et al.*, 2012) (FIGURA 2).

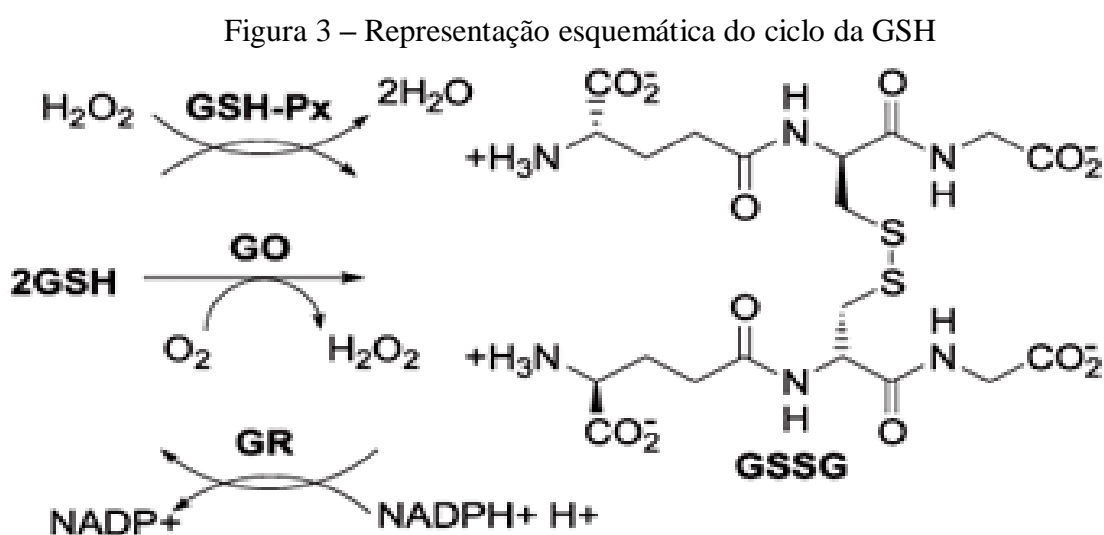


Fonte: Metayer *et al.* (2008).

Dessa forma, deficiências na suplementação de aminoácidos sulfurados (SAA) podem comprometer o sistema de defesa antioxidante dos animais. Um claro exemplo do anterior foi constatado por Shen *et al.* (2015), ao observarem como dietas em leitões com baixas concentrações de SAA reduziram as concentrações de GSH nos tecidos e aumentou a presença de proteínas carbonil (PC) e malondialdeído, compostos resultantes do estresse oxidativo. Igualmente, Zeitz *et al.* (2018) observaram como a deficiência na dieta de SAA reduziu as concentrações de antioxidantes e aumentou o estresse oxidativo em sangue de diferentes tecidos de frangos de corte Cobb.

A GSH e a Cis agem como sequestrantes diretos das espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais são formados a nível mitocondrial e podem produzir efeitos deletérios, entre eles a oxidação proteica, a lipídica e os danos no DNA, alterando a funcionalidade e o metabolismo da célula (PETROPOULOS; FRIGUET, 2005).

Segundo Obled *et al.*, (2004) a GSH catalisa a redução dos ROS, transformando-se em glutationa dissulfeto (GSSG). No entanto, a GSSG é reduzida novamente em GSH pela glutationa redutase (FIGURA 3). A relação GSH/GSSG e o nível de GSH total ao interior da célula determinam o *status redox* da célula que, por sua vez, pode regular as vias metabólicas devido a ativação o ou a inibição de enzimas pertencentes a outros processos celulares, como a transcrição genômica, por exemplo. (CAO *et al.*, 2005).



Fonte: Huber *et al.* (2008).

Além disso, os resíduos de metionina podem atuar como antioxidantes catalíticos por meio do sistema Metionina Sulfóxido Redutase (MSR). Segundo Stadtman *et al.* (2005), os resíduos de metionina são propensos a oxidação por ROS e convertidos em Metionina

Sulfóxido (MetO) com a formação de dois estéreo-isômeros referidos como MetO-S e MetO-R. As formas S e R da MetO podem ser reduzidas de volta à metionina pela metionina sulfóxido redutase. Dessa forma, cada ciclo de oxidação e redução de metionina destruirá um equivalente de ROS, tornando-se um importante sistema de eliminação natural para ROS.

Entretanto, as diferentes fontes de metionina que são suplementadas nas dietas podem influenciar o *status redox* dos animais. Devido à sua composição, as fontes de metionina comumente comercializadas são a DLM e a HMTBA, sendo que ambas diferem uma da outra em termos de absorção (DREW *et al.*, 2003) e na sua capacidade de metabolização até serem transformadas em L-Met (MARTIN-VENEGAS *et al.*, 2006).

Baseados em estudos *in vitro*, Martin-Venegas *et al.* (2006, 2013) concluíram que o processo de transulfuração é influenciado pela fonte de metionina ao observarem como a HMTBA apresentou um maior estímulo do sistema antioxidante quando comparado com a DLM. Da mesma forma, Willemsen *et al.* (2011) observaram menores níveis de TBARS em frangos de suplementados com HMTBA quando comparados com frangos suplementados com DLM com quatro semanas de idade. Entretanto, no estudo realizado por Zeitz *et al.*, (2018) ao comparar duas fontes de metionina (DLM e HMTBA), os autores não encontraram diferenças significativas no *status redox* de tecidos e plasma de frangos de corte machos. Além disso, os autores não observaram indícios de que os maiores níveis de suplementação das diferentes fontes modificaram o efeito das mesmas. Da mesma forma, Swennen *et al.*, (2011) não observaram diferença significativa nos níveis de GSH de frangos de corte alimentados com duas diferentes fontes de metionina.

2.6 Aminoácidos sulfurados e *status redox* intestinal

O epitélio do trato gastrointestinal (TGI) é extensamente dobrado e conformado por *criptas* (de *Lieberkühn*) e vilosidades, as quais são renovadas a cada 4-5 dias tornando-se um dos tecidos mais proliferativos do organismo (LIPKIN, 1973).

O epitélio do intestino delgado está revestido pelos enterócitos – representando 80% do TGI – e sua principal função é absorção dos nutrientes, dos eletrólitos e da água. Por sua vez, as células caliciformes secretoras compreendem 16% do epitélio do intestino e sua função é a secreção de muco formando um ambiente adequado para o desenvolvimento da microbiota intestinal. Por outra parte, as células secretoras de *Paneth* desempenham funções essenciais na secreção de hormônios gastrintestinais, na defesa do hospedeiro e na secreção de bicarbonato

(OUELLETTE, 2011). Por último, o trato gastrointestinal apresenta um tecido linfoide associado a mucosas (GALT) (GIBBONS, 2011), organizado por meio das placas de *Peyer* espalhadas ao longo do intestino.

Semelhante a outros tecidos corporais, a glutatona (GSH), a cisteína (Cis) e a tioredoxina (Trx) são os principais sistemas *redox* das células do intestino (JONES, 2006). Dessa forma, o *status redox* intestinal pode ser descrito pela presença das formas reduzida e oxidada dos sistemas, ou seja, a relação entre GSH / GSSG, Cys / CySS e Trx / TrxSS. Sendo assim, a soma do potencial redutor dos diferentes sistemas constitui o ambiente *redox* intracelular (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

O principal sistema redutor das células do intestino é a GSH, o qual está presente em concentrações milimolares (AW, 1994) e apresenta níveis semelhantes a outros tipos de células (2-10 mM) (MEISTER, 1983). A GSH intracelular encontra-se na forma reduzida biologicamente ativa e sua oxidação à GSSG é, frequentemente, associada ao estresse oxidativo. As concentrações de GSH na mucosa intestinal são mantidas por meio da síntese de novo (AW, 1991), regeneração da GSSG (SHAN *et al.*, 1990) e captação de GSH (HAGEN; JONES, 1987). A captação de GSH pela mucosa através da membrana apical ocorre independentemente da síntese de GSH intracelular (AW, 1991).

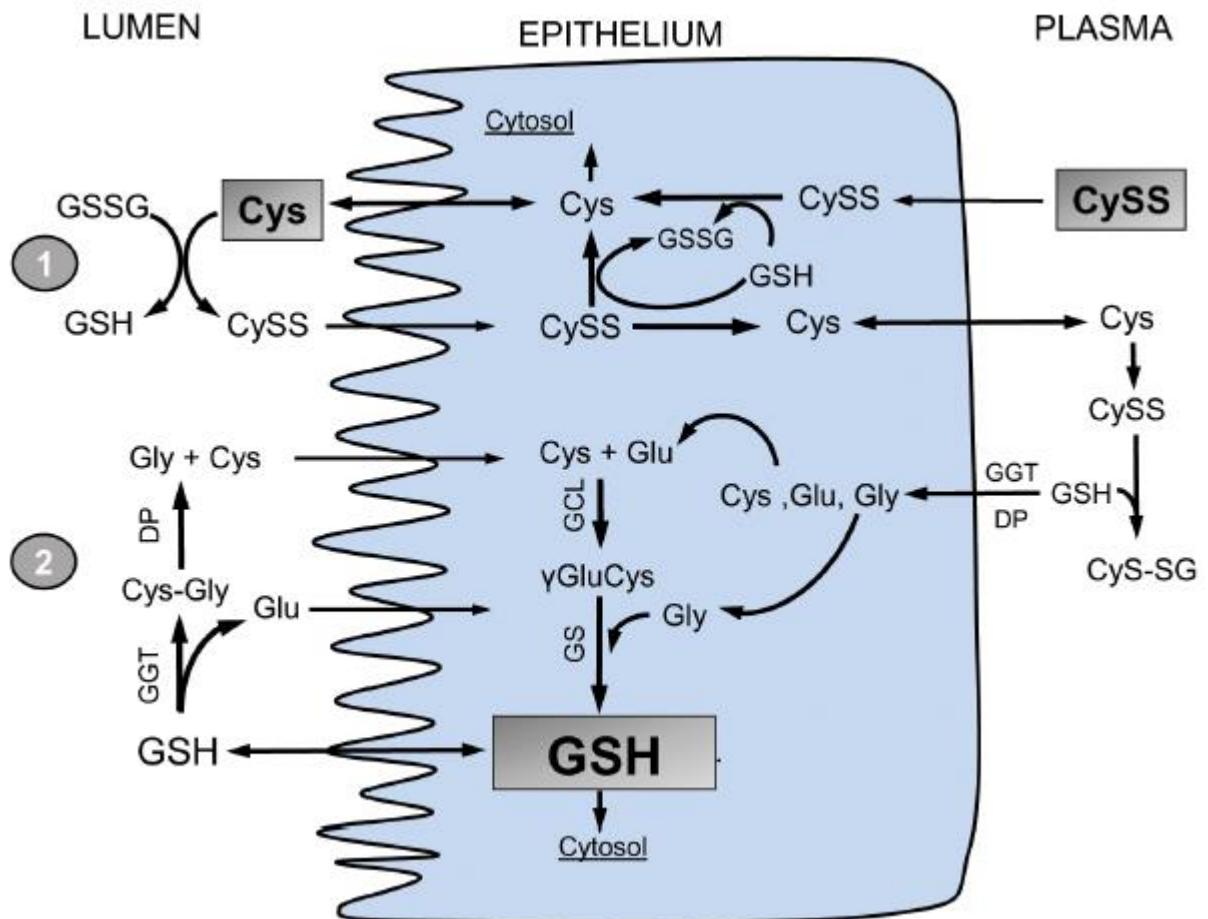
A defesa antioxidante intracelular do intestino é mediada por enzimas dependentes da GSH, localizadas no citosol, nas mitocôndrias e no núcleo e conhecidas como glutarredoxinas (Grx). As Grx são pequenas enzimas redutoras compostas por cerca de cem resíduos aminoácidos, são oxidadas por substratos e reduzidas novamente de forma não enzimática pela GSH (HOLMGREN; FERNANDES, 2004).

Por outro lado, a GSH apresenta uma isoforma extracelular encarregada da citoproteção da mucosa contra oxidantes luminiais conhecida como a glutatona S-transferase (GST) (THAM *et al.*, 1998). A GST catalisa a desintoxicação dependente de GSH de radicais, carcinogêneos e micotoxinas luminiais. Igualmente, mantém a fluidez do muco e promove a captação de peróxido lipídico reduzindo, conseqüentemente, o transporte de peróxido linfático (AW, 2005).

Por sua vez, o *status redox* do lúmen intestinal também é modificado pela relação Cys / CySS (DAHM; JONES, 2000). As concentrações extracelulares de Cys e CySS são moduladas por reações de troca de Cys / CySS (LASH; JONES, 1984) dietéticas e pela hidrólise de GSH (DICKINSON; FORMAN 2002). O sistema Cys/CySS contribui majoritariamente para a manutenção do estado *redox* das proteínas extracelulares e do lúmen intestinal (GILBERT, 1990), o qual é regulado a partir do sistema de transporte Cys /CySS envolvendo exportação de

Cys luminal, redução de GSSG e formação de CySS, seguido por captação de CySS, redução de CySS mediada por GSH intracelular e Cys de re-liberação no lúmen (FIGURA 4).

Figura 4 – Contribuição dos sistemas Cys / CySS e GSH / GSSG no *status redox* do intestino.



Fonte: Adaptado de Circu & AW (2012).

Um *status redox* homeostático permite uma adequada proliferação, migração e diferenciação do epitélio gastrointestinal por meio da modulação das vias de sinalização Wnt / β-catenina e Notch, principalmente, pelas NADPH oxidases (NOXs) (PEREZ *et al.*, 2017).

Dessa forma, uma inflamação intestinal derivada do aumento na produção de ROS ou causada pela diminuição na síntese de GSH inibe o potencial proliferativo das células epiteliais do intestino, alterando os processos de desenvolvimento e de absorção de nutrientes, prejudicando o desempenho das aves.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2018**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

AHMED, M. E.; ABBAS, T. E. Effects of dietary levels of methionine on broiler performance and carcass characteristics **International of Journal Poultry Science**. v. 10, n. 2, p. 147-151, Apr., 2011.

AW, T. Y, WIERZBICKA, G, JONES, D. P., Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. **Chemico-Biological Interactions**. v. 80, n. 1, p. 89-97. 1991.

AW, T. Y. Biliary glutathione promotes the mucosal metabolism of luminal peroxidized lipids by rat small intestine in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 94, n. 3, p. 1218-1225, Sept., 1994.

AW, T. Y. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 204, n. 3, p. 320-328. Maio 2005.

BARBI, J. H. T.; DIBNER, J.; PEAK, S. Mais que uma fonte de metionina. **Revista Aeworld**, v.11, p. 38-43, Sept., 2004.

BRACHET, P.; PUIGSERVER A. Regional differences for the D-amino acid oxidase-catalysed oxidation of D-methionine in chicken small intestine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 101 n. 4, p. 509-511, Apr., 1992.

BUNCHASAK, C. Role of dietary methionine in poultry production. **The Journal of Poultry Science**, v. 46, n. 3, p. 169–179, June, 2009.

CAO, X.; KAMBE, F.; LU, X.; KOBAYASHI, N.; OHMORI, S.; SEO, H. Glutathionylation of two cysteine residues in paired domain regulates DNA binding activity of Pax-8. **Journal Biological Chemistry**. v. 280, n. 27, p. 25901-25906, July, 2005.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 23, n. 7, p. 729-737, Sept., 2012.

CORZO, A.; KIDD, M.; DOZIER, W.; SHACK, L.; BURGESS, S. Protein expression of pectoralis major muscle in chickens in response to dietary methionine status. **The British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 4, p.703-708, Apr., 2006.

DAHM, L. J.; JONES, D. P. Rat jejunum controls luminal thiol-disulfide redox. **The Journal of Nutrition**. v. 130, n. 11, p. 2739-2745, Nov., 2000.

DIBNER, J. J.; ATWELL, C. A.; IVEY, F. J. Effect of heat stress on 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid and DL-methionine absorption measured in vitro **Poultry Science**, Oxford, v. 71, n. 11, p. 1900-1910, Nov., 1992.

DICKINSON, D. A, FORMAN, H. J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Annals of New York Academy Sciences*. v. 973, p. 488–504. Novembre 2002.

DREW, M. D.; VAN KESSEL, A. G.; MAENZ, D. D. Absorption of methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in conventional and germ-free chickens. **Poultry Science**, Oxford, v. 82, n. 7, p. 1149-1153, July, 2003.

DUPUIS, L.; BRACHET, P.; PUIGSERVER, A. Oxidation of the supplemental methionine source L-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid by pure L-2-hydroxy acid oxidase from chicken liver. **The Journal Nutrition** Oxford, v. 120, n. 10, p. 1171-1178, Oct., 1990.

ESTEVE-GARCIA, E.; AUSTIC, R. E. Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 4, n. 10, p. 576-587, Oct., 1993.

FANG, Z.; HUANG, F.; LUO, J.; WEI, H.; MA, L.; JIANG, S.; PENG, J. Effects of dl-2-hydroxy-4-methylthiobutyrate on the first-pass intestinal metabolism of dietary methionine and its extra-intestinal availability. **British Journal Nutrition**, Cambridge, v. 103, n. 5, p. 643-651, Mar., 2010.

FERJANCIC-BIAGINI, A.; DUPUIS, L.; DE CARO, J.; PUIGSERVER, A. Inhibitory effects of anions and active site amino acid sequence of chicken liver L-2-hydroxyacid oxidase A, a member of the FMN-dependent alpha-hydroxyacid oxidizing enzyme family. **Biochimie** v. 80, n. 12, p. 1047-1054, Dec., 1998.

FLYNN, N. E.; MEININGER, C. J.; HAYNES T. E., WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 9, p. 427-438, Nov., 2002.

GIBBONS D. L, SPENCER J. Mouse and human intestinal immunity: same ballpark, different players different rules, same score. **Mucosal Immunology**. v. 4, n. 2, p. 148-157, Mar., 2011.

GILBERT, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances In Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. v. 63 p. 169-172. 1990.

GRIMBLE, R. F. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1660S–1665S, June, 2006.

HAGEN, T. M, JONES, D. P. Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat. **The American Journal Physiology**. v. 252, n. 5, p. 607-613, May, 1987.

HALDER, G; ROY, B. Effect of herbal or synthetic methionine on performance cost benefit ratio, meat and feather quality of broiler chicken. **International. Journal. Agricultural Research**. v. 2, n. 12, p. 987-996, Sept., 2007.

HALSTED, C. H.; MEDICI, V. Aberrant hepatic methionine metabolism and gene methylation in the pathogenesis and treatment of alcoholic steatohepatitis. **International Journal of Hepatology**, v. 2012, p. 1-7, Sept., 2012.

HOLMGREN, A.; FERNANDES, A. P. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 6, n. 1, p. 63-74, Feb., 2004.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

INGENBLEEK, Y.; KIMURA, H. Nutritional essentiality of sulfur in health and disease. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 7, p. 413-432, July, 2013.

ITOE, S.; DAFWANG, I. I.; BAWA, G. S. Evaluation of Methiorea as a Substitute for Methionine in Broiler Diets. **International of Journal Poultry Science**. v. 9, n. 8, p. 809-812, June, 2010.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signal**. v. 8, n. 10 p. 1865-1879, Sept., 2006.

JONG, C. J.; AZUMA, J.; SCHAFFER, S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. **Amino Acids**. v. 42, n. 6, p. 2223-2232, June, 2012.

KAEWTAPEE, C.; KRUTTHAI, N.; BUNCHASAK, C. Effects of supplemental liquid DL-methionine hydroxy analog free acid in diet on growth performance and gastrointestinal functions of piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**. Seoul, v. 29, n. 8, p. 1166-1172, Aug., 2016.

KARAU, A.; GRAYSON, I. Amino acids in human and animal nutrition. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. Berlin, v. 143, n. 4, p. 189-228, Mar., 2014.

KIM, S. W.; MATEO, R. D.; YIN, Y. L.; WU, G. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 2, p. 295-306, Nov., 2007.

LASH, L. H.; JONES, D. P. Characteristics of cysteine uptake in intestinal basolateral membrane vesicles. **The American Journal of Physiology**. v. 247 n. 4, p. G394-401, Oct., 1984.

LEITE, R. S.; ROCHA, J. S. R.; MICHEL, B. C.; LARA, L. J. C.; ORNELAS, E. A.; CANÇADO, S. V.; BAIÃO, N. C. Efeitos de planos nutricionais e de fontes de metionina sobre o desempenho, rendimento e composição de carcaças de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1120-1127, out., 2009.

LIPKIN, M. Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells. **Physiological Reviews**. v. 53, n. 4, p. 891-915, Oct., 1973.

MARI, M.; MORALES, A.; COLELL, A.; GARCIA-RUIZ, C.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 11, p. 11, p. 2685-2700, Nov., 2009.

- MARTINEZ-CUESTA, M. del C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. Methionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulfur compounds in cheese. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 366-385, Oct., 2011.
- MARTIN-VENEGAS, R.; GERAERT, P. A.; FERRER, R. Partial Na⁺ dependence of DL-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid uptake in the chicken small intestine. **Poultry Science**, Oxford, v. 87, n. 7, p. 1392-1394, July, 2008.
- MARTIN-VENEGAS, R.; BRUFAU, M. T.; GUERRERO-ZAMORA, A. M.; MERCIER, Y.; GERAERT, P. A.; FERRER, R. The methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid protects intestinal epithelial barrier function. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1702-1709, Dec., 2013.
- MARTIN-VENEGAS, R.; GERAERT, P. A.; FERRER, R. Conversion of the methionine hydroxy analogue DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. **Poultry Science**, Oxford, v. 85, n. 11, p. 1932-1938, Nov., 2006.
- MASTROTOTARO, L.; SPONDER, G.; SAREMI, B.; ASCHENBACH, J. R. Gastrointestinal methionine shuttle: Priority handling of precious goods. **IUBMB Life**, v. 68, n. 12, p. 924-934, Oct., 2016.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**. v. 52, n. 7, p. 711-760, 1983.
- OBLED, C.; PAPET, I.; BREUILLE, D. Sulfur-containing amino acids and glutathione in diseases. *In*: Cynober LA, editor. **Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, 2004. 667-87p.
- OLIVEIRA NETO, A. R. Nutrição de não ruminantes. *In*: Oliveira Neto A. R. **Metabolismo e exigência de metionina**. Jaboticabal/Brasil: Funep, 2014. 218-239p.
- OUELLETTE, A. J. Paneth cell alpha-defensins in enteric innate immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 68, n. 13, p. 2215-2229, July, 2011.
- PAYNE, R. L.; LEMME, A.; SEKO, H. Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. **Animal Science Journal**. v. 14, n. 1 p. 427-439, Aug., 2006.
- PENZ Jr., A. M. Metionina e hidróxi análogos (MHA) em nutrição de aves. *In*: Conferência **Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas, **Anais[...]** Campinas: FACTA, p. 85-94. 1994.
- PEREZ, S.; TALENS-VISCONTI, R.; RIUS-PEREZ, S.; FINAMOR, I.; SASTRE, J. Redox signaling in the gastrointestinal tract. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 104, n. 6, p. 75-103, Mar., 2017.

PETROPOULOS, I.; FRIGUET, B. Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1703, n. 2, p. 261-266, Jan., 2005.

PILLAI, P. B.; FANATICO, A. C.; BEERS, K. W.; BLAIR, M. E.; EMMERT, J. L. Homocysteine remethylation in young broilers fed varying levels of methionine, choline and betaine. **Poultry Science**, Oxford, v. 85 n. 1 p. 90-95, Jan., 2006.

RIBEIRO, A. M. L.; DAHLKE, F.; KESSLER, A. M. Methionine sources do not affect performance and carcass yield of broiler fed vegetable diets and submitted to cyclic heat stress. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.7, n. 3, p. 159-164, jul./set., 2005.

RICHARDS, J. D.; ATWELL, C. A.; VAQUEZ-ANON, M.; DIBNER J. J. Comparative in vitro and in vivo absorption of 2- hydroxy-4methylthio butanoic acid and methionine in the broiler chicken. **Poultry Science**, Oxford, v. 84, n. 9, p. 1397-1405, Sept., 2005.

SANGALI, C. P.; BRUNO, L. D. G.; NUNES, R. V.; OLIVEIRA NETO, A. R. de; POZZA, P. C.; HENZ, J. R.; GIACOBBO, F. C. N.; BERWANGER, E. Bioavailability of different methionine sources for broilers from 1 to 21 days old. **Ciencia e Investigación Agraria**. v. 42, n. 1, p. 35-43, Jan., 2015.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 30, n. 11, p. 1191-212, June, 2001.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 47, n. 1, p. 61-71. 1990.

SHEN, Y. B.; FERKET, P.; PARK, I.; MALHEIROS, R. D.; KIM, S. W. Effects of feed grade L--methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional DL--methionine. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 6, p. 2977-2986, June, 2015.

SHOVELLER, A. K.; STOLL, B.; BALL, R. O.; BURRIN, D. G. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. **The Journal Nutrition**, v. 135 n. 7, p. 1609-1612, July, 2005.

STADTMAN, E. R.; VAN REMMEN, H.; RICHARDSON, A.; WEHR, N. B.; LEVINE, R. L. Methionine oxidation and aging. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1703, n. 2, p. 135-140, Jan., 2005.

STIPANUK, M. H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. **Annual Review Of Nutrition**, v. 24, p. 539-577, July, 2004.

SWENNEN, Q.; GERAERT, P. A.; MERCIER, Y.; EVERAERT, N.; STINCKENS, A.; WILLEMSSEN, H.; LI, Y.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Effects of dietary protein content and 2--hydroxy--4--methylthiobutanoic acid or DL--methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 12, p. 1845-1854, Dec., 2011.

SWENNEN, Q.; GERAERT, P.A.; MERCIER, Y.; EVERAERT, N.; STINCKENS, A.; WILLEMSEN, H.; LI, Y.; DECUYPERE, E. and BUYSE, J. Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 106, n. 12, p. 1845-1854, Dec., 2011.

TESSERAUD, S.; COUSTARD, S. M.; COLLIN, A.; SEILIEZ, I. Role of sulfur amino acids in controlling nutrients metabolism and cell functions: implications of nutrition. **The British Journal of Nutrition**. v. 101, n. 8, p. 1132-1139, Apr., 2009.

THAM, D. M.; WHITIN, J. C.; KIM, K. K.; ZHU, S. X.; COHEN, H. J. Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. **The American Journal Physiology**, v. 275, n. 6, p. G1463-1471, Dec., 1998.

VAZQUEZ-ANON, M.; GONZALEZ-ESQUERRA, R.; SALEH, E. Evidence for 2- hydroxy-4 (methylthio) butanoic acid and DL-methionine having different dose responses in growing broilers. **Poultry Science**, Oxford, v. 85, n. 8, p.1409-1420, Aug., 2006.

VIANA, M. T. S.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; BARRETO, S. L. T.; CARVALHO, D. C. O.; GOMES, P. C. Fontes E Níveis De Metionina Em Dietas Para Frangos De Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 9, p. 1751-1756, out., 2009.

VISENTINI, P.; LOPES, J.; TOLEDO, G. S.; COSTA, P. T.; Níveis de substituição da DL-metionina pela metionina hidróxi análoga em base equimolar, em dietas para frangos de corte. **Ciencia. Rural**, v. 35, n. 6, p. 1400-1405, nov., 2005.

WARNICK, R. E.; ANDERSON, J. O. Limiting essential amino acids in soybean meal for growing chickens and the effects of heat upon availability of the essential amino acids. **Poultry Science**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 281-287, Feb., 1968.

WATERLAND, R. A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **The Journal of Nutrition**, Oxford v. 136, n. 6, p. 1706S-1710S, June, 2006.

WEN, C.; CHEN, X.; CHEN, G. Y.; WU, P.; CHEN, Y. P.; ZHOU, Y. M.; WANG, T. Methionine improves breast muscle growth and alters myogenic gene expression in broilers. **Journal Animal Science**. v. 92, n. 3, p. 1068-1073, Mar., 2014.

WEN, C.; JIANG, X. Y.; DING, L. R; WANG, T; ZHOU, Y. M. Effects of dietary methionine on breast muscle growth, myogenic gene expression and IGF-I signaling in fast- and slow-growing broilers. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1924, p. 1-7, May, 2017.

WEN, C.; JIANG, X. Y.; DING, L. R; WANG, T; ZHOU, Y. M. Effects of dietary methionine on growth performance, meat quality and oxidative status of breast muscle in fast- and slow-growing broilers. **Poultry Science**, Oxford, v. 96, n. 6, p. 1707-1714, June, 2017.

WILLEMSSEN, H.; SWENNEN, Q.; EVERAERT, N.; GERAERT, P. A.; MERCIER, Y.; STINCKENS, A.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL--2--hydroxy--4-- methylthio butanoic acid on growth

performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**, Oxford, v. 90, n. 10, p. 2311-2320, Oct., 2011.

WILLEMSSEN, H.; SWENNEN, Q.; EVERAERT, N.; GERAERT, P.A.; MERCIER, Y.; STINCKENS, A.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**, Oxford, v. 90, n. 10, p. 2311-2320, Oct., 2011.

WILLKE, T. Methionine production a critical review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 98, n. 24 p. 9893-9914, Dec., 2014.

YANG, G. L.; ZHANG, K. Y.; DING, X. M.; ZHENG, P.; LUO, Y. H.; BAI, S. P.; WANG, XUAN, J. P.; SU, Y. Z. W.; ZENG, Q. F. Effects of dietary DL-2-hydroxy-4(methylthio)butanoic acid supplementation on growth performance, indices of ascites syndrome, and antioxidant capacity of broilers reared at low ambient temperature. **International Journal Biometeorology**. v. 60, n. 8, p. 1193-1203, Aug., 2016.

YODSERANEE, R.; BUNCHASAK, C. Effects of dietary methionine source on productive performance, blood chemical, and haematological profiles in broiler chickens under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 8, p. 1957-1963, Dec., 2012.

ZEITZ, J. O.; MOHRMANN, S.; FEHS, L.; MOST, E.; HELMBRECHT, A.; SAREMI, B.; EDER, K. Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 102, n. 4, p. 999-1011, Apr., 2018.

ZHAN, X. A.; LI, J. X.; XU, Z. R. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. **British Poultry Science**, London, v. 47, n. 5, p. 576-580, May, 2006.

ZHANG, L. B.; GUO, Y. M. Effects of liquid DL-2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid on growth performance and immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, Oxford, v. 87, n. 7, p. 1370-1376, July, 2008

ZHANG, S.; SAREMI, B.; GILBERT, E. R.; WONG, E. A. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. **Poultry Science**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 425-439, Feb., 2017.

ZHANG, S.; WONG, E. A.; GILBERT, E. R. Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals, **Frontiers in Bioscience**. v. 1, n. 7, p. 478-490, June, 2015.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 – DIETARY METHIONINE SOURCES AND LEVELS ON GROWTH
PERFORMANCE, MEAT QUALITY, GUT HEALTH, REDOX STATUS OF
BROILERS FLOOR REARING**

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA
CIENTÍFICA POULTRY SCIENCE (PS).**

https://academic.oup.com/ps/pages/General_Instructions

Canas-Mendoza E. A. *et al.*

Methionine levels and sources for broilers

**METHIONINE SOURCES ON GROWTH PERFORMANCE, MEAT QUALITY, GUT
HEALTH, REDOX STATUS OF BROILERS FLOOR REARING**

Edwin A. Cañas. M[†], Andressa C. Carvalho[†], Fabio Tarazona[†], Suely Costa[‡], Victor Naranjo^{† †}, Antônio G. Bertechini[†]

[†]Animal Science Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-000, Brazil

[‡]Medicine Veterinary Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-000, Brazil

^{††} Evonik Company

¹This work was supported by Evonik Company

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors thank the Foundation for Supporting Research of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their contributions and support.

²Corresponding author: bertechini@ufla.br and edwincanasm@gmail.com

ABSTRACT

This study was conducted to test the effects of supplemental DLM + AO and HTMBA on redox status, gut development, growth performance and meat quality of broiler chickens compared with DL-Met. A total of 1632 male 1-d-old Coob 500 chickens were weighed and randomly allotted to 16 treatments for 42 d, including a basal diet (BD) without industrial methionine supplementation or a basal diet that was supplemented with five DLM or DLM + AO or HTMBA levels (0.05; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35 %). Performance, redox status (liver-gut), plasma Uric Acid (PUA) and Creatine Kinase (CK), intestine pH and morphology were measured. Bioefficacy of HMTBA was 70% and use of organic acid favored DLM increasing its bioefficacy (121%). Shear force had increased in chicks fed a diet BD and methionine deficient. Chicks fed a diet supplemented with any Met source had increased ($P < 0.05$) GSH, CAT, SOD activity and reduced ($P < 0.05$) lipid peroxidation compared with chicks fed the BD. On 21d DLM and DLM + AO had greater ($P < 0.05$) villus height:crypt depth ratio compared with chicks fed HMTBA. However at 42 d, chicks fed a diet supplemented with HMTBA and DLM + AO had greater ($P < 0.05$) villus height:crypt depth. On the other hand, HMTBA and DLM + AO supplementation decreased ($P < 0.05$) pH in gizzard and jejunum. At 21 and 42 d CK plasma activity declined ($P < 0.05$) in chicks fed any methionine source. Nevertheless, on 42 d HMTBA and DLM + AO CK activity was lower compared with DLM source. PUA on 42 d was increased in chicks with all methionine sources. Considering together all of the studied parameters, the relative bioavailability of HTMBA and DLM + AO was 70% and 121% respectively compared to the DLM. Supplementation of Met served a better performance, redox status and development of the gut of chicks compared with BD diet. Finally, the use of organic acid favored DLM, increasing its bioefficacy.

Key Words: Bioefficacy, Sulfur Amino Acid, Organic Acid

INTRODUCTION

Methionine (**Met**) is a sulphur-containing essential amino acid performs a wide variety of biological functions (Oz *et al.*, 2008) including growth promotion (Mirzaaghatabar *et al.*, 2011), synthesis of proteins and methylation of DNA (Jankowski *et al.*, 2014), helps protect cells against oxidative stress by means of glutathione synthesis (Luo and Levine, 2009; Del Vesco *et al.*, 2013), improve development breast muscle and meat quality (Albrecht *et al.* 2017), In addition, Met is an intermediate in the biosynthesis of other important molecules such as cysteine, carnitine, and taurine and is converted to S-adenosylmethionine (SAM), which serves as a methyl donor.

DL-Methionine (DLM) and DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMTBA) are widely used for dietary supplementation on a commercial scale to satisfy the total sulfur amino acid (TSAA) requirement of poultry. However, the bioefficacy of both source has been the subject of numerous in vitro and in vivo studies and remains controversial today. The meta-analysis showed that biological efficiencies of HMTBA were 81 % and 79 % of the values for DLM, on an equimolar basis, for ADG and feed utilization efficiency, respectively (Sauer *et al.* 2008). Bunchasak (2009) concluded that the bioefficacy of HMTBA would be 88 % of DLM (equimolar basis).

On the other hand, it's known that acid organic ameliorate the conditions of the gastrointestinal tract (GIT) through the reduction of GIT pH, promoting proteolytic enzyme activity and nutrient digestibility, intensifying pancreatic secretions, encouraging digestive enzyme activity, creating stability of the microbial population and stimulating the growth of beneficial bacteria (Papatisiros *et al.* 2013). Therefore, the dual effect (Met source and organic acid) of HMTBA

could promote growth performance and good conditions of the gastrointestinal tract (Kaewtapee et al. 2016).

In previous studies the bioefficacy of HMTBA in comparison to DL-methionine. has been extensively documented (Sauer et al. 2008; Sangali et al., 2014). However, the pH diet and its effect on the bioefficacy of methionine and consequently on the performance of the chicken remain poorly documented. Thus, the aims of the present study were to determine the effective replacement of sources 99% DL-Methionine + organic acid and 88% liquid 2-hydroxy-4-methylthio-butanoic acid (HMTBA) compared to 99% DL-methionine in male broilers receiving isoprotonic diets based on corn and soybean meal.

MATERIALS AND METHODS

Bird Husbandry, Diets, and Experimental Design

All procedures were approved by Lavras Federal University Animal Care and Use Committee. A total of 1,632 one-day male Cobb 500 were obtained from a commercial hatchery where they vaccinated against Marek's disease and raised from 1 to 42d of age. The broilers were divided into 16 treatments with 6 replicate pens 2 x 1.1 (each containing 17 birds) per pens. Diets were formulated according to the Rostagno et al. (2017) for all nutrients except for methionine + cysteine to 1-21 (Table 1) and to 22-42 days (Table 2). Three methionine sources (99% DL-methionine, 99% DL-methionine + organic acid and 88% HMTBA) in the five levels of supplementation and one treatment without methionine supplementation (Table 3). The corn/soybean meal base experimental diets to both experiments were isonutrient, only varying digestible methionine + cysteine levels and methionine sources. The pH of the diets was determined using 10 g of feed in 90 ml of distilled water using NaOH in the titration. The diets

pH (treatments 7-11) were equalized to treatments 12-16, by dietary lactic acid (2-hydroxypropionic acid) level. The lactic acid has the same pKa as HMTBA (3.86).

All pens contained feeder and a nipple waterer to allow for ad libitum access to feed and water in a temperature controlled room with a 23L:1D lighting program, the temperature of the room was maintained at 32°C for the first 3 d and then reduced by 2 to 3°C per wk to a final temperature of 20°C. Feed intake was recorded at 14, 21, 35 and 42 d of age by replicate pen. At 14, 21, 35 and 42 of age, birds were weighed to calculate average daily gain (**ADG**), and feed conversion ratio (**FCR**). Mortality was also recorded.

Sample Collection

At 21 and 42 d of age, 6 broilers from each treatment (1 broiler per replicate) was randomly selected, weighed and collected from the ulnar vein using syringes and then kept on ice in blood vials with EDTA as anticoagulant for uric acid (UA) and creatin kinase (CK) measurement. Posteriorly, birds were euthanized by cervical dislocation. After blood and feather were removed, then head, feet, abdominal fat, and all of the viscera were further removed to determine carcass yield and fat abdominal weight. The whole breast muscle (pectoralis major and pectoralis minor) was weighed to calculate the yield and were immediately stored at 4°C for meat quality analysis. Gizzard, intestine and liver were collected. Gizzard and intestine digesta were gently squeezed out for analysis de pH. An intestinal segment of approximately 4-cm-long of jejunum and liver thoroughly cleaned with 0.85% NaCl solution and stored at –80 °C prior to the measurements. For intestinal morphology a segment of jejunum was taken and immediately fixed in 10% neutral buffer formalin.

Plasma Analysis

Plasma concentrations of uric acid was determined spectrophotometrically using a trinder reaction. Activity of creatine phosphokinase (CK) was analyzed using method the IFCC.

Meat Quality

The pH in breast muscle was measured 12 h after slaughter at 2.5 cm below the surface, using a portable surface pH-meter (pH 8011, Peter Bock Umwelttechnik, Gersfeld, Germany). Three measurements were performed for each meat sample by placing the electrode onto the meat and an average pH-value was calculated.

Meat color was determined using a Miniscan spectrophotometer (Hunterlab, Reston, VA) reporting in CIELAB system values of lightness (**L***), redness (**a***), yellowness (**b***). Color was measured 12 h after slaughter at three points.

Cooked samples of breast muscle was cut into three strips (1 cm×1 cm×3 cm) parallel to the muscle fiber to measure the shear force. Each strip was measured in duplicate using a Digital Meat Tenderness Meter (Model C1LM3) and the six values of each sample were averaged.

Redox Status

Samples of intestine and liver of treatments 1,5,10 e 15 were analyzed. Total protein (TP) quantity in the supernatant of the intestinal and hepatic homogenate was determined using Bradford's method (Bradford, 1976). The activity of superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH) were determined using the methods of Gao (1998), Aebi (1984) and Ellman (1959) respectively. The reading was made in an absorbance of 440 nm for SOD, 240 for CAT and 415 for GSH. The lipid peroxidation (LPO) was determined using the Jiang's methods (Jiang 1991), the reading was made in an absorbance of 560 nm.

Morphology of Small Intestine

Morphology of small intestine histology of the jejunum tissue was studied by light microscope in accordance with Nunez et al. (1996). The tissues were taken and immediately fixed in 10% neutral buffer formalin, and then carefully embedded in paraffin. For each specimen, at least 10 sections of 5 μm thickness were prepared. Tissues were then stained with haematoxylin and eosin for histological evaluation. The morphology of the small intestines in this study included villous height, crypt depth. Measurements of villous height from the tip of the villous to the villous–crypt junction and crypt depth from the villus–crypt junction to the lower limit of the crypt were recorded as the mean of 10 fields for each specimen.

Data Analysis

The relative effectiveness of methionine sources was determined using the 99% DL-methionine as a standard. Data was analysed by ANOVA: $Y = \mu + B_i + e_{ij}$, with, μ =mean, B_i =effect treatment ($n=16$) and e =residual error, and probability of error $p < 0.05$ is considered significant. For determination of the bioefficacy of the test products compared to DL-Met data was analysed by multiple exponential regression (Little et al. 2008).

For the other parameters, data were checked for normality and homogeneity of variances and analyzed by ANOVA. Means were separated using Tukey's Test. All data were analysed within experiments by two-way analysis of variance with the general linear GLM procedure of SAS software (2000).

RESULTS

Growth Performance and Carcass Characteristics

The results of bioefficacy of 99% DL-methionine + organic acid and 88% HMTBA in the phases 1 to 21 and 22 to 42 days are shown in the Tables 4 and 5, respectively. The initial phase (1-21d) (Table 4) results for the mean weight gain measures were 112% for DLM + OA and 78% for HTMBA. For feed conversion were 123 % for DLM + OA and 69 % for HTMBA. In the final phase (21-42) (Table 5) mean weight gain measures were 121% for DLM + OA and 63% for HTMBA and for feed conversion were 173 % for DLM + OA and 51 % for HTMBA. The exponential curves (Figures 1 - 2) fit the data well for all methionine sources. Neither dietary Met levels nor source affected carcass relative carcass weight (carcass weight/live weight), a similar trend was observed on the relative weight of the gizzard. However, increased dietary Met content reduced the relative abdominal fat content.

pH GIT

Gizzard and gut pH was affected by treatments (Table 6). The pH value of the gizzard and gut was reduced for supplementation of DLM + AO and HMTBA at 21 and 42 d.

Meat Quality

The Methionine sources and levels did not affect pH and color characteristics of breast muscle. However, shear force was influenced for methionine levels. Tables 7 and 8 show as treatments with lower methionine increased the shear force.

Redox Status

As shown in Table 9 and Table 10, no significant changes in total protein concentration were observed, on the other, the LPO was increased in the basal group in the liver and gut at 21 and

42 d GSH contents in gut were higher at 21 d in the DLM and DLM + AO group, however, at 42 the GSH levels of DLM + AO and HMTBA were significantly increased. In liver at 21 and 42 d GSH content was reduced in the basal group as compared to the all sources.

SOD activity were observed significantly lower in the basal group than methionine sources at 21 d in gut and at 42 d in gut and liver. At 21 and 42 d of age, the activities of CAT in the liver and gut were reduced in the basal group compared to those in the methionine supplementations group, but there were no significant changes in methionine sources.

Plasma Analysis

At 21 d of age, no statistically significant effects of methionine supplementation were observed for plasma UA concentration (Table 11). However, higher activity of CK was observed in the basal group. At 42 d the plasma UA concentration was elevated in birds supplemented with DLM + AO and HMTBA compared with broilers without supplementation. Furthermore, chickens supplemented with HMTBA, DLM + AO and DLM were characterized by lower CK plasma activity compared with chickens the basal group.

Intestinal Morphology

Histology of jejunum was measured over time (Table 12). On 21 d, birds fed a diet supplemented with DLM or DLM + AO had greater villus height-crypt depth ratio compared with birds fed a diet supplemented with HMTBA and basal group. On the other hand, at 42 d, birds fed a diet supplemented with DLM + AO and HMTBA had greater villus height and villus height-crypt depth ratio compared with chicks fed the basal group.

DISCUSSION

The present data consistently demonstrated that bioefficacy of liquid HMTBA relative to DLM was, on average, 70,3% which is very close to 69% shown for Zelenka et al. (2013) and 68% Lemme et al. (2002). In all levels of supplementation below or higher of TSAA requirements, HMTBA-fed animals showed lower performance than DLM and DLM + AO. The physiological reasons for incomplete use of HMTBA was showed for Lingens and Molnar (1996) and Saunderson (1991) using radiolabeled Methionine sources indicated a significantly lower absorption of HMTBA compared to DLM, due to the presence of no monomeric forms which are poorly absorbed by chicken intestine.

The use of organic acid increased the bioefficacy differences between DL-methionine and HMTBA throughout the all rearing phases. According to Papatisiros et al. (2013), organic acids ameliorate the conditions of the GIT through the reduction of pH, promoting proteolytic enzyme activity, increases in the absorption and utilization of amino acids, consequently improving bird performance.

Body fat deposition can be influenced for many factors such genetic, environmental conditions and composition nutrition of diets. Summers et al. (1992) showed that the level and balance of TSAA have a significant effect on feed intake, thereby influencing weight gain and carcass composition. Additionally, Zhan et al. (2006) reported that methionine supplementation decreased abdominal fat content. They found that supplementation with methionine significantly increased the contents of creatine and free carnitine in the liver, the activity of hormone-sensitive lipase in abdominal fat Therefore, the decrease in abdominal fat may be due

to increased carnitine synthesis in the liver and hormone-sensitive lipase activity in abdominal fat.

Organic acids probably assist the digestive process of chickens by decreasing the pH of the GIT, and promoting peptic activity and protein digestion. In this study, HMTBA and organic acid supplementation in diet reduced GIT pH. According Dittoe et al. (2018) lower pH create a stimulating the growth of beneficial bacteria (production SCFAs - acid lactic), and by being bacteriostatic and bactericidal to pathogenic bacteria, improving intestinal health.

It was unexpected that there were no significant differences in colour and pH characteristics of breast muscle between the different methionine levels. In contrast to previous studies (Conde-Aguilera et al., 2016; Wen *et al.*, 2017;), no effect on the colour e pH could be observed by methionine source or concentration. The reason for the discrepancy among these studies is unclear. In terms of meat quality methionine source influence, no difference was found in this study, which was in agreement with the data of Albrecht et al. (2017).

In this study, the shear force of breast muscles was affected by the levels methionine supplementation. Lower levels of supplementation showed a higher shear force. Our finding was agreeing with the data of Conde-Aguilera et al., (2016) who reported that broilers fed the TSAA-deficient diets showed increased in the hydroxyproline (OH-Pro) and hydroxylysine (OH-Lys) content (good indicators of collagen content) in breast muscles which consequently increased shear force.

In the current study, we found that methionine deficiency led to intestinal oxidative damage in broilers (increased lipid peroxidation). Those results indicated that some beneficial effects of

Methionine on the growth and development of the birds might be attributed to its antioxidative function. On the other hand, the lowest peroxidation in the jejunum at 42 days in DLM + AO and HTMBA treatments may be due to indirectly mitigating or eliminating pathogens by decreasing pH in the GIT (Dittoe et al.,2018).

GSH plays a primary role and is regarded as an early biological marker of oxidative stress (Gagliano et al., 2006). Luminal GSH, is derive from dietary intake and biliary output (Ballatori and Rebbeor, 1998). In our study, the GSH activity were significantly reduced by the methionine deficient. One possible explanation for the better GSH activity in DLM and DLM + AO treatments compared with HMTBA at 21 d could be the direct conversion to Cysteine and synthesis of GSH in GIT. Besides, L-Met itself is an efficient reactive oxygen species scavenger and serves as an important antioxidant under physiological conditions (Levine et al., 1996; Luo and Levine, 2009).

In this study, the activities of SOD and CAT, which antioxidant enzymes considered to be the first line of cellular defense against oxidative damage (Ferreccio et al., 1998), decreased in the Met-deficient group. However, based on CAT and SOD activity, there were no statistical differences between DL-HMTBA and DLM-supplemented chickens except for a towards lower SOD activity for DL-HMTBA chicken at 21d. Nevertheless, it must be considered that SOD is only one of the many ROS-scavenging enzymes besides catalase and GSH-recycling enzymes.

Determination of plasma CK is used as an indicator for muscle cell membrane integrity (Sandercock et al., 2001). Thus, increased on plasma CK activity in methionine deficient chicken indicate oxidative stress and consequently muscle damage (Kuttappan et al., 2013).

The increased CK activity in DLM treatment at 42 d may be associated with lower levels of hepatic GSH.

Broilers deficient in methionine showed similar plasma levels of uric acid at 21 d compared to supplemented chickens. However, a higher lipid peroxidation was observed in these birds. Thus, amino acid imbalance would result in increased uric acid production in the liver of chick methionine deficient (Donsbough et al., 2010). Lower plasmatic levels of uric acid in methionine deficient broilers at 42 d can result of low feed intake and protein synthesis rate.

The morphology data supported that all sources of Met had beneficial effects on GTI development compared with basal group. The improving of Villus Height/Crypt Depth ratio at 21 d in DLM and DLM + AO due that L-Met directly stimulates cell proliferation and/or cell number as a precursor of protein synthesis, high derivatives of such as taurine or glutathione which is an antioxidant, protect villous from damage caused by oxidative stress in the small intestines (Shoveller et al., 2005). Moreover, Zhag et al., (2018) reported that birds showed limitations in conversion of D-HMTBA into L-Met because of low D-2-hydroxy acid dehydrogenase (D-HADH) activity compared to L-2-hydroxy acid oxidase (L-HAOX) and D-amino acid oxidase (D-AAOX). At 42 d DLM + AO and HTMBA treatments showed better Villus Height/Crypt Depth ratio. This result may be due HMTBA and acid organic has broader antimicrobial activities and can be used to inhibit pathogenic bacterial contamination and promoting beneficial bacteria growth improving intestinal development (Poosuwan et al. 2007).

In conclusion, these results suggest that DLM and HMTBA improve performance but do not have the same bioavailability due to its different biochemical pathways. In this study, the

relative bioavailability values of HTMBA compared with that of DL-methionine was 70% to performance. Met deficiency results in a decrease of antioxidant enzyme activities, lower activity, and enhancement of lipid peroxidation, which consequently induce oxidative damage in the intestinal mucosa and result in cellular death in the intestine of broilers. Finally, the use of organic acid favored DLM, increasing its bioefficacy.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*. 105:121-126.
- Albrecht, A., Herbert, U., Miskel, D., Heinemann, C., Braun, C., Dohlen, S., Zeitz, J. O., Eder, K., Saremi, B., Kreyenschmidt, J., 2017. Effect of methionine supplementation in chicken feed on the quality and shelf life of fresh poultry meat. *Poult. Sci.*, 96:2853–2861.
- Albrecht, A., U. Herbert, D. Miskel, C. Heinemann, C. Braun, S. Dohlen, J. O. Zeitz, K. Eder, B. Saremi, and J. Kreyenschmidt. 2017. Effect of methionine supplementation in chicken feed on the quality and shelf life of fresh poultry meat. *Poult. Sci.* 96:2853– 2861.
- Ballatori, N., and Rebbeor J. F. 1998. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis.* 18:377–87.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Conde-Aguilera, J. A., Cholet, J. C., Lessire, M., Mercier, Y., Tesseraud, S., and Milgen, J. V. 2016. The level and source of free-methionine affect body composition and breast muscle traits in growing broilers. *Poult. Sci.* 95:2322–2331.

- Del Vesco, A. P., Gasparino, E., Neto, A. R. O., Rossi, R. M., Soares, M. A. M., Da Silva, S. C. C. 2013. Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. *Livest. Sci.* 151:284–291.
- Ditoe, D. K., Ricke, S. C., Kiess, A. S. 2018. Organic Acids and Potential for Modifying the Avian Gastrointestinal Tract and Reducing Pathogens and Disease. *Front. Vet. Sci.*, 216:1-12.
- Donsbough, A. L., Powell, S., Waguespack, A., Bidner, T. D., and Southern, L. L. 2010. Uric acid, urea, and ammonia concentrations in serum and uric acid concentration in excreta as indicators of amino acid utilization in diets for broilers. *Poult. Sci.* 89:287– 294.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochemistry. Biophys.* 82:70-77.
- Ferreccio, C., Gonzalez, P. C., Milosavjlevic, S. V., Marshall, G. G. and Maria, S. A. 1998. Lung cancer and arsenic exposure in drinking water: a case control study in northern Chile. *Cad.Saúde Pública* 14:193–198.
- Gagliano, N., Dalle, D. I., Torri, C., Migliori, M., Grizzi, F., Milzani, A., Filippi, C., Annoni, G., Colombo, P., Costa, F., Ceva-Grimaldi, G., Bertelli, A., Giovannini, L. and Gioia, M. 2006. Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: a morphological biochemical and molecular study. *Toxicology* . 225:214–224.
- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X., 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelec. Bioen.* 45:41–45.
- Jankowski, J., Kubinska, M., Tdunczyk, Z. 2014. Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets – a review. *Ann. Anim. Sci.* 14:17–32.
- Kaewtapee, C., Krutthai, N., Bunchasak, C. 2016. Effects of Supplemental Liquid DL-methionine Hydroxy Analog Free Acid in Diet on Growth Performance and Gastrointestinal Functions of Piglets *Asian-Australas J Anim Sci.* 29: 1166–1172.

- Kuttappan, V. A., Huff, G. R., Huff, W. E., Hargis, B. M., Apple, J. K., Coon, C., and Owens, C. M. 2013. Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. *Poul. Sci.* 92: 339-345.
- Lemme, A., Hoehler, D., Brennan, J. J., and Mannion, P. F. 2002. Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chickens. *Poult. Sci.* 81:838–845.
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15036–15040.
- Lingens, G., and S. Molnar. 1996. Studies on metabolism of broilers by using ¹⁴C-labelled DL-methionine and DL-methionine hydroxy analog Ca-salt. *Arch. Anim. Nutr.* 49:113–124.
- Luo, S. and Levine, R. L. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASED J.* 23:464–472.
- Luo, S., Levine, R. L. 2009 Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 23:464–472.
- Nunez, M. C., Bueno, J. D., Ayudarte, M. V., Almendros, A., Rios, A., Suarez, M. D., Gil, A. 1996. Dietary restriction induces biochemical and morphometric changes in the small intestine of nursery piglets. *J. Nutrit.* 126:933-944,
- Oz, H., Chen, T. and Neuman, M. 2008. Methionine deficiency and hepatic injury in a steatohepatitis model. *Digest. Dis. Sci.* 53:767–776.
- Papatisiros, V. G., Katsoulos, P. D., Koutoulis, K. C., Karatzia, M., Dedousi, A., Christodouloupoulos, G. 2013 Alternatives to antibiotics for farm animals. *CAB Rev Ag Vet Sci Nutr Res.* 8:1–15.
- Poosuwan, K., Bunchasak, C., Prahkarnkaeo, K., Chansawang, S., and Poeikhampha, T. 2007. Effects of adding methionine hydroxy analog free acid to drinking water on growth performance and gastrointestinal functions of broiler chicks during starter period in *Proc.*

Internat. Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST), 90- 94.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., Euclides, R. F. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 186p 3.ed. UFV, 2017. Departamento de Zootecnia, Viçosa, MG.

Sandercock, D. A., Hunter, R. R., Nute, G. R., Mitchell, M. A. and Hocking, P. M. 2001. Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: Implications for meat quality. *Poult. Sci.* 80:418–425.

SAS Institute, 2000. SAS Release 8ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Sauer, N., Emrich, K., and Piepho, H. P. 2008. Meta-analysis of the relative efficiency of methionine-hydroxy-analogue-free-acid compared with DL- methionine in broilers using nonlinear mixed models. *Poult Sci.* 87:2023-2031.

Saunderson, C. L. 1991. Metabolism of methionine and its nutritional analogs. *Poult. Int.* 30:34–38.

Shoveller, A. K., Stoll, B. O., and Burrin, D. G. 2005. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J. Nutr.* 135:1609-1612.

Summers, J. D., Spratt, D., and Atkinson J. L. 1992. Broiler weight gain and carcass composition when fed diets varying in amino acid balance, dietary energy, and protein level. *Poult. Sci.*, 71:263-273

Wen, C., Jiang, X. Y, Ding, L. R, Wang, T., Zhou, Y. M. 2017. Effects of dietary methionine on growth performance, meat quality and oxidative status of breast muscle in fast-and slow-growing broilers. *Poult Sci.* 96:1707–1714.

Zelenka, J., Heger, J. Machander, V., Wiltafsky, M., Lestak, M. 2013. Bioavailability of liquid methionine hydroxy analogue-free acid relative to DL-methionine in broilers. *Acta Univ. agric. Silvic.Mendel. Brun.* 61:1513–1520.

Zhan, X. A, Li, J. X, Xu, Z. R. and Zhao, R. Q. 2006. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. *Br. Poul. Sci.* 47: 576-580.

APPENDIX

Table 1 - Composition of basal diet and maximum level of every source of methionine for phase 1 (1-21 days)

Ingredients, kg/ton	Basal	99%DL-Met		
		99%DL-Met	OA	88% HMTBA
	Treat 1	Treat 2-6	Treat 7-11	Treat 12-16
Corn 7,8%	564.890	565.730	565.730	565.730
Soybean Meal 46%	362.160	362.160	362.160	362.160
Vegetal oil	31.710	31.710	31.710	31.710
Salt	5.060	5.060	5.060	5.060
Dicalcium phosphate 20%	9.770	9.770	9.770	9.770
Limetone	10.910	10.910	10.910	10.910
L-Thr, 98%	0.280	0.278	0.278	0.278
L-Lys, 54,6%	2.610	2.610	2.610	2.610
DL-Met, 99%	-	3.535	--	-
DL-Met OA, 99%	-	-	3.535	-
HMTBA, 88%	-	-	-	3.977
Kaolin (Inert)	10.000	6,470	2,500	6.030
Organic acid (Lactic)	-	-	3.977	-
Vit/Min/Bac/Salino	2.600	2.600	2.600	2.600
Phytase	0,010	0,010	0,010	0,010
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Nutrients, %				
AME (kcal/kg)	3,050	3,050	3,050	3,050
CP	21.5	21.5	21.5	21.5
Lys, Dig	1.190	1.190	1.190	1.190
Met+Cys, Digestible	0.585	0.935	0.935	0.935
M+C/Lys	0.491	0.785	0.785	0.785
Na	0.22	0.22	0.22	0.22
Ca	0.85	0.85	0.85	0.85
NPP	0.43	0.43	0.43	0.43

¹Supplied per kg of diet : Vit. A 12,000 IU, Vit. D3 2,400 IU, Vit. E 40 mg, Vit. K 31.8 mg, Vit. B1 2.5 mg, Vit. B2 4.0 mg, Vit. B6 2.0 mg, Vit. B12 15 µg, Biotin 60 µg, Niacin 30 mg, Folacin 1.8 mg, Selenium 0.3 mg, Fe 80 mg, Zn 70 mg, Mn 70 mg, I 1 mg, Cu 10 mg, Salinomycin, 12%.

*Inert used to methionine supplementation.

Table 2 - Composition of basal diet and maximum level of every source of methionine for phase 2 (22-42 days)

	Basal	99%DL-Met	99% DL-Met	
			OA	88% HMTBA
Ingredients, kg/ton	Treat1	Treat 2-6	Treat 7-11	Treat 12-16
Corn 7,8%	614.750	614.750	614.750	614.750
Soybean Meal 46%	310.940	310.940	310.940	310.940
Vegetal oil	38.200	38.200	38.200	38.200
Salt	5.080	5.080	5.080	5.080
Dicalcium phosphate 20%	7.670	7.670	7.670	7.670
Limetone	9.750	9.750	9.750	9.750
L-Thr,98%	0.5300	0.530	0.530	0.530
L-Lys, 54.6%	1.357	1.357	1.357	1.357
DL-Met, 99%	-	3.535	--	-
DL-Met, 99%	-	-	3.535	-
HMTBA, 88%	-	-	-	3.977
Caolin (Inert)	9,590	6.070	1.640	5.570
Organic acid (Lactic)	-	-	3.977	-
Vit/Min/Bac/Salinomicin	2.600	2.600	2.600	2.600
Phytase	0.010	0.010	0.010	0.010
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Nutrients, %				
AME (kcal/kg)	3,150	3,150	3,150	3,150
CP	19.5	19.5	19.5	19.5
Lys, Dig	1.0	1.0	1.0	1.0
Met+Cys, Digestible	0.539	0.889	0.889	0.889
M+C/Lys	0.539	0.889	0.889	0.889
Na	0.220	0.220	0.220	0.220
Ca	0.750	0.750	0.750	0.750
NPP	0.380	0.380	0.380	0.380

¹Supplied per kg of diet :Vit. A 12.000 IU, Vit. D3 2400 IU, Vit. E 40 mg, Vit. K 31,8 mg, Vit. B1 2,5 mg, Vit. B2 4,0 mg, Vit.B6 2,0 mg, Vit. B12 15 µg, Biotina 60 µg, Niacin 30 mg, Folacin 1,8 mg, Selenium 0.3 mg, Fe 80 mg, Zn 70 mg, Mn 70 mg, I 1 mg, Cu 10 mg, Salinomicin, 12%.

*Inert used to methionine supplementation.

Table 3 Experimental design of birds, and methionine supplementation levels in the diets from 1 to 42 days of age.

Treat.	Addition DL-Met	Addition DL-Met + OA ^b	Addition HMTBA	Replicates	Birds per replicates Floor pens
1 NC ^a	---	---	---	6	17
2	0.0505%	---	---	6	17
3	0.1010%	---	---	6	17
4	0.1515%	---	---	6	17
5	0.3030%	---	---	6	17
6	0.3535%	---	---	6	17
7	---	0.0505% + 0.0568	---	6	17
8	---	0.100% + 0.1136	---	6	17
9	---	0.150% + 0.1704	---	6	17
10	---	0.300% + 0.3409	---	6	17
11	---	0.350% + 0.3977	---	6	17
12	---	---	0.0568%	6	17
13	---	---	0.1136%	6	17
14	---	---	0.1704%	6	17
15	---	---	0.3409%	6	17
16	---	---	0.3977%	6	17

^aNC = Negative control diet deficient in SID Met+Cys

^bOA = Organic acid = Lactic acid (2-hydroxypropionic) with a pKa of 3.68

Table 4 – Multiple Exponential regression of weight gain and feed conversion rate of broilers supplemented with different sources.

$Y = b_0 + b_1 * (1 - \exp(-(b_2 * X_1) + (b_2 * b_3 * X_2) + (b_2 * b_4 * X_3))))$						
Weight Gain d1 to d 21						
	b	SE	95% Conf. Lim.	Bioefficacy	r2	
Basal	0.7838	0.0101	0.7637	0.8039	-	
DLM	14.5809	1.5118	11.5779	17.5838	100%	87%
DLM + OA	1.1252	0.1293	0.8683	1.3822	112%	
HMTBA	0.7801	0.0847	0.6119	0.9483	78%	
Feed Conversion Rate d1 to d 21						
	b	SE	95% Conf. Lim.	Bioefficacy	r2	
Basal	1.4914	0.0104	1.4707	1.512	-	
DLM	9.6761	1.1123	7.4666	11.8857	100%	87%
DLM + OA	1.2257	0.13	0.9673	1.484	123%	
HMTBA	0.6948	0.0697	0.5563	0.8333	69%	

Table 5 – Multiple Exponential regression of weight gain and feed conversion rate of broilers supplemented with different sources.
$$Y = b_0 + b_1 * (1 - \exp(-(b_2 * X_1) + (b_2 * b_3 * X_2) + (b_2 * b_4 * X_3)))$$

	Weight Gain d 22 to d 42					r2
	b	SE	95% Conf. Lim.		Bioefficacy	
Basal	1.9446	0.0207	1.9034	1.9857	-	84%
DLM	9.0348	1.2466	6.5585	11.511	100%	
DLM + OA	1.212	0.1468	0.9203	1.5037	121%	
HMTBA	0.6304	0.0724	0.4866	0.7742	63%	
	Feed Conversion Rate d 22 to d 42					r2
	b	SE	95% Conf. Lim.		Bioefficacy	
Basal	1.9078	0.0186	1.8708	1.9447	-	78%
DLM	13.2188	2.0359	9.1748	17.2628	100%	
DLM + OA	0.9382	0.1432	0.6536	1.2227	173%	
HMTBA	0.4644	0.0671	0.3312	0.5976	51%	

Table 6 – Effects sources and levels methionine on pH of gizzard and small intestine of broilers 21 and 42Day

Treatments	Guizzard		Small intestine	
	21D	42D	21D	42D
1 (BD)	3,21 a	3,61 a	6,83 a	6,74 a
5 (DLM)	2,96 a	3,02 b	6,76 a	6,52 a
10 (DLM+AO)	2,17 b	2,49 c	5,91 b	5,80 b
15(HMTBA)	2,26 b	2,39 c	6,09 b	5,86 b
EPM	4,01	5,72	5,31	4,25
CV	5,20	4,30	5,90	3,84
Valor de P	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. BD = basal diet; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% Lactic Acid HMTBA= Methionine Hydroxy Analogue

Table 7 – Effects sources and levels methionine on breast meat quality of broilers (21d)

Treatments	pH	L	A	b	SF
1	5,95	62,57	0,84	8,83	3,40 a
2	5,97	64,77	0,30	9,42	2,95 ab
3	5,89	64,9	0,57	9,66	2,84 ab
4	6,02	63,01	-0,08	9,28	2,86 ab
5	5,96	62,09	-0,18	8,04	1,71 b
6	6,01	59,8	-0,01	769	1,64 b
7	6,01	62,01	0,24	8,6	2,91 ab
8	6,10	60,91	0,15	7,68	2,60 ab
9	5,83	65,62	0,60	10,79	2,05 ab
10	5,95	62,3	0,45	9,72	1,59 b
11	5,85	61,45	0,42	8,82	1,51 b
12	5,92	64,05	0,76	9,88	2,39 ab
13	5,91	60,27	1,01	6,79	1,36 b
14	6,02	63,01	0,89	7,64	2,14 ab
15	6,01	61,99	0,16	7,64	1,52 b
16	5,78	60,97	0,84	8,46	1,40 b
SEM	0,111	0,594	0,796	0,536	1,74
CV	23,44	3,93	59,14	21,52	15,97
Valor de P	0,489	0,198	0,710	0,545	<0,05

Means within a column with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$; n = 6

1L* = lightness, a* = redness, b* = yellowness, SF = Shear Force

Table 8 – Effects sources and levels methionine on breast meat quality of broilers (42D)

Treatments	pH	L	a	b	SF
1	5,71	53,74	7,14	18,24	6,22 a
2	5,84	51,72	6,18	17,25	4,95 b
3	5,79	52,31	6,69	19,18	4,55 b
4	5,81	50,63	6,72	16,95	3,94 bc
5	5,77	52,79	6,20	18,11	3,253 c
6	5,71	50,33	6,96	19,08	3,99 bc
7	5,80	47,70	7,78	17,46	5,26 b
8	5,73	51,10	6,46	17,93	4,63 b
9	5,82	53,13	7,29	19,51	4,01 bc
10	5,79	50,88	8,25	20,14	3,79 bc
11	5,78	51,86	7,05	19,00	6,50 a
12	5,78	49,81	7,61	17,86	5,16 b
13	5,73	51,62	7,10	17,99	3,97 bc
14	5,74	52,94	6,73	18,24	4,87 b
15	5,76	49,38	6,61	18,23	3,40 c
16	5,76	51,37	6,05	18,57	3,04 c
SEM	0,072	0,536	0,796	0,945	4,14
CV	1,53	4,96	14,07	8,91	15,55
Valor de P	0,139	0,381	0,355	0,659	<0,05

Means within a column with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$; n = 6.

1L* = lightness, a* = redness, b* = yellowness, SF = Shear Force

Table 9 – Effects sources and levels methionine on redox status of gut and liver of broilers (21D)

Treatments	Total Proteín		LPO [hidroperóxids]		GSH		SOD		CAT	
	(mg/mL)		(nmol. min-1.mg of proteín-1)		(µg/g of tissue)		(U/mg proteín)		(nmol.min-1.mg proteins-1)	
	Gut	Liver	Gut	Liver	Gut	Liver	Gut	Liver	Gut	Liver
1 (BD)	2,43	4,00	57,20 a	47,28 a	396,32 c	514,82 b	1427,20 b	1561,15 c	32,35 b	197,07 b
5 (DLM)	2,90	4,05	34,57 b	26,80 b	656,55 a	884,38 a	2160,50 a	2480,24 a	39,09 a	435,12 a
10 (DLM+AO)	2,45	4,05	36,73 b	24,89 b	691,72 a	877,19 a	2181,74 a	2321,49 a	45,46 a	443,15 a
15(HMTBA)	1,83	4,00	40,18 b	29,99 b	584,51 b	874,53 a	1994,94 a	1993,31 b	38,95 a	405,22 a
SEM	0,57	0,42	5,52	2,98	64,2	139,08	389,28	227,53	4,81	33,51
CV	24,22	17,74	11,73	14,40	10,21	9,08	21,44	14,55	15,14	12,68
Valor de P	0,639	0,776	<0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. LPO = Lipid Peroxidation; GSH = glutathione; SOD = Superoxide Dismutase; CAT = Catalase

2. BD = basal diet; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% Lactic Acid HMTBA= Methionine Hydroxy Analogue.

Table 10 – Effects sources and levels methionine on redox status of gut and liver of broilers (42D)

Treatments	Total Proteín		LPO [hidroperóxids] (nmol. min-1.mg of proteín-1)		GSH (µg/g of tissue)		SOD (U/mg proteín)		CAT (nmol.min-1.mg proteins- 1)	
	Gut	Liver	Gut	Liver	Gut	Liver	Gut	Liver	Gut	Liver
1 (BD)	2,54	4,29	58,40 a	45,89 a	327,48 c	529,07 b	1524,91 b	1398,34 b	51,92 b	230,46 b
5 (DLM)	1,23	3,60	41,45 b	29,15 b	454,68 b	765,19 a	2193,09 a	1954,99 a	87,76 a	448,14 a
10 (DLM+AO)	2,99	3,91	31,85 c	28,79 b	521,43 a	846,88 a	2245,78 a	1977,95 a	83,84 a	441,00 a
15(HMTBA)	2,36	4,11	29,82 c	27,76 b	547,38 a	863,58 a	2235,30 a	2082,15 a	91,69 a	498,05 a
SEM	0,65	0,21	9,55	4,22	53,15	40,57	102,43	98,07	12,97	23,17
CV	49,77	8,97	11,28	12,58	13,51	12,39	13,29	12,36	15,06	14,38
Valor de P	0,3418	0,1901	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. LPO = Lipid Peroxidation; GSH = glutathione; SOD = Superoxide Dismutase; CAT = Catalase

2. BD = basal diet; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% Lactic Acid HMTBA= Methionine Hydroxy Analogue

Table 11 – Plasma Uric Acid (UA) and Creatine Kinase (CK) levels of Broilers 21 – 42 D

Treatments	CK (U/L) 21			
	UA (mg/dl) 21 D	D	U.A (mg/dl) 42 D	CK (U/L) 42 D
1 (BD)	13,13	16,49a	8,84b	81,35a
5 (DLM)	11,01	4,45b	13,75a	62,57b
10 (DLM+AO)	10,48	3,28b	14,54a	41,18c
15(HMTBA)	11,92	5,81b	13,48a	48,41c
CV	4,54	4,07	2,86	12,94
SEM	1,30	2,04	0,52	7,15
P valor	0,126	<0,01	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. A.U = Uric Acid CK = Creatine kinase

2. BD = basal diet; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% Lactic Acid

HMTBA= Methionine Hydroxy Analogue.

Table 12 – Effects sources and levels methionine on the morphology of jejunum of broilers

Treatments	21 d of age			42 d of age		
	Villus Height (μm)	Crypt Depth (μm)	Villus: Crypt Ratio ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)	Villus Height (μm)	Crypt Depth (μm)	Villus: Crypt Ratio ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)
1 (BD)	1024 c	291 a	3,52 c	713 c	229	3,11 c
5 (DLM)	1198 a	270 b	4,44 a	857 b	235	3,64 b
10 (DLM+AO)	1228 a	273 b	4,49 a	1003 a	231	4,34 a
15(HMTBA)	1125 b	274 b	4,10 b	982 a	224	4,38 a
CV	9,78	10,74	5,89	8,76	5,58	9,74
SEM	4,41	5,72	6,55	4,25	4,93	5,71
P valor	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,087	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. BD = basal diet; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% Lactic Acid HMTBA= Methionine Hydroxy Analogue.

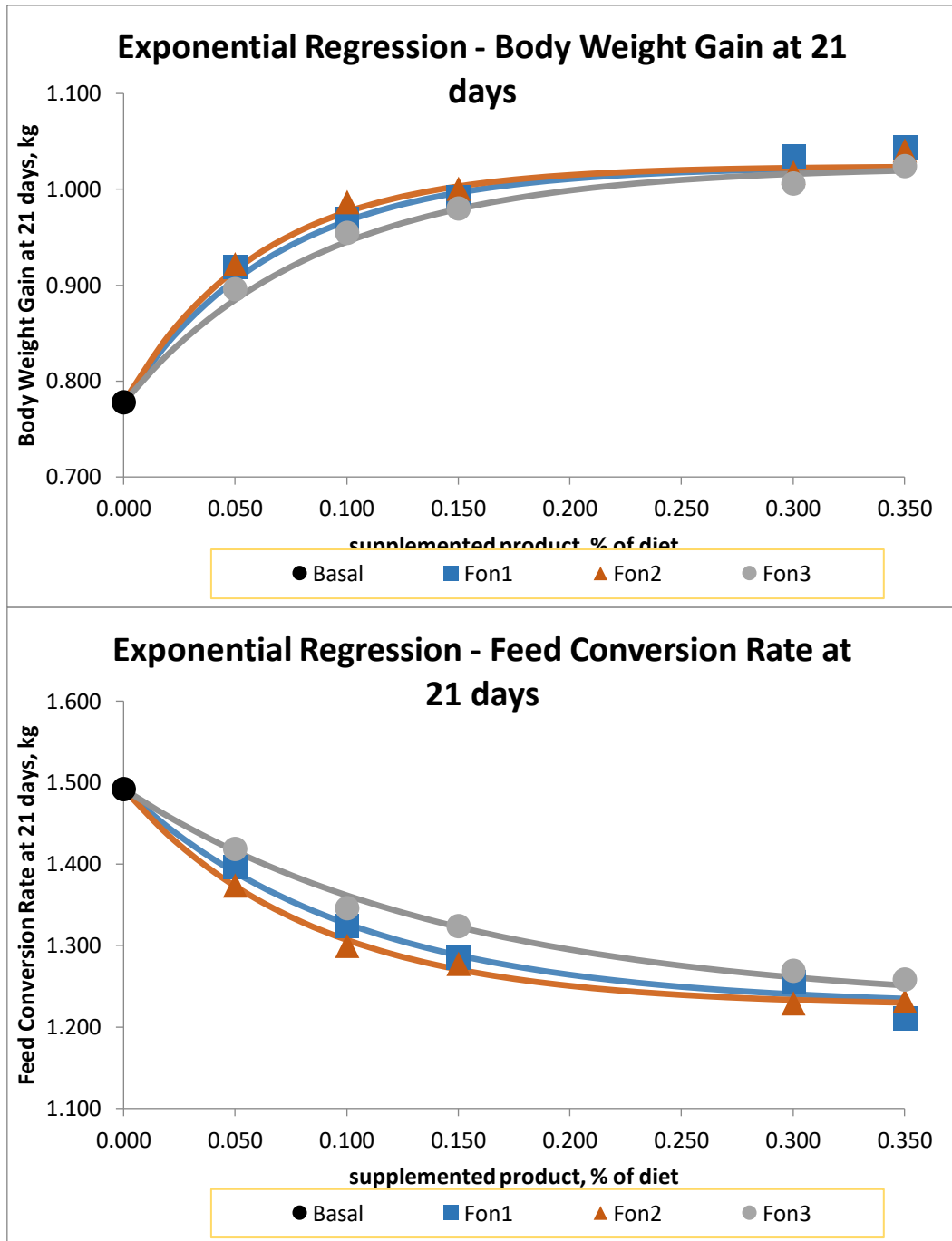


Figure 1. Exponential Regression - Feed Conversion and Body Weight at 21days.

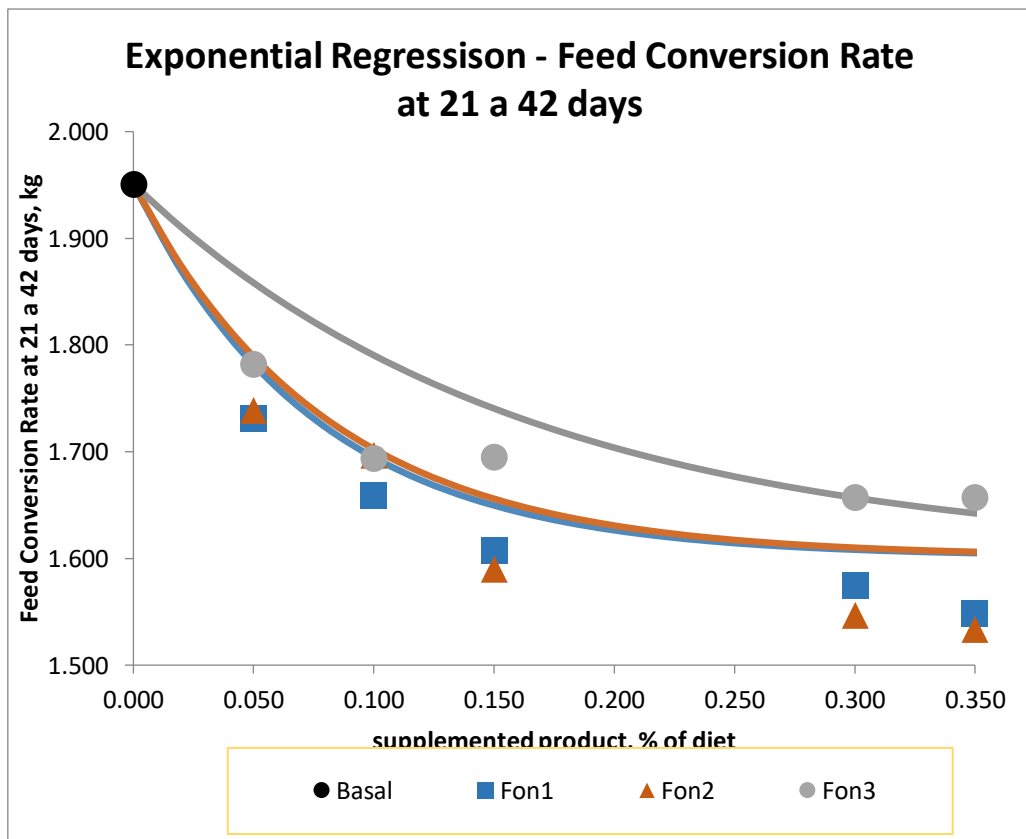
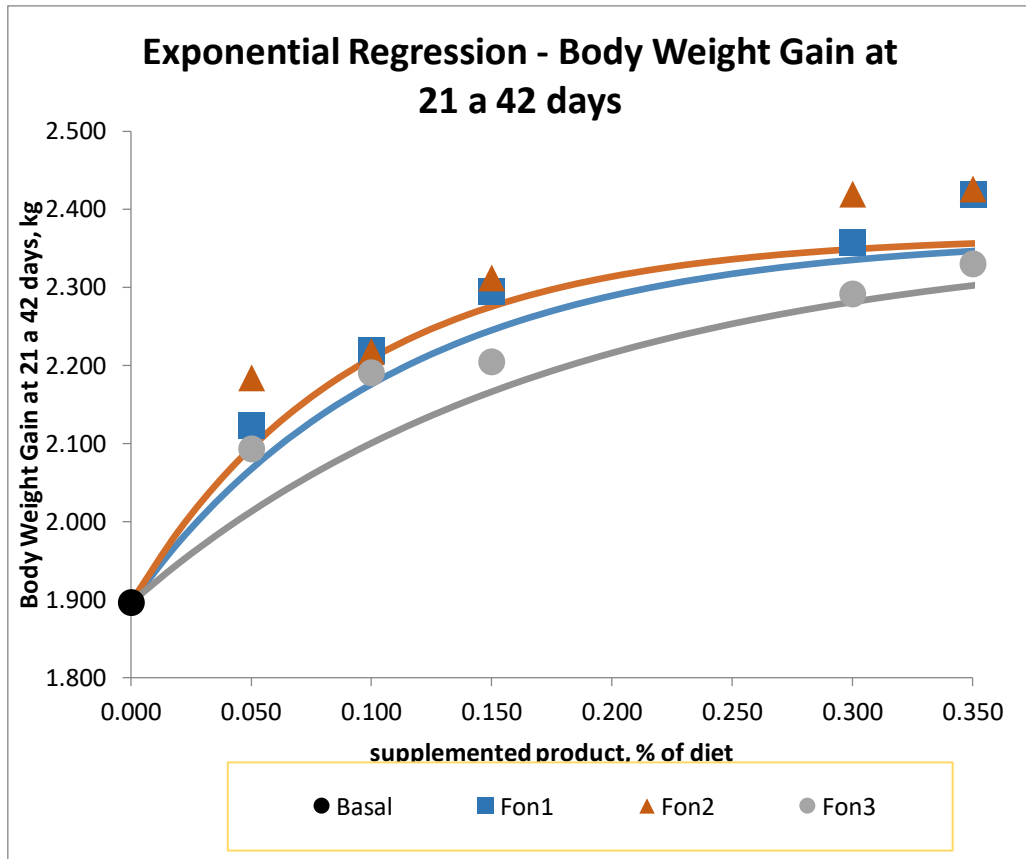


Figure 2. Exponential Regression - Feed Conversion and Body Weight at 21 days.

**ARTIGO 2 – DIETARY METHIONINE SOURCES AND LEVELS ON GROWTH
PERFORMANCE, MEAT QUALITY, GUT HEALTH, REDOX STATUS OF
BROILERS CAGES REARING**

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA
CIENTÍFICA POULTRY SCIENCE (PS).**

https://academic.oup.com/ps/pages/General_Instructions

Canas-Mendoza E. A. *et al.*

Methionine levels and sources for broilers

**METHIONINE SOURCES ON GROWTH PERFORMANCE, MEAT QUALITY, GUT
HEALTH, REDOX STATUS OF BROILERS CAGES REARING**

Edwin A. Cañas. M[†], Andressa C. Carvalho[†], Fabio Tarazona[†], Antônio G. Bertechini[†]

[†]Animal Science Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-000, Brazil

¹This work was supported by Evonik Company

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors thank the Foundation for Supporting Research of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their contributions and support.

²Corresponding author: bertechini@ufla.br and edwincanasm@gmail.com

ABSTRACT

This study was conducted to test the effects of supplemental DLM + AO and HTMBA on redox status, gut development, growth performance and meat quality of broiler chickens compared with DL-Met. A total of 1632 male 1-d-old Coob 500 chickens were weighed and randomly allotted to 16 treatments for 42 d, including a basal diet (BD) without industrial methionine supplementation or a basal diet that was supplemented with five DLM or DLM + AO or

HTMBA levels (0.05; 0.10; 0.15; 0.30; 0.35 %). Performance, redox status (liver-gut), plasma Uric Acid (PUA) and Creatine Kinase (CK), intestine pH and morphology were measured. Bioefficacy of HMTBA was 70% and use of organic acid favored DLM increasing its bioefficacy (121%). Shear force had increased in chicks fed a diet BD and methionine deficient. Chicks fed a diet supplemented with any Met source had increased ($P < 0.05$) GSH, CAT, SOD activity and reduced ($P < 0.05$) lipid peroxidation compared with chicks fed the BD. On 21d DLM and DLM + AO had greater ($P < 0.05$) villus height:crypt depth ratio compared with chicks fed HMTBA. However at 42 d, chicks fed a diet supplemented with HMTBA and DLM + AO had greater ($P < 0.05$) villus height:crypt depth. On the other hand, HMTBA and DLM + AO supplementation decreased ($P < 0.05$) pH in gizzard and jejunum. At 21 and 42 d CK plasma activity declined ($P < 0.05$) in chicks fed any methionine source. Nevertheless, on 42 d HMTBA and DLM + AO CK activity was lower compared with DLM source. PUA on 42 d was increased in chicks with all methionine sources. Considering together all of the studied parameters, the relative bioavailability of HTMBA and DLM + AO was 70% and 121% respectively compared to the DLM. Supplementation of Met served a better performance, redox status and development of the gut of chicks compared with BD diet. Finally, the use of organic acid favored DLM, increasing its bioefficacy.

Key Words: Bioefficacy, Sulfur Amino Acid, Organic Acid

INTRODUÇÃO

A metionina (MET) é um aminoácido essencial e o primeiro limitante em dietas comerciais de milho e farelo de soja em frangos de corte. Dessa forma, é necessária a suplementação de Met industrial com a finalidade de atender os requisitos de aminoácidos sulfurados totais (TSAA) desta espécie (Dozier e Mercier, 2013), já que esse aminoácido está envolvido na síntese

proteica, na doação do radical metil e na formação de substâncias como creatinina, poliaminas, epinefrina, cistina, entre outras (Nukreaw *et al.*, 2011; Bunchasak, 2009; Rubin *et al.*, 2007).

A MET é o único aminoácido obtido por síntese química, resultando em uma mistura racêmica das formas D e L (Agostini *et al.*, 2015); por outro lado, atualmente existem várias formas de suplementação do aminoácido disponíveis comercialmente. No entanto, as fontes mormente suplementadas na indústria avícola são DL-metionina (DLM) e DL-2- hidroxí-4- (metil) ácido butanóico (HMBA) (Vázquez-Añón *et al.*, 2017).

Embora esses compostos sejam fornecedores de L-Met para as aves são quimicamente diferentes, uma vez que o HMTBA age como um ácido orgânico até ser absorvido e possui um grupo hidroxila no carbono assimétrico, enquanto a DLM tem um grupo amino. Tais diferenças químicas resultam em diferenças substanciais na absorção, no metabolismo e na transformação do fornecimento de L-Met ao animal (Dibner, 2003; Zhang *et al.* 2015).

Atualmente, ainda existe controvérsia sobre a biodisponibilidade relativa das diferentes fontes de metionina. Huyghebaert *et al.* (1993) concluíram que a biodisponibilidade era do 64% em relação à DL-metionina, enquanto Sangali *et al.* (2015) observaram que biodisponibilidade de HMBA foi de 42% em comparação com o DLM. Sabe-se que o ácido orgânico melhora as condições do trato gastrointestinal (TGI) por meio da redução do pH do TGI, aumentando a digestibilidade dos nutrientes, estimulando a atividade enzimática digestiva e o crescimento de bactérias benéficas (Papatisiros *et al.* 2013). Portanto, o efeito duplo (fonte Met e ácido orgânico) do HMTBA poderia promover o desempenho de crescimento e boas condições do trato gastrointestinal (Kaewtapee *et al.* 2016).

Em estudos anteriores, a bioeficácia do HMTBA em comparação com DL-metionina foi amplamente documentada (Sauer *et al.*, 2008; Sangali *et al.*, 2015). No entanto, o efeito do pH da dieta e do sistema de criação sobre a bioeficácia da metionina permanecem pouco documentados. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a substituição efetiva das fontes de 99% DL-Metionina + ácido orgânico e 88% de ácido 2-hidroxi-4-metiltio-butanóico líquido (HMTBA) em comparação com 99% de DL-metionina em frangos de corte machos criados em gaiolas recebendo dietas isotônicas à base de milho e farelo de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Dietas, Delineamento Experimental

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de bioética da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Em um total de 768 frangos da linhagem *Cobb*, 500 foram comprados em um nascedouro comercial no qual foram vacinados contra a doença de *Marek* e criados durante um período de 1 para 42 dias de idade em gaiolas de metabolismo (75 x 63 x 45). Os pintos foram divididos em 16 tratamentos com 6 repetições (8 aves cada gaiola). As dietas foram formuladas de acordo com o Rostagno *et al.* (2017) para todos os nutrientes, exceto para metionina + cisteína nas fases de 1-21 dias (Tabela 1) e 22-42 dias (Tabela 2). Três fontes de metionina (DL-metionina 99%, DL-metionina 99% + ácido orgânico e HMTBA 88%) foram suplementadas em cinco níveis (0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,35), além de um tratamento basal sem suplementação de metionina (Tabela 3). As dietas foram formuladas à base de milho e farelo de soja em ambas as fases, variando apenas os níveis de metionina + cisteína digestível e as fontes de metionina. O pH das dietas foi determinado usando 10 g de ração em 90 ml de água destilada, usando NaOH na titulação. Dessa forma, os pH dos tratamentos 7-11 foram

equalizados aos pH dos tratamentos 12-16, com a inclusão de ácido láctico nos tratamentos 7 ao 11.

Todas as gaiolas estavam equipadas com comedouro de canal e bebedouros tipo *nipple*. Durante todo o período experimental, as aves receberam ração e água, *ad libitum* e foram criadas seguindo as recomendações de iluminação, de temperatura, de umidade e de manejo, especificadas no Guia de Manejo de COBB-VANTRESS. O consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar (FCR) foram registrados aos 14, 21, 35 e 42 dias de idade por meio de caneta replicadora. A mortalidade foi registrada diariamente, quando necessário.

Coleta de amostras

Aos 21 e 42 dias de idade, para avaliação hematológica de creatina quinase e ácido úrico, seis frangos de cada tratamento (um frango por repetição) foram selecionados aleatoriamente, pesados e coletados via veia ulnar usando seringas. O sangue coletado foi armazenado em tubos de sangue com EDTA e mantidos em gelo. Posteriormente, as aves foram eutanasiadas por luxação cervical, sendo que as penas, a cabeça, os pés, a gordura abdominal, o sangue e as vísceras, foram removidos para determinar o rendimento de carcaça e o peso abdominal da gordura. Os músculos do peito (peitoral maior e peitoral menor) foram pesados para calcular o rendimento e imediatamente armazenados a 4°C para análise posterior de qualidade da carne. A moela, o intestino e o fígado foram coletados. Logo depois, o conteúdo da moela e do intestino delgado foram coletados para análise de pH da digesta. Um segmento intestinal de aproximadamente 4 cm de comprimento de jejuno e fígado foram cuidadosamente limpos com solução de NaCl a 0,85% e armazenado a -80°C. Para a morfologia intestinal foi retirado um segmento de jejuno e fixado imediatamente em formalina a 10%.

Análise de Plasma

As concentrações plasmáticas de ácido úrico foram determinadas por meio do espectrofotômetro usando uma reação triturante. A atividade da creatina fosfoquinase (CK) foi analisada utilizando o método IFCC.

Qualidade da carne

O pH no músculo do peito foi medido 12 h após o abate a 2,5 cm abaixo da superfície, utilizando um medidor portátil de pH de superfície (pH 8011, *Peter Bock Umwelttechnik, Gersfeld, Alemanha*). Três mensurações em diferentes pontos foram realizadas para cada amostra de carne.

A cor da carne foi determinada usando um colorímetro *Miniscan (Hunterlab, Reston, VA)* relatando nos valores do sistema CIELAB de luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*), e índice de amarelo (b^*). A cor foi mensurada 12 h após o abate em três pontos diferentes.

Posteriormente, amostras cozinhadas de músculo do peito foram cortadas em três tiras (1 cm × 1 cm × 3 cm) paralelas à fibra muscular para medir a força de cisalhamento. Cada tira foi analisada em duplicata usando um *Digital Meat Tenderness Meter* (Modelo C1LM3) e a média dos seis valores de cada amostra foi calculada.

Status Redox

Amostras do intestino e do fígado dos tratamentos 1, 5, 10 e 15 foram analisadas. A quantidade de proteína total (TP) foi determinada usando o método de *Bradford* (Bradford, 1976). Níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH) foram determinados pelos métodos de Gao (1998), Aebi (1984) e Ellman (1959), respectivamente. A leitura foi feita em absorbância de 440 nm para SOD, 240 nm para CAT e 415 nm para GSH.

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada usando os métodos de *Jiang* (Jiang 1991), a leitura foi feita em uma absorvância de 560 nm.

Morfologia de Intestino

A histomorfometria de intestino (jejuno) foi avaliada por microscopia de luz de acordo com o método apresentado por Nunez *et al.* (1996). Após o abate, uma porção do intestino foi retirada e fixada em formalina a 10%; posteriormente, os tecidos foram cuidadosamente embebidos em parafina e cortados pelo menos em seis secções de 5 µm de espessura. Em seguida, as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação histológica. A morfologia do intestino delgado, neste estudo, incluiu a altura das vilosidades, a profundidade da cripta e a relação cripta/vilo. As medidas da altura das vilosidades da ponta da vilosidade à junção vilosidade-cripta e a profundidade da cripta da junção vilo-cripta ao limite inferior da cripta foram registradas como a média de 10 campos para cada amostra.

Análises Estatísticas

A eficácia relativa das fontes de metionina foi determinada usando 99% de DL-metionina como padrão. Os dados foram analisados por ANOVA: $Y = \mu + B_i + e_{ij}$, com μ = média, B_i = tratamento de efeito ($n = 16$) e e = erro residual; a probabilidade de erro $p < 0,05$ é considerada significativa. Para determinação da bioeficácia das fontes testadas em comparação com os dados de DLM foi analisada por regressão exponencial múltipla.

Para os outros parâmetros avaliados, os dados foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias e analisados pela ANOVA. As médias foram separadas usando o teste de *Tukey*. Todos os dados foram analisados em experimentos por análise de variância bidirecional com o procedimento GLM linear geral do *software* SAS (2000).

RESULTADOS

Desempenho e Rendimento de Carcaça

Os resultados da bioeficácia de 99% de DL-metionina + ácido orgânico e 88% de HMTBA nas fases 1 a 21 e 22 a 42 dias são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Na fase inicial (1-21d) (Tabela 4), a bioeficácia para ganho de peso foi de 107% para DLM + AO e 50% para HMTBA. Para conversão alimentar foram 151% para DLM + AO e 58% para HMTBA. Na fase final (22-42) (Tabela 5), a bioeficácia para de ganho de peso foi de 149% para DLM + AO e 39% para HMTBA, já as medias para conversão alimentar foram 173% para DLM + AO e 51% para HMTBA. As curvas exponenciais (Figuras 1 - 2) ajustam bem os dados para todas as fontes de metionina. Não foram observadas diferenças significativas das fontes sobre o peso de carcaça relativo (peso de carcaça / peso vivo).

pH TGI

O pH da moela e do intestino foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 6). O valor de pH da moela e do jejuno foi menor nos tratamentos DLM + AO e HMTBA aos 21 e 42 dias.

Qualidade da carne

As fontes e os diferentes níveis de metionina não influenciaram significativamente as características de pH e cor do músculo do peito. Por outro lado, a força de cisalhamento foi influenciada pelos níveis de metionina. As Tabelas 7 e 8 mostram como os peitos dos animais que não receberam suplementação de metionina aumentaram a força de cisalhamento aos 21 e 42 dias.

Status Redox

Não foram evidenciados efeitos significativos na concentração de proteína total em nenhuma das fases (Tabela 9 e na Tabela 10). Por outro lado, a LPO em fígado e intestino aumentou significativamente aos 21 e 42 dias no grupo basal. As concentrações hepáticas e intestinais de GSH, CAT e SOD foram reduzidas significativamente nas aves que não receberam suplementação de nenhuma fonte de metionina.

Análises Plasmáticas

Aos 21 e 42 dias de idade, não foram observados efeitos estatisticamente significativos ($>0,05$) da suplementação de metionina para a concentração plasmática de ácido úrico (Tabela 11). No entanto, as concentrações plasmáticas de CK foram influenciadas significativamente. Aos 21 dias as aves suplementadas com DLM e DLM + AO apresentaram os menores níveis quando comparadas com os tratamentos HMTBA e BD. Já aos 42 dias a atividade plasmática de CK foram reduzidas nas aves que foram suplementadas por qualquer fonte de metionina.

Morfologia Intestinal

Os dados para morfologia intestinal são apresentados na Tabela 12. No dia 21, as aves alimentadas com uma dieta suplementada com DLM ou DLM + AO apresentaram maior relação vilos/cripta quando comparadas com aves alimentadas com uma dieta suplementada com HMTBA e grupo basal. No entanto, aos 42 dias, as aves suplementadas com qualquer fonte de MET com DLM, DLM + AO e HMTBA apresentaram maior relação vilos/cripta em relação aos frangos que não receberam nenhuma suplementação de metionina.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que a bioeficácia da HMTBA em frangos de corte criados em gaiolas sem o desafio da cama no período de 1 a 42 dias foi de 58,8 % em relação a DLM (Figura 3). Os dados anteriores concordam com os expostos por Sauer *et al.* (2008) que demonstraram, após um estudo de metanálise, que a HMTBA apresenta uma menor bioeficácia quando comparada com a DLM metionina em base equimolar. Igualmente, Zelenka *et al.* (2013) e Payne *et al.*, (2006) observaram um coeficiente de 68% e 57%, respectivamente, na bioeficácia de HMTBA ao ser comparada com a DLM. Uma das razões fisiológicas para o uso incompleto de HMTBA foi mostrado para Lingens e Molnar (1996) e Saunderson (1991): ao usarem fontes de Met radiomarcadas, observaram uma absorção significativamente menor de HMTBA comparado a DLM devido à presença oligômeros os quais, segundo os autores, são pouco absorvidos pelo intestino do frango. No entanto, Martin-Venegas *et al.* (2006) após um estudo *in vivo* em frangos de corte concluíram que os oligômeros presentes na HMTBA são hidrolisados por enzimas presentes no intestino para posteriormente serem absorvidos. Porém, os autores não conseguiram identificar se a totalidade dos oligômeros foram hidrolisadas e absorvidas pelo intestino.

O uso de ácido orgânico aumentou as diferenças de bioeficácia entre DLM e HMTBA ao longo de todas as fases de criação (Figura 1). Segundo Geraert *et al.* (2005) e Papatiros *et al.* (2013), os ácidos orgânicos melhoram as condições do TGI através da redução do pH, promovendo atividade enzimática, aumento na absorção e utilização de aminoácidos, atividades antimicrobianas e, conseqüentemente, melhorando a saúde intestinal.

A deposição de gordura corporal pode ser influenciada por muitos fatores, como condições genéticas, ambientais e composição nutricional das dietas. Summers *et al.* (1992) mostraram que o nível e o balanço de TSAA tem um efeito significativo no consumo de ração, influenciando, assim, o ganho de peso e a composição da carcaça. Além disso, Zhan *et al.* (2006) relataram que a suplementação de metionina diminuiu o conteúdo de gordura abdominal. Os autores descobriram que a suplementação com metionina aumentou significativamente o conteúdo de creatina e carnitina livre no fígado à atividade da lipase sensível a hormônio na gordura abdominal. Portanto, a diminuição na gordura abdominal pode ser devido ao aumento da síntese de carnitina no fígado e sensível ao hormônio atividade da lipase na gordura abdominal.

Os parâmetros avaliados para qualidade de carne não foram influenciados pelas diferentes fontes de Met ($>0,05$). Nossos resultados concordam com os encontrados por Albrecht *et al.* (2019) e Murawska *et al.*, (2018), que não reportaram diferenças significativas nas características de cor e pH de frangos de corte e perus suplementados com DLM e HMTBA. Outrossim, os autores observaram efeitos nos diferentes níveis de suplementação sobre o pH e a cor do peito, discordando com os dados obtidos neste experimento. A razão para a discrepância entre esses estudos não é clara.

Neste estudo, a força de cisalhamento do peito foi influenciada. As aves que não foram suplementadas (tratamento basal) apresentaram maior força de cisalhamento. Nosso estudo concorda com os dados de Conde-Aguilera *et al.* (2016) que relataram que frangos alimentados com dietas deficientes em TSAA mostraram aumento no teor de hidroxiprolina (OH-Pro) e hidroxilisina (OH-Lys) (bons indicadores de conteúdo de colágeno) nos músculos do peito que, por sua vez, aumentam a força de cisalhamento.

No presente estudo foi observado como a deficiência de metionina aumentou a incidência da peroxidação lipídica e reduziu a atividade da GSH, CAT e SOD. A GSH é considerada a principal molécula antioxidante do organismo e sua atividade pode ser usada como um marcador biológico de estresse oxidativo (Gagliano *et al.*, 2006). Neste experimento, a atividade da GSH foi significativamente reduzida pela deficiência de metionina em fígado e intestino aos 21 e 42 dias. Sabe-se que a GSH é sintetizada a partir de aminoácidos tais como a glicina, ácido glutâmico e a cisteína, a qual é sintetizada pelo processo de transulfuração da metionina.

A determinação da CK plasmática é usada como um indicador para a integridade da membrana da célula muscular (Sandercock *et al.*, 2001). Assim, o aumento da atividade plasmática da CK em frangos deficientes em metionina indica estresse oxidativo e, conseqüentemente, dano muscular (Kuttappan *et al.*, 2013). O aumento da atividade da CK no tratamento com HMTBA aos 21 dias pode estar associado à baixa bioeficácia ou transformação dos precursores de Met na sua forma biologicamente ativa.

As concentrações plasmáticas de ácido úrico não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos em nenhuma fase do experimento. O aumento nos níveis de ácido úrico no grupo de aves deficientes em metionina pode ser devido ao desequilíbrio de aminoácido resultando no aumento da produção de ácido úrico para posteriormente serem excretados (Donsbough *et al.*, 2010). Por outro lado, Machín *et al.* (2004) concluíram que o aumento nos níveis de ácido úrico em aves submetidas a dietas deficientes em metionina é um mecanismo compensatório, que tem por finalidade diminuir o estresse oxidativo causado pela deficiência na síntese de enzimas, como a GSH.

Os dados morfológicos confirmaram que todas as fontes de Met tiveram efeitos benéficos no desenvolvimento de TGI em comparação com o grupo basal. A melhoria na relação Vilo / Cripta aos 21 dias nas aves que foram suplementadas com DLM ou DLM + AO, pode ser devido ao fornecimento imediato de L-Met, já que estimula diretamente a proliferação celular, a síntese proteica e a formação de potentes antioxidantes – como a taurina ou GSH, por exemplo – que protegem as vilosidades dos danos causados pelo estresse oxidativo no intestino delgado (Shoveller *et al.*, 2005). Além disso, Zhag *et al.* (2018) relataram que as aves apresentaram limitações na conversão de D-HMTBA em L-Met devido à baixa atividade de D-2-hidroxi ácido desidrogenase (D-HADH) em comparação com L-2-hidroxi ácido oxidase (L-HAOX) e D-aminoácido oxidase (D-AAOX). Aos 42 dias todas as aves suplementadas com metionina exibiram melhor relação Vilo / Cripta. Esse resultado pode ser devido ao amadurecimento do sistema enzimático encarregado da transformação D-HMTBA e L-HMTBA em L-Metionina. Ademais, a natureza ácida da HMTBA inibe a contaminação bacteriana patogênica e promove o crescimento de bactérias benéficas, melhorando o desenvolvimento intestinal (Vázquez-Añón *et al.* 2017).

Os resultados demonstram que DLM e HMTBA possuem a capacidade de melhorar o desempenho das aves. No entanto, DLM e DLM + AO exibiram uma maior bioeficácia quando comparadas com HMTBA representada em melhores ganhos de peso e conversão alimentar. Neste estudo, a bioeficácia relativa de HTMBA comparados com os da DL-metionina foi de 58%. Por outro lado, pode-se concluir que a deficiência de Met produz uma redução na atividade de enzimas antioxidantes e um aumento na peroxidação lipídica, prejudicando o desenvolvimento de órgãos, tais como o intestino. Por último, o uso do ácido orgânico (ácido láctico) aumentou a bioeficácia da DLM.

REFERÊNCIAS

- Agostini, P., Dalibard, P., Mercier, Y., Van Der Aar, P. and Van Der Klis, J.D. (2015a) Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers. *Poultry Science* 95: 560-569.
- Antonia Albrecht,¹ Martin Hebel,¹ Céline Heinemann,¹ Ulrike Herbert,¹ Dennis Miskel,¹ Behnam Saremi,² and Judith Kreyenschmidt¹ Assessment of Meat Quality and Shelf Life from Broilers Fed with Different Sources and Concentrations of Methionine *Journal of Food Quality*, vol. 2019, Article ID 6182580, 10 pages, 2019.
- Bunchasak C. Role of dietary methionine in poultry production. *The J. of Poult.Sci.* 2009; 46(3):169-179.
- C. P. Sangali, L. D. G. Bruno, R. V. Nunes *et al.*, “Bioavailability of different methionine sources for broilers from 1 to 21 days old,” *Ciencia e Investigacion Agraria* , vol. 42, no. 1, pp. 7-8, 2015.
- Conde-Aguilera, J. A., Cholet, J. C., Lessire, M., Mercier, Y., Tesseraud, S., and Milgen, J. V. 2016. The level and source of free-methionine affect body composition and breast muscle traits in growing broilers. *Poult. Sci.* 95:2322–2331.
- Daria Murawska, Magdalena Kubińska, Michal Gesek. The Effect of Different Dietary Levels and Sources of Methionine on the Growth Performance of Turkeys, Carcass and Meat Quality. *Annals of Animal Science* 18(2) .
- Donsbough, A. L., Powell, S., Waguespack, A., Bidner, T. D., and Southern., L. L. 2010. Uric acid, urea, and ammonia concentrations in serum and uric acid concentration in excreta as indicators of amino acid utilization in diets for broilers. *Poult. Sci.* 89:287– 294.
- Dozier, W. A., and Y. Mercier. 2013. Ratio of digestible total sulfur amino acids to lysine of broiler chicks from 1 to 15 days of age. *J. Appl. Poult. Res.* 22:862–871.

- Gagliano, N., Dalle, D. I., Torri, C., Migliori, M., Grizzi, F., Milzani, A., Filippi, C., Annoni, G., Colombo, P., Costa, F., Ceva-Grimaldi, G., Bertelli, A., Giovannini, L. and Gioia, M. 2006. Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: a morphological biochemical and molecular study. *Toxicology* . 225:214–224.
- Geraert, P.-A., Graulet, P., Mercier, Y., Becker, P.M. and Van der Klis, J.D. (2005) The bactericidal effect of methionine hydroxyl analog. *Australian Poultry Science Symposium* 17.
- Huyghebaert, G. 1993. Comparison of DL-methionine and methionine hydroxy analog-free acid in broilers by using multiexponential regression models. *Br. Poult. Sci.* 34:351–359.
- Kaewtapee, C., Krutthai, N., Bunchasak, C. 2016. Effects of Supplemental Liquid DL-methionine Hydroxy Analog Free Acid in Diet on Growth Performance and Gastrointestinal Functions of Piglets *Asian-Australas J Anim Sci.* 29: 1166–1172.
- Lingens, G., and S. Molnar. 1996. Studies on metabolism of broilers by using ¹⁴C-labelled DL-methionine and DL-methionine hydroxy analog Ca-salt. *Arch. Anim. Nutr.* 49:113–124.
- Machín, M., M. F. Simoyi, K. P. Blemings, and H. Klandorf. 2004. Increased dietary protein elevates plasma uric acid and is associated with decreased oxidative stress in rapidly-growing broilers. *Comp Biochem. Physiol. B* 137:383–390
- Martin-Venegas, R., Soriano-Garcia, J.F., Vinardell, M.P., Geraert, P.A. and Ferrer, R. (2006) Oligomers are not the limiting factor in the absorption of DL-2-hydroxy-4- (methylthio) butanoic acid in the chicken small intestine. *Poultry Science* 85: 56-63.
- Nukreaw R., Bunchasak C., Markvichitr K., Choothesa A., Prasanpanich S., Loongyai W. Effects of methionine supplementation in low-protein diets and subsequent re-feeding on growth performance, liver and serum lipid profile, body composition and carcass quality of broiler chickens at 42 days of age. *The J. of Poult. Sci.* 2011; 48(4): 229-238.

Papatisiros, V. G., Katsoulos, P. D., Koutoulis, K. C., Karatzia, M., Dedousi, A., Christodoulopoulos, G. 2013 Alternatives to antibiotics for farm animals. CAB Rev Ag Vet Sci Nutr Res. 8:1–15.

Papatisiros, V. G., Katsoulos, P. D., Koutoulis, K. C., Karatzia, M., Dedousi, A., Christodoulopoulos, G. 2013 Alternatives to antibiotics for farm animals. CAB Rev Ag Vet Sci Nutr Res. 8:1–15.

Payne, R. L., Lemme, A., Seko, H., Hashimoto, Y., Fujisaki, H., Koreleski, J., Swiatkiewicz, S., Szczurek, W., Rostagno, H. (2006) Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. *Anim. Sci. J.* 77 : 427-439.

Rubin LL., Canal CW., Ribeiro AL., M., Kessler A., Silva L., Trevizan L., Viola T., Raber M., Goncalves TA., Kras R. Effects of methionine and arginine dietary levels on the immunity of broiler chickens submitted to immunological stimuli. *Brazilian J. of Poult. Sci.* 2007; 9(4):241-247.

Sandercock, D. A., Hunter, R. R., Nute, G. R., Mitchell, M. A. and Hocking, P. M. 2001. Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: Implications for meat quality. *Poult. Sci.* 80:418–425.

Sauer, N., Emrich, K., and Piepho, H. P. 2008. Meta-analysis of the relative efficiency of methionine-hydroxy-analogue-free-acid compared with DL- methionine in broilers using nonlinear mixed models. *Poult Sci.* 87:2023-2031.

Saunderson, C. L. 1991. Metabolism of methionine and its nutritional analogs. *Poult. Int.* 30:34–38.

Shoveller, A. K., Stoll, B. O., and Burrin, D. G. 2005. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J. Nutr.* 135:1609-1612.

- Summers, J. D., Spratt, D., and Atkinson J. L. 1992. Broiler weight gain and carcass composition when fed diets varying in amino acid balance, dietary energy, and protein level. *Poul. Sci.*, 71:263-273
- Vazquez-Anon, M., Bertin, G., Mercier, Y., Reznik, G., & Robertson, J. L. (2017). Review of the chemistry, metabolism, and dose response of two supplemental methionine sources and the implications in their relative bioefficacy. *World's Poultry Science Journal*, 73, 1–12
- Vazquez-Anon, M., Bertin, G., Mercier, Y., Reznik, G., & Robertson, J. L. (2017). Review of the chemistry, metabolism, and dose response of two supplemental methionine sources and the implications in their relative bioefficacy. *World's Poultry Science Journal*, 73, 1–12.
- Zelenka, J., Heger, J. Machander, V., Wiltafsky, M., Lestak, M. 2013. Bioavailability of liquid methionine hydroxy analogue-free acid relative to DL-methionine in broilers. *Acta Univ. agric. Silvic.Mendel. Brun.* 61:1513–1520.
- Zhan, X. A, Li, J. X, Xu, Z. R. and Zhao, R. Q. 2006. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. *Br. Poul. Sci.* 47: 576-580.
- Zhang, S., Gilbert, E. R., Noonan, K. J. T., Saremi, B., & Wong, E. A. (2018a). Gene expression and activity of methionine converting enzymes in broiler chickens fed methionine isomers or precursors. *Poultry Science*, 97, 2053–2063.
- ZHANG, S., WONG, E.A. and GILBERT, E.R. (2015) Bioavailability of different dietary supplemental methionine sources in animals. *Frontiers in Bioscience Elite* 7: 478-490.

APÊNDICE

Tabela 1 – Composição basal de dietas e máximo dos níveis de cada fonte de metionina na fase 1 (1-21 dias)

	Basal	99%DL-Met	99%DL-Met	
			OA	88% HMTBA
Ingredientes, kg/ton	Tto 1	Tto 2-6	Tto 7-11	Tto 12-16
Milho 7,8%	564.890	565.730	565.730	565.730
Farelo soja 46%	362.160	362.160	362.160	362.160
Oléo	31.710	31.710	31.710	31.710
Sal	5.060	5.060	5.060	5.060
Fosfato bicálcico 20%	9.770	9.770	9.770	9.770
Calcario	10.910	10.910	10.910	10.910
L-Treonina, 98%	0.280	0.278	0.278	0.278
L-Lisina, 54,6%	2.610	2.610	2.610	2.610
DL-Metionina, 99%	-	3.535	--	-
DL-Metionina , 99%	-	-	3.535	-
HMTBA, 88%	-	-	-	3.977
Caolin (Inerte)	10.000	6,470	2,500	6.030
Ácido Orgânico (Láctico)	-	-	3.977	-
Vit/Min/Bac/Salino	2.600	2.600	2.600	2.600
Fitase	0,010	0,010	0,010	0,010
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Nutrientes, %				
AME (kcal/kg)	3,050	3,050	3,050	3,050
CP	21.5	21.5	21.5	21.5
Lys, Dig	1.190	1.190	1.190	1.190
Met+Cys, Digestible	0.585	0.935	0.935	0.935
M+C/Lys	0.491	0.785	0.785	0.785
Na	0.22	0.22	0.22	0.22
Ca	0.85	0.85	0.85	0.85
NPP	0.43	0.43	0.43	0.43

¹Supplied per kg of diet : Vit. A 12,000 IU, Vit. D3 2,400 IU, Vit. E 40 mg, Vit. K 31.8 mg, Vit. B1 2.5 mg, Vit. B2 4.0 mg, Vit. B6 2.0 mg, Vit. B12 15 µg, Biotin 60 µg, Niacin 30 mg, Folacin 1.8 mg, Selenium 0.3 mg, Fe 80 mg, Zn 70 mg, Mn 70 mg, I 1 mg, Cu 10 mg, Salinomycin, 12%.

*Inert used to methionine supplementation.

Tabela 2. Composição basal de dietas e máximo dos níveis de cada fonte de metionina na fase 2 (22-42 dias)

	Basal	99%DL-Met	99% DL-Met OA	88% HMTBA
Ingredientes, kg/ton	Treat1	Treat 2-6	Treat 7-11	Treat 12-16
Milho 7,8%	614.750	614.750	614.750	614.750
Farelo soja 46%	310.940	310.940	310.940	310.940
Óleo	38.200	38.200	38.200	38.200
Sal	5.080	5.080	5.080	5.080
Fosfato bicálcico 20%	7.670	7.670	7.670	7.670
Calcário	9.750	9.750	9.750	9.750
L-Treonina,98%	0.5300	0.530	0.530	0.530
L-Lisina, 54,6%	1.357	1.357	1.357	1.357
DL-Metionina, 99%	-	3.535	--	-
DL-Metionina, 99%	-	-	3.535	-
HMTBA, 88%	-	-	-	3.977
Caolin (Inerte)	9,590	6.070	1.640	5.570
Ácido Orgânico (Láctico)	-	-	3.977	-
Vit/Min/Bac/Salinomicina	2.600	2.600	2.600	2.600
Fitase	0.010	0.010	0.010	0.010
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Nutrientes, %				
AME (kcal/kg)	3,150	3,150	3,150	3,150
CP	19.5	19.5	19.5	19.5
Lys, Dig	1.0	1.0	1.0	1.0
Met+Cys, Digestible	0.539	0.889	0.889	0.889
M+C/Lys	0.539	0.889	0.889	0.889
Na	0.220	0.220	0.220	0.220
Ca	0.750	0.750	0.750	0.750
NPP	0.380	0.380	0.380	0.380

¹Supplied per kg of diet :Vit. A 12.000 IU, Vit. D3 2400 IU, Vit. E 40 mg, Vit. K 31,8 mg, Vit. B1 2,5 mg, Vit. B2 4,0 mg, Vit.B6 2,0 mg, Vit. B12 15 µg, Biotina 60 µg, Niacin 30 mg, Folacin 1,8 mg, Selenium 0.3 mg, Fe 80 mg, Zn 70 mg, Mn 70 mg, I 1 mg, Cu 10 mg, Salinomicin, 12%.

*Inert used to methionine supplementation.

Tabela 3. Desenho experimental de aves e diferentes níveis de suplementação em dietas de 1-42 dias de idade.

Trat.	DL-Met	DL-Met + OA ^b	HMTBA	Repetições	Aves Por Repetição
1 NC ^a	---	---	---	6	17
2	0.0505%	---		6	17
3	0.1010%	---		6	17
4	0.1515%	---		6	17
5	0.3030%	---		6	17
6	0.3535%	---		6	17
7	---	0.0505% + 0.0568		6	17
8	---	0.100% + 0.1136		6	17
9	---	0.150% + 0.1704		6	17
10	---	0.300% + 0.3409		6	17
11	---	0.350% + 0.3977		6	17
12	---	---	0.0568%	6	17
13	---	---	0.1136%	6	17
14	---	---	0.1704%	6	17
15	---	---	0.3409%	6	17
16	---	---	0.3977%	6	17

^aCN = Control Negativo dieta deficiente em SID Met+Cys

^bAO = Ácido Orgânico = Ácido Lático (2-hydroxpropionic) con pKa de 3.68

Tabela 4 – Regressão exponencial múltipla do ganho de peso e conversão alimentar em frangos alimentados com diferentes fontes de metionina.

$Y = b_0 + b_1 * (1 - \exp(-(b_2 * X_1) + (b_2 * b_3 * X_2) + (b_2 * b_4 * X_3)))$					
Ganho de Peso 21d					
	b	SE	95% Conf. Lim.	Bioeficácia	r2
Basal	0.7571	0.0139	0.7295	0.7847	-
b1	0.2158	0.0144	0.1871	0.2444	-
DLM	13.7003	2.4324	8.8685	18.532	100%
DLM+AO	1.0679	0.1979	0.6748	1.461	107%
HMTBA	0.5045	0.0867	0.3323	0.676	50%
					72%
Conversão Alimentar 21d					
	b	SE	95% Conf. Lim.	Bioeficácia	r2
Basal	1.674	0.0226	1.6291	1.719	-
b1	-0.4074	0.0235	-0.454	-0.3608	-
DLM	12.6261	1.8637	8.9241	16.3281	100%
DLM+AO	1.5074	0.2513	1.0083	2.0065	151%
HMTBA	0.5758	0.0835	0.4099	0.7418	58%
					78%

Tabela 5 – Regressão exponencial múltipla do ganho de peso e conversão alimentar em frangos alimentados com diferentes fontes de metionina
$$Y = b_0 + b_1 * (1 - \exp(-(b_2 * X_1) + (b_2 * b_3 * X_2) + (b_2 * b_4 * X_3)))$$

Ganho Peso 22 a 42d						
	b	SE	95% Conf. Lim.		Bioeficácia	r2
Basal	1.8273	0.0291	1.7694	1.8852	-	
b1	0.3107	0.0306	0.25	0.3714	-	
DLM	16.3538	4.1936	8.0238	24.6838	100%	56%
DLM+AO	1.49	0.4786	0.5392	2.4407	149%	
HMTBA	0.3908	0.1022	0.1877	0.5939	39%	

Conversão Alimentar 22 a 42d						
	b	SE	95% Conf. Lim.		Bioeficácia	r2
Basal	1.9129	0.0205	1.8721	1.9537	-	
b1	-0.3151	0.0213	-0.3575	-0.2727	-	
DLM	14.0728	2.4048	9.296	18.8496	100%	72%
DLM+AO	1.7279	0.3712	0.9906	2.4652	173%	
HMTBA	0.5145	0.089	0.3377	0.6913	51%	

Tabela 6 – Efeitos das fontes e níveis de metionina no pH da moela e intestino delgado em frangos de corte aos 21 e 42 dias

Tratamentos	Moela		ID	
	21D	42D	21D	42D
	1 (BD)	3,01 a	3,27 a	6,64 a
5 (DLM)	2,89 a	2,93 a	6,44 a	6,12 ab
10 (DLM+AO)	2,27 b	2,25 b	5,72 b	5,77 b
15(HMTBA)	2,14 b	2,21 b	5,99 b	5,92 b
EPM	3,91	4,18	5,11	4,95
CV	4,37	4,03	5,40	4,62
Valor de P	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. DB = dieta basal; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% ácido láctico HMTBA= Metionina Hidroxianaloga

Tabela 7 – Efeitos das fontes e níveis de metionina na qualidade de carne em frangos de corte aos 21 dias.

Tratamentos	pH	L	a	b	FC
1	5,87	66,81	0,26	9,28	3,52 a
2	5,94	63,53	0,12	6,91	3,49 a
3	5,87	64,11	0,11	7,59	2,59 ab
4	6,00	66,24	0,02	8,84	2,07 b
5	5,77	62,73	-0,54	7,07	1,89 b
6	5,82	62,71	0,08	8,04	1,94 b
7	5,95	65,12	0,05	8,6	2,47 ab
8	5,89	63,72	-0,24	7,43	2,63 ab
9	5,98	64,12	0,28	7,75	1,99 b
10	5,80	62,92	0,23	8,24	1,82 b
11	5,82	51,86	-0,11	8,18	1,79 b
12	5,91	64,60	0,48	7,99	2,79 ab
13	5,92	63,90	0,38	7,88	2,55 ab
14	5,88	63,67	-0,01	7,05	2,56 ab
15	5,72	63,63	0,17	8,34	1,74 b
16	5,95	62,49	-1,05	6,54	1,87 b
EPM	0,121	0,977	0,3234	0,622	2,165
CV	2,51	2,64	13,4	13,79	19,60
Valor de P	0,6303	0,1423	0,2281	0,2475	<0,05

Means within a column with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$; $n = 6$.

1L* = luminosidade, a* = teor vermelho, b* = teor de amarelo, FC = Força de cisalhamento

Tabela 8 – Efeitos das fontes e níveis de metionina na qualidade de carne em frangos de corte aos 42 Dias

Tratamentos	pH	L	a	b	FC
1	5,68	50,76	6,96	17,66	5,01 a
2	5,67	52,05	7,25	19,09	3,66 ab
3	5,70	49,97	7,43	17,59	3,76 ab
4	5,69	50,57	5,86	16,57	3,03 b
5	5,72	51,46	6,47	18,52	3,82 b
6	5,68	52,74	6,44	20,70	2,74 b
7	5,75	49,70	7,32	18,38	3,59 ab
8	5,69	50,87	6,75	18,11	3,02 b
9	5,75	49,06	7,20	18,04	3,07 b
10	5,73	49,54	7,32	18,73	2,94 b
11	5,72	48,17	7,34	18,20	2,86 b
12	5,64	50,66	7,18	17,23	3,83 ab
13	5,78	48,75	7,38	17,97	3,44 ab
14	5,76	48,36	8,17	18,71	2,97 b
15	5,77	50,74	6,06	18,67	3,15 b
16	5,83	50,18	7,26	17,94	2,88 b
EPM	0,065	2,338	0,906	0,977	4,51
CV	1,39	5,70	15,80	9,27	19,32
Valor de P	0,3502	0,8263	0,6502	0,6128	<0,05

Means within a column with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$; n = 6.

1L* = luminosidade, a* = teor vermelho, b* = teor de amarelo, FC = Força de cisalhamento

Tabela 9 – Efeitos das fontes e níveis de metionina no status redox do intestino e fígado em frangos de corte (21D)

Tratamento	Proteína Total		LPO [hidroperóxidos]		GSH		SOD		CAT	
	(mg/mL)		(nmol. min-1.mg de proteína-1)		(µg/g de tecido)		(U/mg proteína)		(nmol.min-1.mg proteínas-1)	
	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado
1 (BD)	3,39	4,64	39,81 a	29,98 a	420,49 b	695,01 b	1381,93 b	1204,17 b	32,92 b	150,37 b
5 (DLM)	3,58	4,29	24,74 b	25,60 ab	669,21 a	1062,09 a	1926,54 a	2449,39 a	44,55 a	407,39 a
10 (DLM+AO)	2,10	4,21	24,03 b	21,73 b	668,99 a	1020,76 a	2223,01 a	2359,40 a	44,58 a	430,47 a
15 (HMTBA)	1,76	4,17	33,13 ab	24,96 ab	572,72 ab	894,63 ab	1864,96 a	2396,02 a	42,85 a	330,99 ab
SEM	0,58	0,48	1,74	1,11	15,31	47,43	161,18	125,03	3,04	24,60
CV	37,35	19,39	10,19	7,55	4,36	8,94	14,70	14,91	9,79	12,45
Valor de P	0,1427	0,8955	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. LPO = Peroxidação lipídica; GSH = glutatona peroxidase; SOD = Superóxido Dismutase; CAT = Catalase

2. DB = dieta basal; DLM = 0.30 % DI-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% ácido láctico HMTBA= Metionina Hidroxianaloga

Tabela 10 – Efeitos das fontes e níveis de metionina no status redox do intestino e fígado em frangos de corte (42D)

Tratamento	Proteína Total		LPO [hidroperóxidos]		GSH		SOD		CAT	
	(mg/mL)		(nmol. min-1.mg de proteína-1)		(µg/g de tecido)		(U/mg proteína)		(nmol.min-1.mg proteínas-1)	
	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado	Intestino	Fígado
1 (BD)	3,12	3,97	43,21 a	41,34 a	506,80 b	711,10 b	1605,91 b	1455,90 b	46,56 b	186,87 b
5 (DLM)	3,63	2,78	26,29 b	32,09 b	783,57 a	1027,37 a	2028,40 a	2382,89 a	73,34 a	417,97 a
10 (DLM+AO)	2,52	4,29	26,01 b	32,47 b	851,09 a	1282,12 a	2188,17 a	2551,28 a	74,13 a	408,54 a
15 (HMTBA)	4,80	3,10	25,43 b	31,78 b	855,22 a	1213,95 a	2113,15 a	2538,39 a	71,30 a	399,86 a
SEM	0,67	0,87	1,65	1,71	22,46	60,58	60,51	367,62	4,78	55,49
CV	33,31	42,95	9,50	8,59	5,26	10,40	5,09	27,59	11,10	24,44
Valor de P	0,1885	0,5978	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. LPO = Peroxidação lipídica; GSH = glutatona peroxidase; SOD = Superóxido Dismutase; CAT = Catalase

2. DB = dieta basal; DLM = 0.30 % DI-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% ácido láctico HMTBA= Metionina Hidroxianaloga

Tabela 11 – Ácido Úrico (UA) e Creatin Kinase (CK) níveis em frangos de corte 21 – 42 D

Tratamentos	UA (mg/dl) 21 D	CK (U/L) 21 D	UA (mg/dl) 42 D	CK (U/L) 42 D
1 (BD)	9,38	15,15 a	7,28	82,07 a
5 (DLM)	10,55	3,34 c	5,93	41,88 b
10 (DLM+AO)	9,21	3,59 c	6,93	39,36 b
15(HMTBA)	8,98	9,65 b	7,05	43,18 b
CV	24,08	38,04	18,96	36,37
SEM	0,93	1,23	0,52	3,76
P valor	0,6519	<0,05	0,3082	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1. A.U = Ácido Úrico CK = Creatin kinase

2. DB = dieta basal; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% ácido láctico; HMTBA= Metionina Hidroxianaloga

Tabela 12 – Efeitos das fontes e níveis de metionina na morfologia jejuno em frangos de corte

Tratamentos	21 d			42 d		
	Altura do Vilo (μm)	Profundidade de Cripta (μm)	Relação Cripta Vilo ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)	Altura do Vilo (μm)	Profundidade de Cripta (μm)	Relação Cripta Vilo ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$)
1 (BD)	1091 c	282 b	3,87 c	783 c	215	3,64 b
5 (DLM)	1242 a	261 a	4,76 a	997 b	213	4,68 a
10 (DLM+AO)	1287 a	265 a	4,86 a	1104 a	225	4,91 a
15(HMTBA)	1163 b	268 a	4,34 b	1076 ab	224	4,80 a
CV	9,78	10,74	5,89	8,76	5,58	9,74
SEM	4,41	5,72	6,55	4,25	4,93	5,71
P valor	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,087	<0,05

a–c Means in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

1.DB = dieta basal; DLM = 0.30 % DL-Met; DLM+AO = 0.30% DL-Met + 0.34% ácido láctico

HMTBA= Metionina Hidroxianaloga

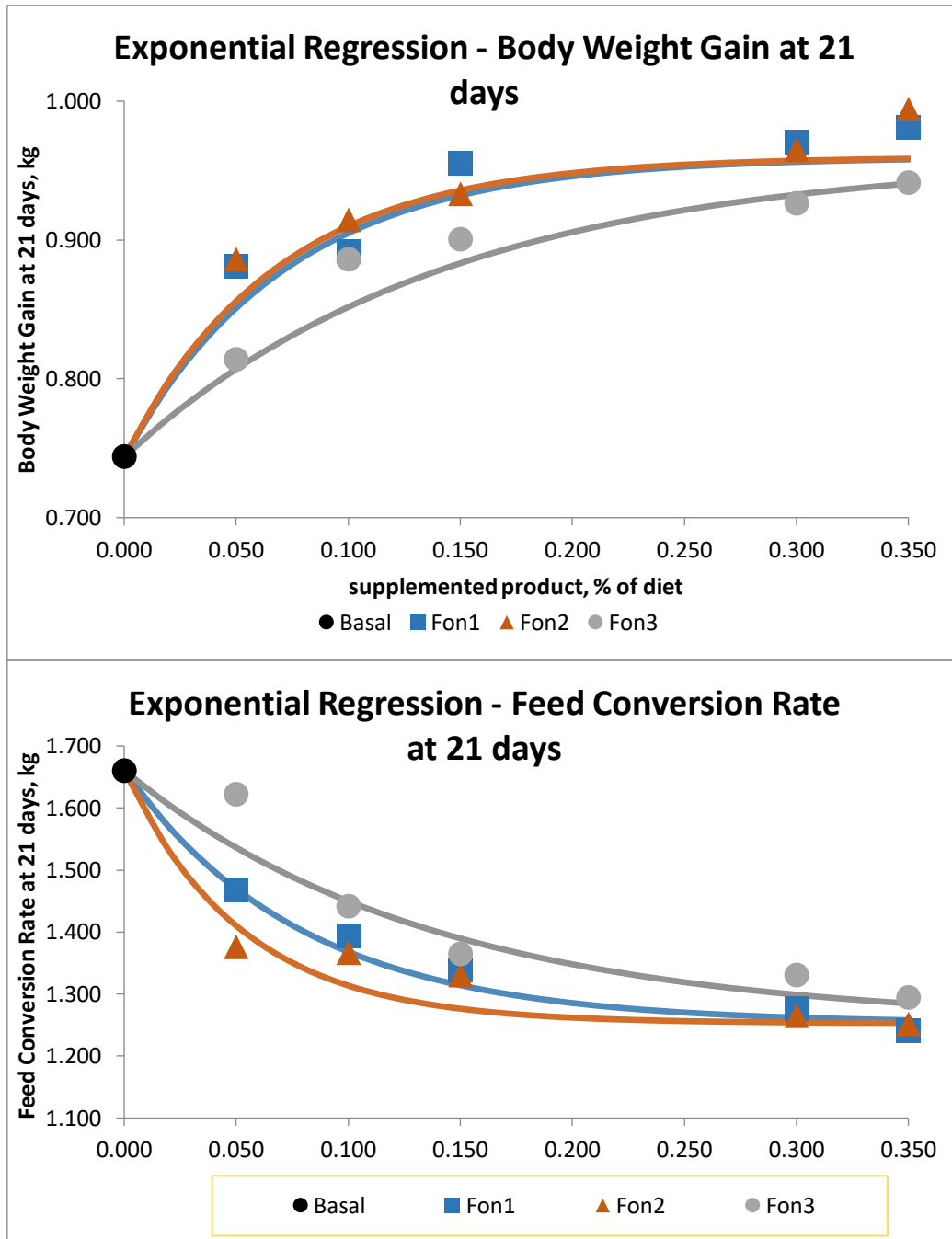


Figure 1. Exponential Regression - Feed Conversion and Body Weight at 21 Days.

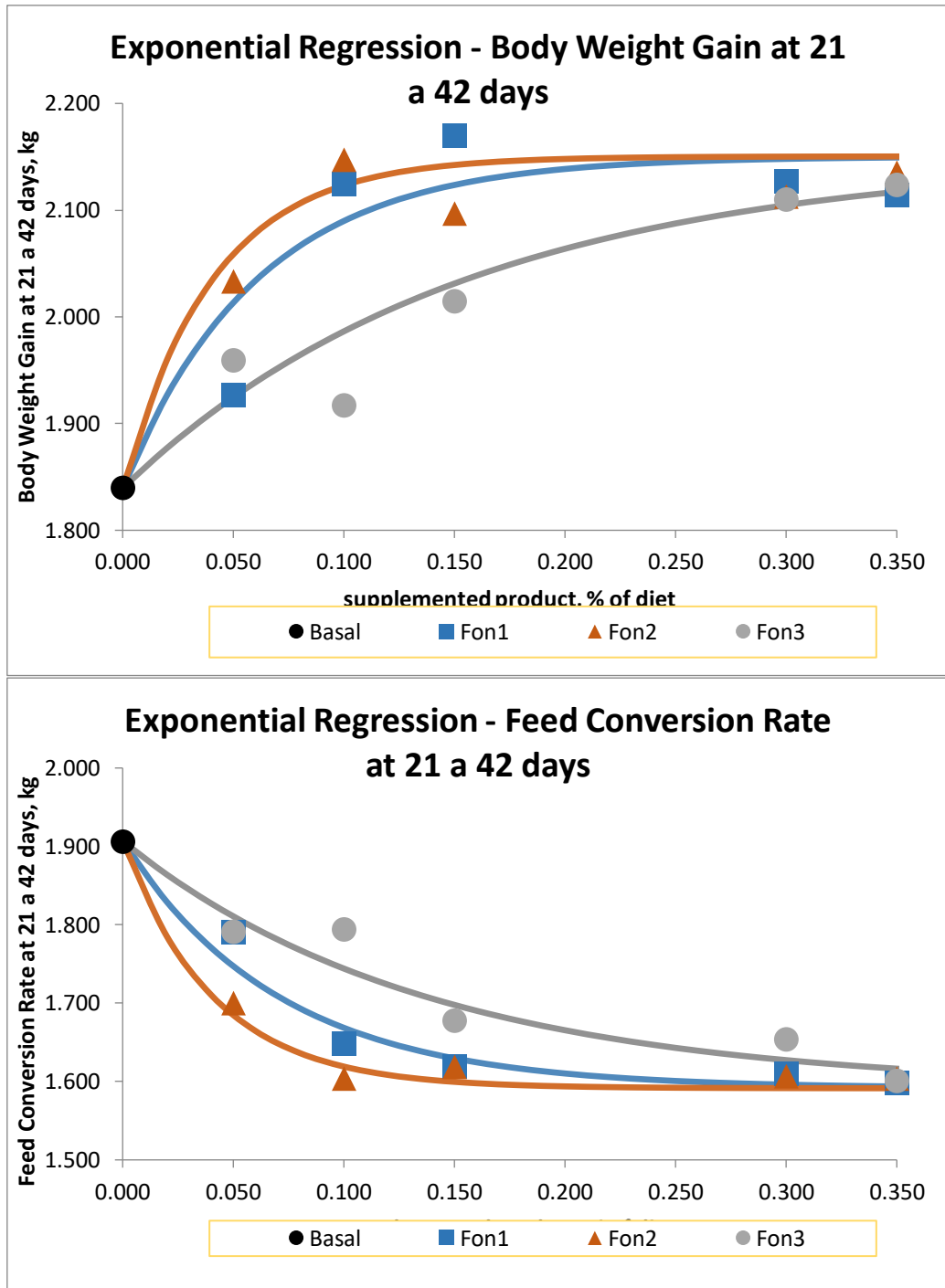


Figure 2. Exponential Regression - Feed Conversion and Body Weight at 42 Days.