

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BthTx-I E SEU USO
COMO MELHORADOR DE DESEMPENHO ALTERNATIVO
NA AVICULTURA**

Ana Carolina Portella Silveira

Orientadora: Prof. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

Uberlândia, Minas Gerais

Julho de 2013

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BthTx-I E SEU USO
COMO MELHORADOR DE DESEMPENHO ALTERNATIVO
NA AVICULTURA**

Ana Carolina Portella Silveira

Orientadora: Prof. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

Uberlândia, Minas Gerais

Julho de 2013

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BthTx-I E SEU USO COMO MELHORADOR DE DESEMPENHO ALTERNATIVO NA AVICULTURA

Ana Carolina Portella Silveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo
(Orientadora)

Examinadores:

Dr. Carlos Roberto Prudêncio
Dr. Fábio de Oliveira
Dr. Mário Sérgio Rocha Gomes
Dr. Rone Cardoso

Data da Defesa: 19 / 07 / 2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

Prof. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S587a Silveira, Ana Carolina Portella, 1982-
2013 Atividade antimicrobiana da BthTx-I e seu uso como melho-
rador de desempenho alternativo na avicultura / Ana Carolina
Portella Silveira. -- 2013.
91 f. : il.

Orientadora: Maria Inês Homsí Brandeburgo.
Coorientador: Robson Carlos Antunes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha -
- Teses. 3. Agentes antiinfeciosos - Teses. 4. Ave - Criação -
Teses. I Brandeburgo, Maria Inês Homsí. II. Antunes, Robson
Carlos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

DEDICATÓRIA

Aos animais que, ao longo da minha vida, me fizeram escolher e amar a Medicina Veterinária e, em especial, aos que doaram a vida para a realização deste e outros trabalhos.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Maria Inês Homs Brandeburgo por aceitar o desafio de me orientar com muita disposição, alegria, boa vontade e profundo conhecimento.

Ao professor e co-orientador Dr. Robson Carlos Antunes por toda ajuda, otimismo e por acreditar em mim e ser um exemplo de profissional a seguir.

Aos professores Dr. Antônio Vicente Mundim; Dr^a. Daise Aparecida Rossi; Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães; Dr. Evandro de Abreu Fernandes; Dr. Geraldo Batista de Melo; Dr. Humberto Eustáquio Coelho; Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro; Dr^a. Mara Regina Bueno Mattos Nascimento; Dr. Marcelo Emílio Beletti e Dr^a. Tatiana Carla Tomiosso por disponibilizarem seus laboratórios, seus conhecimentos e toda infraestrutura para a realização deste estudo.

Às professoras do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Dr^a. Veridiana de Mello Rodrigues Ávila, Dr^a. Amélia Hamagushi, Dr^a. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama e Dr^a. Renata Santos Rodrigues que me ajudaram sempre que necessário. E a todos os colegas pelas colaborações, principalmente, Mário Sérgio da Rocha Gomes, Letícia Eulálio Castanheira e Daiana Silva Lopes pela participação direta na tese.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica, em especial aos Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, Madson Caetano e Tianinha, que sempre atenderam minhas solicitações com presteza.

Aos colegas Régis Kamimura, Carolina Magalhães Caires Carvalho, Roberta Torres de Melo, Letícia Rísoli Coelho, Edison Magalhães, Luiz Fernando Barbaresco, Camila Perdoncini Carvalho, Bernardo José Rezende e Julyana Machado pela participação fundamental nos experimentos.

Aos técnicos/funcionários Hugney dos Santos, Rivaldo, Ester Borges e Fabrício Araújo pelas importantes colaborações, cada um em sua especialidade.

Às amigas Marina Meirelles, Thaís Isabel e Isabela Pacheco por todo carinho, diversão, força e incentivo ao longo desses anos. Em especial a amiga Sarah Gimenes por me acompanhar, muitas vezes até a madrugada, no laboratório; por me ensinar tanto e auxiliar em, literalmente, todas as etapas desse trabalho.

À amiga Larissa Maluf pelo auxílio “tecnológico” neste e em outros trabalhos.

À minha família, principalmente, meus pais Julio e Lu e meu marido Paulo Freitas por todo apoio dado, moral e financeiro, que me permitiram concluir mais essa etapa.

À FAPEMIG pela bolsa de estudos concedida.

E a todos que contribuíram indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	01
CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
1. Química de Produtos Naturais	05
2. Serpentes	06
2.1 <i>Família Viperidae</i>	06
2.1.1 <i>Gênero Bothrops</i>	07
2.1.1.1 <i>Bothrops jararacussu</i>	07
3. Peçonhas de serpentes	08
3.1 <i>Peçonhas de serpentes botrópicas</i>	09
4. Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes	09
4.1 <i>Bothropstoxina I (BthTx-I)</i>	12
5. Atividade antimicrobiana de peçonhas de serpentes	13
5.1 <i>Atividade antimicrobiana de fosfolipases A₂</i>	17
6. Microbiota intestinal de frangos de corte	20
6.1 <i>Salmonela enteritidis</i>	20
6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
6.3 <i>Escherichia coli</i>	21
6.4 <i>Enterococcus faecalis</i>	22
7. Avicultura industrial e melhoradores de desempenho	22
Referências	27
CAPÍTULO II – ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BthTx-I: PERSPECTIVES IN AVICULTURE	40
1. Introduction	42
2. Materials e methods	43
2.1 <i>Snake venoms</i>	43
2.2 <i>Bacteria</i>	43
2.3 <i>Antimicrobial activity by disc-diffusion of snake venom</i>	44
2.4 <i>Antimicrobial activity by broth microdilution of fractions and Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)</i>	44
2.5 <i>Fractioning of the B. jararacussu venom</i>	45
2.6 <i>Electrophoresis (PAGE) in native conditions</i>	45

2.7 Cell viability	46
2.8 Statistical analysis	46
3. Results	47
4. Discussion	52
5. Conclusions	55
References	55
CAPÍTULO III – BthTx-I COMO MELHORADOR DE DESEMPENHO ALTERNATIVO EM FRANGOS DE CORTE	60
1. Introdução	62
2. Material e métodos	63
2.1 Local e periodo de realização	63
2.2 Bothropstoxina I (BthTx-I)	63
2.3 Animais	64
2.4 Delineamento experimental	64
2.5 Avaliação do ambiente térmico	64
2.6 Desafio ambiental	65
2.7 Arraçamento e tipo da ração	65
2.8 Abate	66
2.9 Parâmetros avaliados	67
2.9.1 Desempenho zootécnico	67
2.9.2 Análise bromatológica	67
2.9.3 Parâmetros microbiológicos	68
2.9.4 Análise morfométrica da mucosa do intestino delgado	68
2.9.4.1 Porcentagem de células caliciformes por área delimitada	70
2.9.5 Bioquímica sérica	70
2.9.6 Histopatologia do fígado e rim	71
2.10 Análises estatísticas	71
3. Resultados e discussão	71
3.1 Desempenho zootécnico	71
3.2 Caracterização do ambiente térmico	74
3.3 Avaliações microbiológicas	76
3.4 Histomorfometria intestinal	78
3.4.1 Porcentagem de células caliciformes	79

3.5 <i>Bioquímica sérica</i>	80
3.6 <i>Histopatologia do fígado e rim</i>	83
4. Conclusão	83
Referências	83
Anexo	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – área de mucosa
AMBIC – bicarbonato de amônio
ANOVA – Análise de variância
ALT – alanina aminotransferase
AST – aspartato aminotransferase
ATCC – *American Type Culture Colection*
B. alternatus – *Bothrops alternatus*
B. asper – *Bothrops asper*
B. jararaca – *Bothrops jararaca*
B. jussu – *Bothrops jararacussu*
B. moojeni – *Bothrops moojeni*
B. pauloensis – *Bothrops pauloensis*
BHI – *brain heart infusion*
BthTx-I – Bothropstoxina-I
C – núcleo polissacarídeo
CA – conversão alimentar
C.d.terrificus – *Crotalus durissus terrificus*
CFU – *colony-forming unit* (Unidade Formadora de Colônia - UFC)
CM – carboximetil
CR – consumo de ração
CS – superfície celular
EE – extrato etéreo
E.C. – *enzyme commission*
FBS – fetal bovine serum
FDA – *Food and Drugs Administration*
FUNASA – Fundação Nacional Saúde
GGT – gama glutamil transferase
GP – ganho de peso
GPD – ganho de peso diário
GPMD – ganho de peso médio diário
HE – hematoxilina e eosina

INCQS – Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
LA₍₁₎ – ácido lipoproteico
LA₍₂₎ – lipídeo A
LAAO – L-aminoácido oxidase
LPS - lipopolissacarídeo
MC – membrana citoplasmática
ME – membrana externa
MIC – *minimal inhibitory concentration* (Concentração Inibitória Mínima - CIM)
MS – matéria seca
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
O – polissacarídeo O-específico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAGE – *polyacrylamide gel electrophoresis*
PA – puro para análise
PB – proteína bruta
PBS – *phosphate buffered saline*
PC – fosfatidilcolina zwitteriônico
PE – fosfatidil etanolamina
PG – peptidoglicano
pH – potencial hidrogeniônico
PLA₂ – fosfolipase A₂
PPP – proteína espaço periplasmático
PR – lipoproteína
PS – fosfatidil serina
Px – pré mix
RC – rendimento de carcaça
RCP – rendimento de cabeça e pescoço
RPOP – rendimento de peito com osso e pele
RS – rendimento de sobrecoxa
SAR – relação estrutura atividade
SDS – dodecil-sulfato de sódio
SEM – *standard error of the mean*
SIM – Serviço de Inspeção Municipal

T – proteína de transporte

THI – Índice de Temperatura e Umidade

UBABEF – Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango

U/L – unidades por litro

UV/IFCC – ultravioleta/*International Federation of Clinical Chemistry*

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura típica de PLA₂s das classes I e II com as principais alças e hélices indicadas (DELANO, 2002 apud MELIM, 2009) – **Página 11**

Figura 2 – Estrutura tridimensional da BthTx-I nativa (FERNANDES et al., 2010) – **Página 13**

Figura 3. Esquema ilustrativo das diferenças na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. PG: peptidoglicano; MC: membrana citoplasmática; LA₍₁₎: ácido lipoproteico; CS: superfície celular; LPS: (O: polissacarídeo O-específico; C: núcleo polissacarídeo; LA₍₂₎: lipídeo A); PR: lipoproteína; PPP: proteína espaço periplasmático; T: proteína de transporte; ME: membrana externa. Adaptado de Aragão (2005) – **Página 16**

CAPÍTULO II

Figure 1. Antibacterial activity in disk-difusion assay: (A) *B. jararacussu* (B) *B. alternatus* (C) *B. moojeni* (D) *B. pauloensis* (E) *B. jararaca* (F) *C. d. terrificus*. *S. aureus* (■); *S. enteritidis* (▣); *E. coli* (▤). The values represent mean ± SEM of independent assay realized in triplicate. – **Página 47/48**

Figure 2. Chromatography in CM-Sepharose (20 x 2 cm) balanced in ammonium bicarbonate buffer 0.05 M and pH 7.8 of 200 mg of *Bothrops jararacussu* venom. The sample was eluted in continuous gradient up to 0.5 M of the same buffer. Fractions of 2.0 mL/tube were collected at room temperature and absorbance was read at 280 nm. – **Página 49**

Figure 3. Broth Microdilution Antibacterial Assay of fractions of *B. jararacussu*: (A) CM1 (B) CM2 (C) CM3 (D) CM4 (E) CM5 (F) CM6. *S. aureus* (●); *S. enteritidis* (▲); *E. coli* (■). The values represent mean \pm SEM of independent assay realized in duplicate. – **Página 49/50**

Figure 4. Electrophoresis in polyacrylamide gel (12%) in native conditions of the CM6 fraction obtained from chromatography in CM-sepharose: 1- *Bothrops jararacussu* venom 2- CM6 fraction. Flow time of 57 min at 20 mA. The gel was colored with Coomassie Brilliant Blue R-250 at 2.5% for 10 min and then discolored in acetic acid 10%, ethanol 30%, and deionized water. – **Página 51**

Figure 5. Cytotoxic effect of different concentrations of BthTx-I on tEnd cells: (A) at 6h. (B) at 24h. The graph presents mean \pm SEM. C- Negative control; C+ Positive control – **Página 51**

CAPÍTULO III

Gráfico 1. Índice de temperatura e umidade no ambiente de criação dos frangos de corte de 21 a 28 dias de idade e os limites inferior e superior de conforto térmico definidos por Abreu e Abreu (2001) – **Página 75**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Minimum inhibitory concentration, in mg/mL, of venoms from snakes of the *Viperidae* family for inhibition of *S. aureus*, *S. enteritidis*, and *E. coli* growth –

Página 48

Table 2. Minimum inhibitory concentration, in mg/mL, of fractions of *B. jararacussu* venom for *S. aureus*, *S. enteritidis*, and *E. coli* growth inhibition – **Página 50**

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores ideais de temperatura, umidade relativa do ar e do índice de temperatura e umidade (THI), em função da idade das aves, segundo Abreu e Abreu (2001) – **Página 65**

Tabela 2. Composição da dieta experimental para frangos de corte de 21 a 28 dias – **Página 66**

Tabela 3. Valores médios de ganho de peso corporal (GP) (g), ganho de peso médio diário (GPMD) (g), consumo de ração (CR) (kg) e a conversão alimentar (CA) no período de 21 a 28 dias de idade dos frangos de corte em função dos diferentes tratamentos – **Página 72**

Tabela 4. Valores médios de rendimento de carcaça (RC), rendimento de cabeça e pescoço (RCP), rendimento de peito com osso e pele (RPOP) e rendimento de sobrecoxa (RS), no período de 21 a 28 dias de idade dos frangos de corte em função dos diferentes tratamentos – **Página 73**

Tabela 5. Composição percentual da carcaça de frangos de corte aos 28 dias em Matéria Seca (MS), Extrato Etéreo (EE) e Proteína Bruta (PB) – **Página 73**

Tabela 6. Valores médios, em gramas (g), dos pesos das vísceras proventrículo, moela, fígado, coração e intestino delgado e medida, em centímetros, do intestino

delgado aos 28 dias de idade dos frangos de corte em função dos diferentes tratamentos – **Página 74**

Tabela 7. Contagem de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (log 10) na cama de frango reutilizada, aos 21 e aos 28 dias de idade de frangos de corte submetidos a diferentes tratamentos – **Página 77**

Tabela 8. Contagem de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (log 10) em swabs cloacais, aos 21 e aos 28 dias de idade de frangos de corte submetidos a diferentes tratamentos – **Página 77**

Tabela 9. Médias da área de mucosa (AM) (μm^2) calculado pelo método de Kisielinski et al. (2002) dos segmentos duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte de 28 dias submetidos a diferentes tratamentos – **Página 79**

Tabela 10. Porcentagem de células calciformes por área delimitada nos segmentos duodeno, jejuno e íleo do intestino delgado de frangos de corte submetidos a diferentes tratamentos – **Página 80**

Tabela 11. Valores médios de parâmetros bioquímicos séricos (Ureia (U/L), Ácido Úrico (mg/dL), Albumina (g/dL), Globulinas (g/dL), Proteínas Totais (g/dL), Relação Albumina/Globulina, GGT (U/L), AST (U/L), ALT (U/L) e Creatinina (mg/dL) de frangos de corte aos 28 dias de idade, submetidos a diferentes tratamentos – **Página 81**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes peçonhas da família *Viperidae* e selecionar uma proteína daquela com melhor potencial para o uso como melhorador de desempenho na produção de frangos de corte. Avaliou-se peçonhas de *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* da família *Viperidae* frente bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e as gram negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* pelos métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo. A peçonha de *B. jararacussu* apresentou os melhores resultados e a BthTx-I, uma fosfolipase A₂ lys 49 oriunda desta peçonha, foi a proteína escolhida para avaliação *in vivo* como melhorador de desempenho alternativo por meio de parâmetros zootécnicos, microbiológicos, bioquímicos e histológicos. Utilizou-se 84 frangos de corte dos 21 aos 28 dias, divididos em três tratamentos sendo: um com inclusão de bacitracina de zinco na ração, outro com a adição de BthTx-I e o terceiro sem melhorador de desempenho. Microbiologicamente, a BthTx-I diminuiu a população microbiana em relação aos demais grupos nos swabs cloacais e não alterando o desempenho zootécnico, composição química das carcaças, bioquímica sérica e histomorfometria intestinal. Assim, concluiu-se que, a BthTx-I conseguiu atuar em nível intestinal, diminuindo a carga microbiana de bactérias potencialmente patogênicas sem causar lesões musculares, renais e hepáticas nos frangos.

Palavras-chave: Avicultura; *Bothrops jararacussu*; Fosfolipases A₂; Peçonhas de serpentes; Promotor de crescimento

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of venoms of *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, and *Crotalus durissus terrificus* of the Viperidae family of Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* and Gram-negative *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. The aim was to identify the fraction of venom showing activity. The Mueller-Hinton Agar disc-diffusion and broth microdilution methods were used according to standard techniques. The *B. jararacussu* venom showed the best results, and Bothropstoxin-I (BthTx-I), a Lys49 phospholipase A₂ from this venom, was chosen for evaluation as an alternative performance growth factor using broilers and microbiological, biochemical, and histological parameters. We used 84 broilers aged 21 and 28 days divided into three feed treatments; one diet included bacitracin zinc (positive control), a second had the addition of BthTx-I, and a third contained no additives (negative control). Bacterial counts of litters and cloacal swabs of broilers were tested; BthTx-I was found to decrease the microbial population in cloacal swabs in relation to other groups without altering body weight or the chemical composition of carcasses or causing changes in serum biochemistry, intestinal morphology, and histopathology of livers and kidneys of animals. Thus, BthTx-I could act at the intestinal level, reducing the microbial load of potentially pathogenic bacteria without causing muscle, liver, and kidney lesions in broilers.

Keywords: Aviculture; *Bothrops jararacussu*; Phospholipases A₂; Snake venom; Growth performance

Apresentação

Os agentes bacterianos comumente utilizados no tratamento de infecções vêm sendo adicionados, em subdoses, às dietas de frangos de corte como melhoradores de desempenho. Acredita-se que a ação benéfica desses compostos é resultado de uma alteração seletiva na microbiota intestinal, por meio do controle do crescimento exarcebado e indesejado de determinadas populações microbianas secretoras de substâncias tóxicas em favor de bactérias benéficas. Ao evitar doenças subclínicas e diarreias, as aves conseguem manifestar melhor o seu potencial genético, aliados a nutrição e manejo adequados.

Porém, há um movimento mundial para banir o uso dos melhoradores de desempenho na produção animal, pois são considerados um fator de risco à saúde humana pela possibilidade da presença de resíduos nos produtos de origem animal destinados a alimentação e indução da resistência cruzada de bactérias patogênicas em humanos. Tais restrições têm limitado a utilização dos produtos tradicionais e, principalmente, a comercialização da carne para outros países. O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, sendo a atividade de extrema importância econômica para o país. Assim, a busca por alternativas torna-se essencial para atender a demanda e manter a viabilidade da cadeia produtiva.

As peçonhas de serpentes são uma fonte natural de compostos farmacologicamente ativos, responsáveis por uma diversidade de alterações metabólicas na presa. Estudos da variedade e do perfil de expressão de seus componentes e a descoberta de toxinas são de grande importância na elaboração de novas drogas. Assim, as peçonhas de serpentes e, em especial, as fosfolipases A_2 são boas candidatas a melhoradores de desempenho alternativos, já que, além de comprovada atividade antimicrobiana, são de constituição proteica e assim, seriam metabolizados pelo organismo não deixando resíduos nas carnes.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG (INGEB-UFU), sendo dividida em três capítulos.

O capítulo I é uma revisão da literatura envolvendo aspectos gerais sobre as serpentes e a composição de suas peçonhas, dando enfoque principal à atividade antimicrobiana encontrada nas mesmas, devido a sua importância nesta tese. Além disso, discorre sobre a relevância dos melhoradores de desempenho dentro da avicultura contemporânea.

O capítulo II apresenta um artigo sobre a busca por uma proteína de melhor atividade antimicrobiana dentre as peçonhas de serpentes da família *Viperidae* e seu potencial como melhorador de desempenho na avicultura, cujo título é "*Antimicrobial activity of BthTx-I : Perspectives in aviculture*".

O capítulo III faz uso da proteína escolhida (BthTx-I) como um melhorador de desempenho alternativo em frangos de corte e avalia os resultados de desempenho zootécnico, histológicos, microbiológicos e bioquímicos, com o título "*BthTx-I como melhorador de desempenho alternativo em frangos de corte*".

Capítulo 1 - Fundamentação Teórica

1. Química de Produtos Naturais

O mercado farmacêutico mundial deve movimentar cerca de 1,3 trilhão de dólares até 2020 (ALBUQUERQUE, 2007) e, aproximadamente 25% das prescrições realizadas nos Estados Unidos, durante os últimos 25 anos, estavam relacionadas a medicamentos que continham princípios ativos de origem natural ou semi-sintética, sendo cerca de 13% relativas a medicamentos de fontes microbianas e 2,7% de origem animal. Deste modo, é possível compreender a importância dos produtos naturais, de quaisquer origens, como fonte para descoberta de novos fármacos (NEWMANN; CRAGG, 2007; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As análises de novos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) e por entidades reguladoras de outros países, no período de 1983 a 1994, indicaram que os medicamentos recomendados para tratamento de doenças infecciosas e do câncer atingiram 520 novos medicamentos com este perfil terapêutico no período, dos quais 61% na classe dos antineoplásicos e 78% dos medicamentos antibacterianos eram de origem natural (NEWMANN; CRAGG, 2007).

O interesse pelo estudo das características químicas e funcionais de toxinas isoladas de peçonhas de serpentes não é somente pela sua relevância no envenenamento, mas também pela possível utilização como instrumentos de pesquisa para a obtenção de fármacos, haja vista a riqueza de enzimas, toxinas e compostos biologicamente ativos e a grande diversidade de suas ações (IZIDORO, 2007).

Pesquisas de desenvolvimento de potenciais produtos farmacêuticos nesta área são promissoras e com relevância, destacam-se os trabalhos da descoberta de um peptídeo potencializador da bradicinina liberado pela peçonha de *Bothrops jararaca*, que possibilitou o desenvolvimento do Captopril®, um medicamento anti-hipertensivo (FERREIRA, 2000; ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949).

2. Serpentes

No Brasil, os termos cobra e serpente são utilizados indiscriminadamente. A palavra serpente deriva do latim *serpens* (*serpens* + *antis*), que significa rastejante, quem se arrasta. E o termo cobra origina-se do latim *colubra*. Na Índia, cobra era utilizada para a *Naja tripudians*, animal denominado cobra-de-chapéu ou capelo, uma referência à acentuada dilatação na região nugal quando o animal está verticalizado (ROMANO-HOGE, 1990). Em outras línguas, a palavra correspondente a “cobra” é utilizada para nomear apenas as do gênero *Naja* (FONSECA, 1949). Em termos acadêmicos, portanto, as cobras seriam apenas as najas, que não existem no país. Com a utilização desse critério, conclui-se que no Brasil existem apenas serpentes (SANDRIM; PUORTO; NARDI, 2005).

Estão classificadas no Reino *Animalia*, Filo *Chordata*, Classe *Reptilia*, Ordem *Squamata* e Subordem *Ophidia* e podem ser divididas em peçonhentas e não peçonhentas. As peçonhentas apresentam um par de dentes especializados nos dois ossos maxilares, com os quais inoculam a peçonha para matar ou imobilizar a presa e iniciar a digestão. Enquanto que, nas não peçonhentas as presas estão ausentes e a peçonha é utilizada apenas para auxiliar na digestão dos alimentos (BARRAVIERA, 1999; CARDOSO et al, 2003).

No mundo, existem cerca de 3.395 espécies distintas de serpentes (UETZ, 2012). Destas, apenas 441 (12,98%) são peçonhentas e distribuídas, conforme suas características morfológicas, em cinco famílias: *Atractaspididae*, *Colubridae*, *Elapidae*, *Hydrophyidae* e *Viperidae* (BARRAVIERA, 1999; WARRELL, 2012). Já no Brasil, até dezembro de 2012, foram catalogadas 424 táxons (386 espécies + 38 subespécies) de serpentes, sendo encontradas apenas duas famílias peçonhentas: *Elapidae* e *Viperidae* (BÉRNILS; COSTA, 2012).

2.1 Família *Viperidae*

Na família *Viperidae* são 36 táxons (30 espécies + 6 subespécies) encontrados no Brasil, nas quais, 27 fazem parte do gênero *Bothrops* (jararacas), seis do *Crotalus* (cascavéis), dois do *Bothrocophias* e uma do *Lachesis* (surucucus) (BÉRNILS; COSTA, 2012; CARRASCO et al., 2012).

O aparelho peçonhífero desta família é considerado o mais eficiente de todos os répteis, sendo sua dentição denominada solenóglifa e caracterizada pela presença de grandes presas curvadas para dentro, que podem injetar profundamente a peçonha no corpo da presa (WARRELL, 1993; WHITE, 2000; BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

2.1.1 Gênero *Bothrops*

No Brasil, das 27 espécies do atual gênero *Bothrops* 13 delas são endêmicas no país (BÉRNILS; COSTA, 2012). São encontradas nas Américas Central e do Sul, sendo importantes causadoras de acidentes ofídicos no Brasil e em outros países onde se distribuem (Mc DIARMID; CAMPBELL; TOURÉ, 1999). De acordo com Pinho e Pereira (2001), apesar da baixa letalidade observada para o gênero *Bothrops*, acidentes com estes animais possuem alta incidência. Em 2011 foram registrados no Brasil 30.836 acidentes ofídicos, dos quais, 72,5% foram atribuídos a serpentes do gênero *Bothrops* com casos de maiores danos teciduais (BRASIL, 2012).

2.1.1.1 *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu*) (LACERDA, 1884)

Conhecida popularmente por jararacuçu é a espécie mais imponente do gênero *Bothrops*, podendo atingir até 1,8 m de comprimento. Os exemplares adultos, principalmente as fêmeas, têm a cabeça muito grande, as presas inoculadoras de peçonha com até 2,5 cm de comprimento e as glândulas peçonhentas muito desenvolvidas. É a espécie que produz e pode inocular a maior quantidade de peçonha, e certamente ocasiona acidentes graves (MELGAREJO, 2003).

É uma serpente do Sudeste e Sul do Brasil, que se distribui desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio Grande do Sul. Apresenta diferenciação de cor com a idade e com o sexo, os jovens têm tons castanhos e as fêmeas adultas geralmente apresentam manchas pretas sobre fundo amarelo e os machos sobre fundo castanho sendo também menores. É uma serpente muito prolífica, tendo,

em média, 40 filhotes por ninhada, que ocorrem normalmente em fevereiro e março (MELGAREJO, 2003).

3. Peçonhas de serpentes

Freitas (1991) recomenda que, didaticamente, o termo peçonha (*venom*, em inglês e *venin* em francês) seja usado para designar a secreção proveniente de glândula especializada associada ou não a uma estrutura inoculadora. Fonseca (1949) restringia o termo veneno para a secreção relacionada à inoculação passiva como, por exemplo, a ingestão oral e, a palavra peçonha se refere à secreção tóxica que pode produzir seu efeito por inoculação ativa, na qual é necessário que o animal tenha equipamento para executá-la e, portanto, os que não o possuem, mesmo produzindo a peçonha, não são classificados como peçonhentos. Baseado neste critério, serpentes peçonhentas seriam aquelas capazes de inocular ativamente a peçonha na vítima e as não-peçonhentas aquelas que produzem a substância tóxica e não apresentam a capacidade de inocular por não terem aparelho inoculador (PUORTO; FRANÇA, 2003).

As peçonhas das serpentes são produzidas em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biológica e farmacologicamente ativas (FRANÇA et al., 2008), cuja proporção e características variam entre as espécies conhecidas (TU, 1977). Constituem verdadeiros arsenais químicos com potencial capaz de atrair, paralisar e matar outros organismos. Elas podem apresentar várias funções, como: ataque e captura, digestão de alimentos, ou contribuir para a defesa do animal contra predadores ou agressores (AMARAL, 1977).

São uma rica fonte de pesquisas importantes para: melhor compreensão da função das substâncias isoladas no envenenamento; isolamento de uma ou mais substâncias ativas que podem apresentar efeitos farmacológicos de grande interesse para a pesquisa de medicamentos; e ainda verificar se existe algum princípio ativo, sintético ou natural que possa inibir a ação da peçonha e de algumas de suas proteínas isoladas (TICLI, 2006).

Cerca de 90% do peso seco da peçonha consiste de proteínas como metaloproteases, fosfolipases (PLAs), L-aminoácido oxidases (LAAOs), hialuronidases, serinoproteases, entre outras. Os componentes não proteicos podem ser divididos em orgânicos como aminoácidos livres, peptídios, nucleotídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, ânions e cátions (BARRAVIERA; PEREIRA, 1999) e inorgânicos como: cálcio, cobalto, potássio, zinco (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

Os principais componentes tóxicos são enzimas e outras proteínas que podem levar a diversos efeitos bioquímicos, imunológicos, farmacológicos e patológicos, podendo induzir lesões no tecido local, efeito sistêmico e morbidade ou morte relacionada com a toxicidade da peçonha (ROSENFELD, 1991). A quantidade e a qualidade da composição das peçonhas estão ligadas diretamente a diversos fatores como: espécie, idade, período do ano e alimentação (CARDOSO et al, 2003; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

3.1 Peçonhas de serpentes botrópicas

Os acidentes ofídicos causados por serpentes botrópicas são os mais importantes do ponto de vista epidemiológico, já que causam a maior parte das notificações do Brasil por ano (BRASIL, 2011). O envenenamento por estas serpentes se caracteriza por efeitos proteolíticos intensos, locais (inflamação, edema e necrose na região da picada com extenso dano tecidual local) e sistêmicos (hemorragias, desfibrinogenação e trombocitopenia, podendo levar à falência renal) (GUTIÉRREZ; LOMONTE 1989; WARRELL, 1993).

As peçonhas botrópicas produzem fortes danos em tecidos biológicos, bem como a interferência em quase todas as fases da hemostase humana (HIGUCHI et al., 2007) devido à ação de várias enzimas, especialmente proteases e fosfolipases A₂ (PLA₂).

4. Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes

As fosfolipases (PLAs) são enzimas que degradam especificamente fosfolipídeos e são nomeadas em A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D

(PLD), de acordo com a ligação hidrolisada. Assim sendo, as fosfolipases A₂ (PLA₂s ou fosfatidil-acil hidrolases; E.C. 3.1.1.4) são as enzimas que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos em uma reação dependente de cálcio (VAN DEENEN; DE HAAS, 1963).

Amplamente distribuídas na natureza, foram as primeiras a serem descobertas na observação da ação do suco pancreático de mamíferos e da peçonha de serpentes na hidrólise de fosfatidilcolina (WITTCOFF, 1951). São encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e células como: bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (coração, baço, pulmão e fígado), eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares (DENNIS et al., 1994).

Estão envolvidas em diversas funções celulares, tais quais: manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular, contração muscular e processos inflamatórios (ARNI; WARD, 1996; MUKHERJEE; MIELE; PATTABIRAMAN, 1994).

As PLA₂s constituem uma superfamília de enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos, que também podem ser divididas em cinco tipos distintos: PLA₂s secretadas (sPLA₂), PLA₂s citossólicas (cPLA₂), PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), acetil-hidrolases fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e PLA₂s lisossomais (BURKE; DENNIS, 2009). O sistema de classificação agrupa as PLA₂s considerando a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais (BURKE; DENNIS, 2009; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As sPLA₂s variam entre 14 e 18 kDa e usualmente contém de 5 a 8 pontes dissulfeto. Possuem uma histidina no sítio ativo e necessitam da presença do íon Ca²⁺ para a catálise. São representadas pelos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV, sendo que as PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) estão classificadas nos grupos IA (famílias *Hydrophidae* e *Elapidae*) e IIA (*Crotalidae* e *Viperidae*). As do grupo IA apresentam de 13 a 15 kDa e 14 resíduos de cisteína e 7 pontes dissulfeto, enquanto que, as do grupo IIA tem 13-17 kDa e 6 a 8 pontes dissulfeto. Ambas possuem alta similaridade em suas sequências de aminoácidos e alto grau de homologia estrutural (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; KANG et al., 2011). As estruturas são compostas

de: N-Terminal α -hélice 1 (resíduos 2-13); "Loop" ligante de Ca^{2+} ; duas α -hélices 2 e 3 antiparalelas (resíduos 40-53 e 90-108); dois filamentos pequenos de folha- β antiparalelas, a volta- β (resíduos 75-84) e "Loop" C-Terminal (resíduos 109-133) (FIGURA 1) (WARD; AZEVEDO; ARNI, 1998).

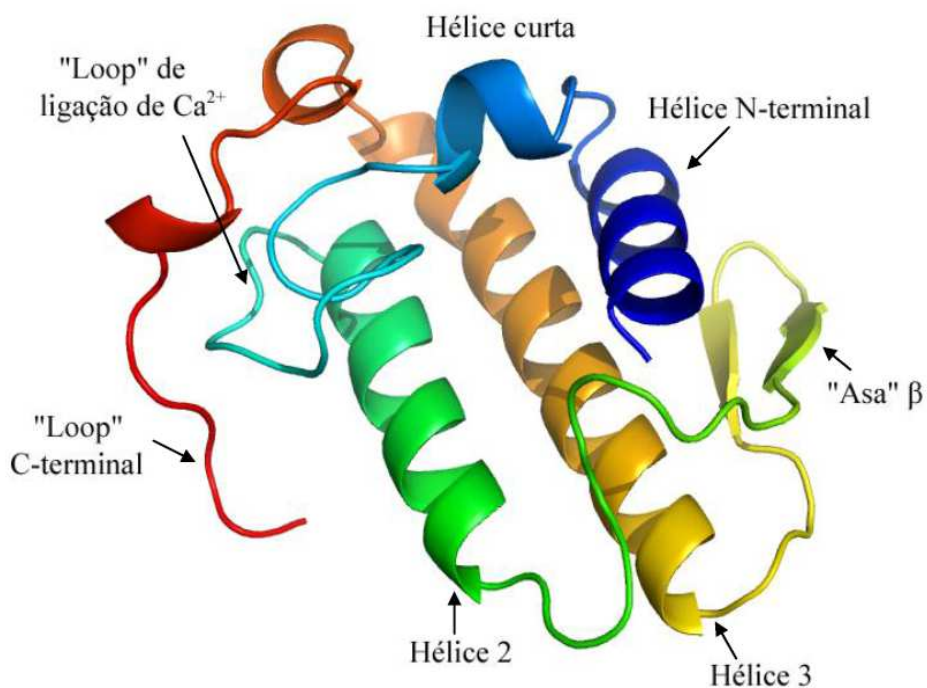


Figura 1. Estrutura típica de PLA₂s das classes I e II com as principais alças e hélices indicadas (DELANO, 2002 apud MELIM, 2009)

As svPLA₂s do grupo IIA foram divididas em dois subgrupos: PLA₂s Asp49, que apresentam atividade catalítica e PLA₂s Lys49, com pouca ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999).

As peçonhas de serpentes são ricas em fosfolipases A₂ e além da função catalítica, apresentam propriedades farmacológicas e tóxicas variadas como: miotoxicidade (MEBS, 1986; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995), rápida indução de mionecrose local e formação de edema (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989, OWNBY et al., 1999), inflamação local e dor (TEIXEIRA et al., 2003; CHACUR et al., 2004) citólise de uma grande variedade de tecidos celulares (LOMONTE et al., 1994), neurotoxicidade pré-sináptica (CHANG et al., 1977), cardiotoxicidade (FLETCHER et al., 1981), agregação de plaquetas (GERRARD; ROBINSON, 1993; YUAN et al., 1993) e atividade bactericida direta (PÁRAMO et al., 1998, SOARES et al.,

2000). Embora os mecanismos pelos quais as PLA₂s causam tais efeitos sejam ainda pouco conhecidos, a função catalítica não é necessária para algumas destas propriedades farmacológicas (LOMONTE et al., 1994; PÁRAMO et al., 1998, SOARES et al., 2000; CHACUR et al., 2004).

4.1 *Bothropstoxina I* (BthTx-I)

A peçonha bruta de *B. jararacussu* foi, pela primeira vez, fracionada por meio de filtração em gel em Sephadex G-50 (RODRIGUES-SIMIONI; BORGES; CECARELLI, 1983). Uma das frações obtidas correspondia a 30% do conteúdo proteico total e foi novamente purificada combinando filtração em gel sephadex G-75 com cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex G-25, obtendo-se a BthTx-I , a principal proteína presente na peçonha de *B. jararacussu* que equivale a 15% do total (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Ao contrário da peçonha bruta que, além de ação miotóxica afeta artérias e veias intramusculares, a BthTx-I foi considerada especificamente miotóxica (FRANCO, 2001), causando contratura, bloqueio das contrações musculares, despolarização e bloqueio do potencial de ação composto no músculo (HELUANY et al, 1992).

Atualmente, sua obtenção é realizada por meio de um único passo cromatográfico (SPENCER et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO, 2000). Teve sua completa sequência de aminoácidos descrita por Cintra et al. (1993), sendo constituída por uma cadeia simples polipeptídica de 121 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 13,8 KDa, contendo uma única metionina e sete resíduos de cistina, correspondendo a sete pontes dissulfeto, sendo bastante estável em condições de pH e temperatura (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988).

A sequência do código de cDNA da BthTx-I foi obtida por Ward et al (1995) e mostrou que a BthTx-I é uma fosfolipase A₂ (Lys 49) homóloga às outras fosfolipases A₂ miotóxicas de peçonhas botrópicas, que não exibe atividade catalítica em substratos artificiais. Nas Lys49-PLA₂s, o resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) na região do sítio ativo é substituído por lisina (Lys49) (FRANCO, 2001). Tal substituição afeta drasticamente a catálise enzimática, impedindo a interação de PLA₂s com cálcio, um cofator essencial na estabilidade

do intermediário tetraédrico na catálise (PEREIRA et al., 1998; GIOTTO et al., 1998; OWNBY et al., 1999; CHIOATO; WARD, 2003; TEIXEIRA et al., 2003).

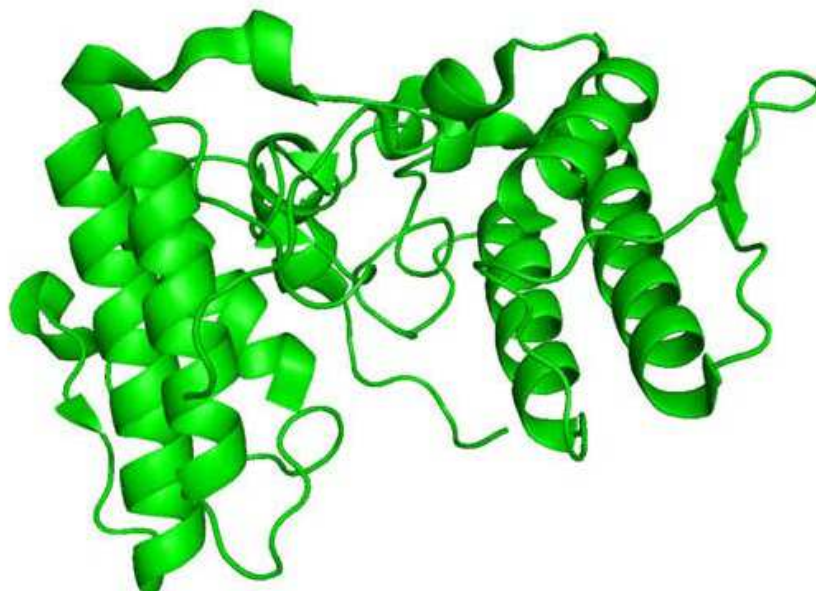


Figura 2 – Estrutura tridimensional da BthTx-I nativa (FERNANDES et al., 2010)

A função da atividade fosfolipásica foi investigada por Rodrigues-Simioni et al. (1995), em cultura de miócitos, sobre a ação farmacológica e a baixa atividade fosfolipásica da BthTx-I e parece não desempenhar papel relevante sobre o efeito bloqueador da atividade contrátil. Dos estudos com dantrolene, droga que impede a liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático, os autores concluíram que os mecanismos e/ou *pools* de Ca^{2+} , que podem ser antagonizados por este agente, não estão ligados aos efeitos da BthTx-I sobre a contração muscular (FRANCO, 2001).

5. Atividade antimicrobiana de peçonhas de serpentes

Acidentes com a peçonha de algumas espécies de serpentes podem causar necrose do tecido e apesar de serem feridas abertas que poderiam ser colonizadas por bactérias da microbiota da vítima e da serpente, encontra-se um baixo índice de infecção. Este fato sugere a presença de agentes antimicrobianos nas peçonhas de serpentes que as protegem durante a alimentação (DE LIMA et al., 2005).

Os primeiros relatos de peçonhas de serpentes com atividade antibacteriana foram feitos por Glacer (1948) em duas espécies de cascavéis (*Crotalus mitchellii pyrrhus* e *Crotalus ruber*) em *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina sp* e *Staphylococcus aureus*. Já Stocker e Traynor (1986) descreveram efeitos inibitórios das peçonhas de *Naja naja soutratrix*, *Vipera russelli* e *Crotalus adamanteus* em *E. coli*. Stiles, Sexton e Weinstein (1991) demonstraram que 30 diferentes peçonhas de serpentes asiáticas, africanas, australianas e norte-americanas possuíam atividade antibacteriana.

A partir destes estudos pioneiros, outros foram realizados e têm relatado atividade antimicrobiana em peçonhas brutas de serpentes em diversas concentrações e bactérias. Alves Ferreira (2007) avaliou peçonhas de serpentes da família *Viperidae* (*Agkistrodon rhodostoma*, *B. jararaca*, *B. atrox* e *Lachesis muta*) em antibiogramas qualitativos e quantitativos contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*). Todas as peçonhas testadas demonstraram uma atividade antibacteriana apenas para as bactérias gram-positivas, com exceção da peçonha de *Lachesis muta*, que não mostrou qualquer atividade. As peçonhas de *A. rhodostoma* e *B. atrox* mostraram uma atividade maior contra *S. epidermidis* e *E. faecalis* enquanto a de *B. jararaca* foi ativa contra a cepa de *S. aureus*. De acordo com o mesmo autor, todas as peçonhas foram tão promissoras quanto os controles utilizados, vancomicina, oxacilina e o cloranfenicol, sugerindo que estas peçonhas são fontes em potencial para desenvolvimento de novos antimicrobianos.

Samy et al (2007) estudaram 14 peçonhas de serpentes da família *Elapidae* e oito da família *Viperidae*, utilizando protocolos semelhantes aos de Stiles, Sexton e Weinstein (1991), para bactérias *S. aureus* (gram-positiva), *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *E. aerogenes* (gram-negativas) e observaram halos de inibição ao incubar a bactéria gram-positiva *S. aureus* com seis peçonhas da família *Elapidae*: *Acanthophis antarcticus*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colleti*, *Pseudechis guttata*, *Pseudechis porphyriacus* e *Pseudonaja textilis*.

Bustillo et al. (2008) avaliaram o efeito bactericida da peçonha de *B. alternatus* frente as bactérias gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus* e gram-negativa *E. coli*. E os autores observaram que a eficácia da atividade antimicrobiana foi dose-dependente e os melhores halos de inibição foram encontrados para a bactéria *S. aureus*, seguida pela *E.coli*. A peçonha de *B. alternatus* não foi capaz de inibir o crescimento da gram-positiva *E.faecalis* em nenhuma das concentrações avaliadas. A concentração-dependente é um dos melhores indicativos da capacidade bactericida dos fármacos. Assim, antibióticos que tenham atividade bactericida concentração-dependente vão conseguir alcançar magnitude de efeito bactericida com o aumento das concentrações acima da concentração inibitória mínima até um ponto máximo, em geral, em torno de cinco ou dez vezes (SELIGMAN, 2004).

Queiroz (2010) avaliou o potencial bactericida da peçonha bruta de *B. moojeni*, em diferentes concentrações e observou que a mesma possui atividade contra bactérias Gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras de glicose. E Mosca e Do Nascimento (2011) observaram a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* pelas peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararacussu*, assim como Stiles et al (1991) que observaram ação bactericida em 30 peçonhas das famílias *Elapidae* e *Viperidae*, em bactérias gram-positivas e gram-negativas, com os maiores halos de inibição para *S. aureus* na família das serpentes *Viperidae* quando comparados aos produzidos pelas peçonhas de serpentes *Elapidae*. Por outro lado, Mosca e Do Nascimento (2011) não encontraram ação antimicrobiana nas peçonhas das serpentes *Naja mossambica*, *Notechis scutatus scutatus*, *Acanthophis antarcticus* e *Pseudechis australis*, enquanto que, Stiles, Sexton e Weinstein (1991) observaram poder de inibição para todas as serpentes citadas, quando incubadas com *S. aureus*.

As diferenças encontradas nos resultados destes estudos talvez possam ser explicadas por se tratar de bactérias diferentes, embora os mecanismos de defesa das bactérias gram-positivas sejam idênticos. A técnica de coloração de bactérias de Gram resulta em dois padrões: as gram-positivas, com uma estrutura única com superfície celular (CS), uma quantidade maior de peptidoglicano (PG) e a membrana citoplasmática (MC), tornando-a mais espessa e rígida. Composta de proteínas, lipídeos, peptidoglicano e ácidos teicóicos (cadeias de polifosfato

com resíduos de ribitol e glicerol), essas bactérias são sensíveis à lisozima e sua parede constitui o local de ação de alguns antibióticos. E as gram-negativas, que apresentam também uma membrana externa (ME) (barreira seletiva para a entrada e saída de algumas substâncias da célula) cobrindo uma fina camada de peptideoglicano, que torna a parede celular menos espessa (MORAES; FONTOURA; BENVEGNÚ, 2000) (Figura 3).

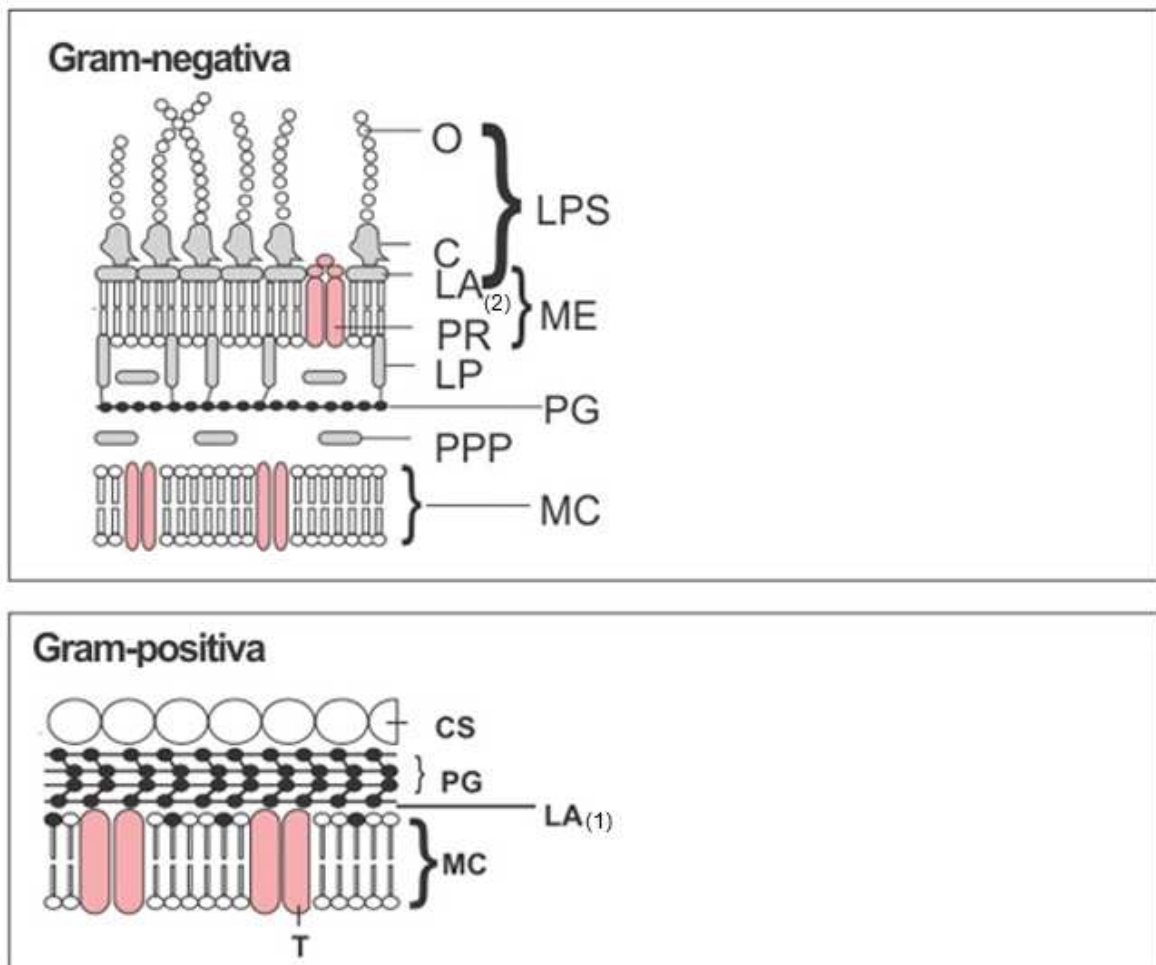


Figura 3. Esquema ilustrativo das diferenças na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. PG: peptideoglicano; MC: membrana citoplasmática; LA₍₁₎: ácido lipoproteico; CS: superfície celular; LPS: (O: polissacarídeo O-específico; C: núcleo polissacarídeo; LA₍₂₎: lipídeo A); PR: lipoproteína; PPP: proteína espaço periplasmático; T: proteína de transporte; ME: membrana externa. Adaptado de Aragão (2005).

Este critério de identificação auxilia, no tratamento a agentes etiológicos, visto que as disparidades existentes na composição da parede celular entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas podem influenciar significativamente o

mecanismo de ação de agentes bactericidas (ARAGÃO, 2005). De acordo com Scholar e Pratt (2000), a parede celular das bactérias gram-positivas não constitui um obstáculo à penetração de antibióticos, ao contrário das bactérias gram-negativas, nas quais, a complexidade da membrana externa constitui uma barreira adicional de permeabilidade e antibióticos de elevada massa molecular não conseguem atravessar a membrana exterior das bactérias gram-negativas, tornando-os ativos apenas sobre bactérias gram-positivas.

Outros fatores que podem influenciar a eficácia da atividade bactericida de peçonhas de serpentes são a origem e a forma de armazenamento ou dissolução das peçonhas (MOSCA; DO NASCIMENTO, 2011) ou ainda, a variabilidade na composição e concentração que, em uma dada espécie, difere em função de fatores como idade, sexo, origem geográfica (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991), hábitos alimentares, tempo decorrido entre as extrações de peçonhas e etc (LOMONTE; CARMONA, 1992; SOARES, 2000). Um país extenso como o Brasil provavelmente favorece o surgimento de diferenças na composição das peçonhas de serpentes de uma mesma espécie e/ou entre regiões diferentes (SOARES, 2000).

Estudos da ação antimicrobiana com peçonhas animais são realizados em todo o mundo, no entanto, peçonhas de espécies de serpentes típicas do cerrado brasileiro são pouco estudadas, principalmente no que diz respeito à atividade antimicrobiana.

As peçonhas de serpentes da família *Viperidae* ainda se apresentam como fontes promissoras para a identificação de moléculas apresentando atividade antimicrobiana que pode incluir peptídeos com potencial terapêutico (DE LIMA et al., 2005) e podem constituir em importantes opções para a produção de antibióticos potentes contra bactérias multirresistentes a diferentes classes de antimicrobianos, que frequentemente estão associadas com infecções hospitalares e mais recentemente com infecções comunitárias (QUEIROZ, 2010).

5.1 Atividade antimicrobiana de fosfolipases A_2

Alguns estudos observaram que a atividade antibacteriana sobre diferentes espécies de bactérias está relacionada com a ação de uma proteína funcional

presente nas peçonhas das serpentes observando uma relação dose-efeito (LU et al. 2002, STÁBELY et al. 2004).

Diferentes componentes com atividade bactericida já foram isolados e estudados a partir das peçonhas de serpentes como: L-aminoácido oxidases (SKARNES, 1970; STILES, SEXTON; WEINSTEIN, 1991; STÁBELI et al., 2004; IZIDORO, 2007; SAMEL et al., 2008; ZHONG et al., 2009; COSTA TORRES et al., 2010; YANG et al., 2011), metaloproteases (MAZZI et al., 2004; SAMY et al., 2008), lectinas tipo C (RADIS-BAPTISTA et al., 2006; NUNES et al., 2011) e fosfolipases A₂ (PÁRAMO et al., 1998; LOMONTE et al., 1999; SOARES, 2000; GUILLAUME et al., 2004; ROBERTO et al., 2004; BARBOSA et al., 2005; IGLESIAS et al., 2005; SANTA-MARIA et al., 2005; NEVALAINEN; GRAHAM; SCOTT, 2008).

As PLA₂s são proteínas multifuncionais que podem participar como mediadores em diversas doenças inflamatórias, induzir diferentes efeitos farmacológicos em sistemas *in vivo* e *in vitro* e ser utilizadas em algumas áreas aplicadas à medicina, com um papel potencialmente bactericida (ELSBACH, 1997; SOARES, 2000). Apresentam efeito lítico sobre os fosfolipídios da membrana plasmática de bactérias gram-positivas e gram-negativas (DE LIMA et al., 2005; ALVES FERREIRA, 2007), incluindo a BthTx-I.

Barbosa (2005) obteve efeito bactericida da BthTx-I sobre a gram-negativa *Xanthomonas axonopodis. pv. passiflorae*. Costa (2005) ao avaliar a BthTx-I relatou de 90 a 100% de inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Aragão (2005) e Alves Ferreira (2007) observaram a presença de atividade bactericida na BthTx-I quando avaliada sobre *E. coli*.

Já Aragão (2005) avaliou a atividade antimicrobiana da BthTx-I sobre a bactéria gram-positiva *Micrococcus luteus* e não encontrou resultados positivos em diversas tentativas e doses. Este resultado negativo indica que a atividade antibiótica, é modulada, principalmente, pela diversidade estrutural das bactérias, quando se trata de membrana externa e da parede celular (LU et al., 2002; ALVES FERREIRA, 2007). Assim, possivelmente a BthTx-I não agiu sobre a camada lipoprotéica dessa bactéria devido ao fato da sua composição lipídica ser diferenciada (DE LIMA et al., 2005).

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana das PLA₂s não é totalmente esclarecido, mas sabe-se que a função catalítica não é necessária para algumas propriedades farmacológicas. Haja vista que a BthTx-I é uma PLA₂ Lys49 e cataliticamente inativa, o efeito bactericida parece ser independente de uma atividade fosfolipásica intrínseca (LOMONTE et al., 1994; PÁRAMO et al., 1998, SOARES et al., 2000).

Evidências sugerem que estas atividades farmacológicas são mediadas por interações entre PLA₂s de peçonhas e receptores endógenos de PLA₂s sobre a membrana de células alvo (VALENTIM; LAMBEAU, 2000). De acordo com Segrest et al. (1990) agrupamentos de resíduos carregados positivamente hidrofóbicos encontrados em várias proteínas e peptídeos podem interagir com membranas biológicas para formar estruturas com capacidade de penetrar a bicamada lipídica.

Estudos indicam uma relação da região C-terminal das PLA₂s Lys49 com várias outras atividades biológicas dessas proteínas, incluindo desestabilização de lipossomos, citotoxicidade em diversas linhagens celulares, atividades bactericida e de hiperalgesia (SOARES et al., 2001; LOMONTE; YAMILETH; SANTAMARIA, 2003). Nas PLA₂s Lys49 isoladas das peçonhas da família *Viperidae*, a alça C-terminal apresenta alto conteúdo de resíduos positivamente carregados, como também de 3-4 resíduos de aminoácidos aromáticos (WARD et al., 1998) e importante função no efeito bactericida, tanto sobre bactérias gram-negativas quanto gram-positivas (PÁRAMO et al., 1998; SANTAMARIA et al., 2005). Chiato e Ward (2003) mostraram que os aminoácidos da região C-terminal da BthTx-I de *Bothrops jararacussu* contribuem com o sítio miotóxico e com o mecanismo de danificação de membranas e isto foi explicado, em parte, pela presença de combinações de aminoácidos básicos e hidrofóbicos próximos da região C-terminal da molécula (PÁRAMO et al., 1998).

Alves Ferreira (2007) afirma que não há nenhuma correlação exata entre a posição ou região específica da proteína que esteja ligada diretamente à atividade antimicrobiana, e uma vez que o percurso utilizado pela molécula de BthTx-I entre o ambiente externo até a membrana citoplasmática é desconhecido, acredita-se que a proteína utiliza outros mecanismos para atuar na atividade bactericida.

Estudos na literatura sobre atividade bactericida das PLA₂s-Lys49 são descritivos, porém não existe um modelo consistente que explique esse efeito (ARAGÃO, 2005). O mecanismo proposto por Freer et al. (1996) é similar ao exercido por outros peptídeos catiônicos, no qual as cadeias laterais dos resíduos catiônicos do peptídeo competem com os íons metálicos associados aos grupos carregados negativamente na superfície celular bacteriana. Devido ao maior volume apresentado pelos peptídeos, a membrana é desestabilizada, permitindo a inserção do domínio hidrofóbico do peptídeo dentro da bicamada lipídica. Isso acarretaria a permeabilização da membrana e morte celular.

6. Microbiota intestinal de frangos de corte

A microbiota intestinal, dos frangos de corte e outros animais, tem um importante papel na digestão e absorção dos alimentos ingeridos pelo hospedeiro, exercendo desta forma, influência sobre sua saúde e produção (CANALLI, 1992), sendo de difícil definição e composta de aproximadamente 400 espécies em equilíbrio entre si e com o hospedeiro (GEDEK, 1986). Quando em equilíbrio, esta microbiota auxilia na resistência a infecções bacterianas. Porém, em condições estressantes como amontoamento, transporte, mudança alimentar repentina, frio ou calor excessivos, pode-se ter um desequilíbrio em favor das bactérias indesejáveis, resultando em decréscimo na eficiência alimentar e nas taxas de crescimento e produção e ainda, infecções intestinais severas que podem, até mesmo, se tornarem fatais (CANALLI, 1992; LODDI, 2001).

Estima-se que, 90% das bactérias encontradas são facultativas (aeróbicas/anaeróbicas) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbicas como os *Bacterioides* spp, *Fusobacterium* spp e *Eubacterium* spp. Os 10% restantes são consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, a *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp.

6.1 *Salmonella enteritidis*

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família

Enterobacteriaceae e altamente adaptados aos hospedeiros. São encontrados, principalmente no trato intestinal do homem e animais, como as aves, em especial frangos e perus. Qualquer alimento de origem animal contaminado pode ser veículo de transmissão da bactéria para o homem, sendo a carne de aves considerada a principal reserva de *Salmonella* (LINE et al., 1998).

A *Salmonella enteritidis* é um dos sorovares de maior distribuição no mundo. Porém, sua ocorrência tem pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas, entretanto, as aves podem ser portadoras sadias da bactéria e constituir-se em veículo de difusão para outras espécies e humanos, provocando brotes endêmicos de toxinfecções, por consumo de produtos avícolas geralmente conservados ou elaborados de forma deficiente (SONCINI, 2002).

6.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus é um gênero de bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, coagulase positiva, sendo um dos patógenos mais comuns do homem. Apesar de sobreviverem em diversos ambientes, o *S. aureus* habita, principalmente, pele e mucosas de mamíferos e aves, estando presentes também no trato respiratório, urinário e gastrointestinal. Na microbiologia de alimentos, merece destaque pela frequente ocorrência de intoxicações alimentares causadas pelo consumo de alimentos contendo suas enterotoxinas termoestáveis (FREITAS et al., 2004; OLIVEIRA, 2010).

6.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, sendo a bactéria comensal encontrada em maior quantidade no intestino grosso. Também fazem parte desta família, os *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Salmonella* (OLIVEIRA, 2010).

A presença da *E. coli* em água ou alimentos é indicativa de contaminação com fezes humanas (ou mais raramente de outros animais). Carnes cruas e frangos são os alimentos mais comumente relacionados a surtos por *E. coli* enteropatogênicas, embora qualquer alimento exposto à contaminação fecal possa ser suspeito (APHA, 1995; OLIVEIRA, 2010).

6.4 *Enterococcus faecalis*

Os *Enterococcus* spp são cocos Gram-positivos, catalase negativos, que, geralmente, se dispõem aos pares e em curtas cadeias. São anaeróbios facultativos com um ótimo crescimento à 35°C, sendo bastante tolerantes a temperaturas extremas, salinidade e pH. Os enterococos fazem parte da microbiota normal do sistema gastrointestinal de humanos e animais, entretanto possuem capacidade de causar infecções hospitalares em humanos. Por outro lado, cepas de *E. faecalis* são importantes probióticos, levando ao ganho de resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, tratamento de diarreia associada a antibióticos, controle de colites, entre outros benefícios. Além disso, cepas de *Enterococcus* spp com características bioquímicas específicas são essenciais para a fabricação de vários produtos lácteos fermentados, e algumas cepas são exploradas tecnologicamente como cultura *starters*, conferindo sabor ácido característico a produtos fermentados e inibindo microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Campylobacter jejuni* (GAMA, 2008; CAMPOS, 2012).

7. Avicultura industrial e o uso de melhoradores de desempenho

A avicultura no Brasil cresceu significativamente nos últimos anos e o país consolidou-se como o maior exportador de carne de frango do mundo com 3,943 milhões de toneladas e o terceiro maior produtor mundial com 13,058 milhões de toneladas em 2011, movimentando cerca de 8,2 bilhões de dólares e gerando muitos empregos. Já no mercado interno, apresentou um consumo per capita de 47,4 kg em 2011, representando um crescimento de 7% em relação ao ano anterior (UBABEF, 2012). Para manter-se neste mercado globalizado com preços competitivos internacionalmente, fez-se necessário o crescimento da industrialização e grandes investimentos em genética, instalações e equipamentos, nutrição, sanidade, vacinas, mercadologia, informática, e recursos humanos, visando economias de escala e redução nos custos de produção (MENDES; SALDANHA, 2004).

Entretanto, o bom desempenho das aves depende da obtenção adequada de energia e compostos químicos (água, sais minerais, lipídios, carboidratos,

vitaminas e aminoácidos). Para que isso ocorra, o sistema digestório deve apresentar características estruturais que possibilitem a ingestão e a passagem do alimento (MARCHINI, 2005). O moderno sistema de produção de frangos de corte é sustentado por pintos comerciais produzidos em sistema de incubação com eficiente controle sanitário, fato que contribui para o desenvolvimento da avicultura brasileira, mas retarda a estabilização de uma microbiota intestinal para estes animais. Assim, em condições sanitárias desfavoráveis de campo, as aves ao chegarem às granjas ficam susceptíveis a desafios por microrganismos patogênicos, tendo seu desempenho produtivo afetado, principalmente pelo desenvolvimento de patologias entéricas e respiratórias (RAMOS et al., 2011).

Parte deste problema é minimizada pelo uso de antibióticos e quimioterápicos conhecidos como promotores de crescimento e, atualmente caracterizados como melhoradores de desempenho (BRASIL, 2004). Os antibióticos são compostos produzidos por bactérias e fungos que inibem o crescimento de outros microrganismos, sendo efetivos em baixas concentrações. Enquanto que, os quimioterápicos são produtos quimicamente sintetizados para inibir o crescimento de certos microrganismos (BROCK et al., 1994).

O uso de antibióticos (sozinhos ou em conjunto com quimioterápicos) como melhoradores de desempenho realiza-se com dosagem inferior a Concentração Inibitória Mínima (MIC), sendo esta a mínima concentração de um agente antimicrobiano requerida para inibir, *in vitro*, o crescimento de determinado microrganismo. A MIC deve ser a única para uma mesma substância, mas pode variar dependendo do microrganismo analisado.

O efeito melhorador de desempenho dos antimicrobianos foi descoberto na década de 1940, quando se observou que animais alimentados com micela desidratada de *Streptomyces aureofaciens* contendo resíduos de clorotetraciclina como suplementação de vitamina B12, tiveram seu crescimento aumentado (STOKSTAD; JUKES, 1950).

Embora não se conheça exatamente os mecanismos de ação desses compostos, existem sugestões de que atuam por efeito metabólico, no qual o agente antibacteriano melhora o desempenho dos animais por meio de efeito direto sobre o metabolismo do animal. Esse modo de ação parece não ser

apropriado para aqueles agentes antibacterianos que não são absorvidos e que permanecem na luz do trato intestinal, a não ser que a ação ocorra sobre as células do epitélio intestinal afetando a absorção de nutrientes (SOUZA; CRISTINA, 2003).

Outra hipótese seria a atuação por efeito nutricional, na qual alterações na população microbiana intestinal poderiam promover maior disponibilidade de nutrientes para o hospedeiro. Por outro lado, tem sido observado que agentes antimicrobianos podem reduzir a espessura do epitélio intestinal favorecendo a absorção de nutrientes. Em adição, a massa intestinal de animais alimentados com dietas contendo agentes antimicrobianos pode ser reduzida o que implica na necessidade de menor quantidade de nutrientes e de energia para manutenção desses tecidos corporais (SOUZA; CRISTINA, 2003).

Mas, em geral, é aceito que a ação benéfica desses compostos resulta do efeito sobre o controle de doenças, no qual a alteração seletiva da população microbiana no intestino controla o crescimento exarcebado e indesejado de determinadas populações microbianas secretoras de substâncias tóxicas, evitando diarreias, doenças do edema e subclínicas. Assim, pequenas quantidades de antibióticos são capazes de produzir uma seleção da microbiota intestinal a favor das bactérias benéficas e, com isso, promover a melhor absorção de nutrientes, permitindo que os animais expressem ao máximo o seu potencial genético para crescimento e deposição de carne (BROCK et al, 1994; SOARES, 1996; SOUZA; CRISTINA, 2003; DIBNER; RICHARDS, 2005; NIEWOLD, 2007).

As melhorias em Ganho de Peso Diário (GPD) alcançadas com o uso de melhoradores de desempenho variam, em geral, de 2 a 4%. Já as melhorias em conversão alimentar variam de 4 a 10% (SOUZA; CRISTINA, 2003). Já de acordo com Franco (2009), o efeito pode incluir ganho de peso, mas geralmente é limitado ao efeito apenas na eficiência alimentar. Mas, a resposta e o nível de uso de um antimicrobiano específico dependem de fatores como: o estágio de crescimento do animal; a prevalência de doenças dentro do lote; o tipo de aditivo utilizado; o ambiente da granja e a barreira contra agentes patogênicos presentes no lúmen intestinal (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002).

Apesar de serem os aditivos de uso mais generalizado na produção animal, os melhoradores de desempenho têm sido vistos como um fator de risco à saúde humana, principalmente pela possibilidade da presença de seus resíduos nos produtos de origem animais destinados a alimentação e indução da resistência cruzada para bactérias que são patógenas para humanos (MENTEN, 2001; FRANCO, 2009).

As primeiras preocupações sobre o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos em patógenos humanos e recomendações para banir o uso terapêutico em dietas animais foram discutidas por Swann em um relatório ao Parlamento Britânico (1969). De fato, há evidências de que os genes de resistência a antimicrobianos podem ser e são transmitidos dos animais para a microbiota humana (GREKO, 2001). Um dos primeiros relatos da resistência em alimentos para animais foi feito por Starr e Reynolds (1951), depois da administração experimental alimentar de estreptomicina em perus. Outros pesquisadores tem relatado uma associação de resistência à tetraciclina quando utilizadas em dosagens subterapêuticas em frangos (BARNES, 1958; ELLIOT; BARNES, 1959). Bactérias patogênicas resistentes a um número de agentes antimicrobianos emergiram mundialmente na década de 1980 (AARESTRUP, 2003).

Entretanto, Erpelding (1999) afirma que existem dados limitados a respeito do impacto negativo significativo na saúde humana, com origem no uso de antibióticos na produção avícola e de outros animais. E outros pesquisadores sugerem que a maior causa da resistência bacteriana a antibióticos ocorra pelo uso indiscriminado; interrupção do uso antes do tempo preconizado; automedicação ou falta de acompanhamento (WHO, 1997). Sugerem ainda que o aumento do uso de antibióticos em doses terapêuticas na produção animal e acima da CIM podem ser um agravante do problema da resistência bacteriana, pois podem provocar pressão de seleção, aumentando a frequência de cepas de microrganismos que carregam genes de resistência aos antibióticos.

Mesmo assim, há um movimento mundial para banir estes produtos da alimentação animal com o intuito de reduzir a probabilidade de resistência. A primeira nação a eliminar o uso de antimicrobianos ou promotores de crescimento foi a Suécia em 1986, seguida pela Dinamarca e com isso tiveram uma queda de

desempenho e lucratividade da ordem de 2% e 3%, respectivamente (AARESTRUP, 2003; LANGHOUT, 2005). Em 2006, a União Européia, responsável por parcela significativa das exportações brasileiras de frango, também banuiu o uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho da alimentação de aves permitindo somente o emprego dos ionóforos monensina sódica e salinomicina, como agentes anticoccidianos (COUNCIL OF EUROPEAN UNION, 2003).

Para o mercado interno, a utilização é permitida desde que o produto esteja devidamente registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), e o seu modo de uso, dosagem e período de carência sejam respeitados, não sendo permitida a associação entre dois ou mais melhoradores de crescimento (BRASIL, 2004).

Tais restrições têm limitado a utilização de promotores de crescimento tradicionalmente utilizados e as principais alternativas em relação ao uso de promotores de crescimento são as medidas que reduzam os desafios microbiológicos às aves, em especial, aquelas ligadas à desinfecção das instalações e garantia da qualidade da água e das rações (SOUZA; CRISTINA, 2003). Além disso, são necessárias pesquisas de produtos alternativos para atender a demanda e manter a viabilidade da cadeia produtiva, os quais poderão ser usados sem deixar resíduos químicos no produto final, evitando com isso as futuras resistências bacterianas no ser humano.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. **WORKING PAPERS for the WHO International Review Panels Evaluation**, Geneva, p. 6-11, 2003.
- ALBUQUERQUE, V. Mercado farmacêutico mundial pode chegar a US\$ 1,3 trilhão em 2020. **Folha Online**, São Paulo, 13 jun. 2007. Caderno de Mercado. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u304185.shtml>>. Acesso em 20 fev. 2013.
- ALVES FERREIRA, B.L. **Identificação da atividade Antibiótica e relação Estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestre em Neuroimunologia). Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.
- ANDRIÃO-ESCARSO et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, Paris, v. 82, pp. 755-763, 2000.
- ARAGÃO, E.A. **Efeito bactericida de Fosfolipases A₂-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais**. 2005. 118 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- AMARAL, A. **Serpentes do Brasil**. Iconografia colorida. São Paulo. Edições Melhoramentos, Editora da Universidade de São Paulo, 2 ed., 1977, 246 p.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Control of Communicable Diseases Manual**. Abram S. Benenson, Ed., 16 th Edition, 1995, p. 147- 150.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂: A structural review. **Toxicon**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- BARBOSA, P. S. et al. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 376-386, 2005.
- BARNES, E. M. The effect of antibiotic supplements on the faecal streptococci (Lancefield group D) of poultry. **British Veterinary Journal**, London, v. 114, p. 333-344, 1958.
- BARRAVIERA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Petrópolis: Editora de publicações biomédicas Ltda, 1999, 411 p.
- BARRAVIERA, B.; FERREIRA JUNIOR, R.S. **Acidentes por animais peçonhentos**. CEVAP-UNESP, 2007, 110 p.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. Pp. 261 – 280 In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos**: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. EPUB, Rio de Janeiro, 1999.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H.C. (org.). 2012. **Répteis brasileiros**: lista de espécies. Versão 2012.1. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/lista_repteis/ListaRepteis12Dezembro2012-PORTUGUES.pdf>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em 12 jun. 2013.

BOLELI, I. C.; MAYORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari, M; Furlan, R. L.; Gonzáles, E. **Fisiologia aviária aplicada frangos de corte**. Jaboticabal: Funep, 2002, p.75-95.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes** » Aspectos epidemiológicos, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500>. Acesso em: 24 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Acidentes por serpentes - Serpentes - Aspectos epidemiológicos**, 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/5817/783/acidentes-por-serpentes.html>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.13**, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. Prendice-Hall, New Jersey, 7 ed., 1994. 909p.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovascular Drugs Therapy**, Norwell, v. 23, p. 49-59, 2009.

BUSTILLO, S. et al. Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, Mexico, v. 50, n. 3-4, p. 79-82, 2008.

CAMPOS, A.C.F.B. **Resistência antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* isoladas de carcaças de frango comercializadas no Distrito Federal**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CANALLI, L.S. **Alteração da microbiota intestinal de frangos de corte pela utilização de probiótico na alimentação**. 1992. 56 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, FAPESP, 2003. 468p.

CARRASCO, P. A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, *Viperidae*). **Zoologica Scripta**, Stockholm, v. 41, p. 109–124, 2012.

CINTRA, A.C.O. et al. Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 12, p. 57-64, 1993.

CHACUR, M. et al. Snake venom phospholipase A₂ (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon per-sciatic administration: involvement of spinal cord proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 180-191, 2004.

CHANG, C.C. et al. The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with p-bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon**, Oxford, v.15, p. 571-576, 1977.

CHIOATO, L.; WARD, R.J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 869-883, 2003.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, Oxford, v. 29, n. 11, p.1279-1303, 1991.

COSTA, L.C.G.P. **Efeito citotóxico e antitumoral da Bothropstoxina-I e da Crotamina**. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

COSTA TORRES, A.F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, Oxford, 55, 795–804, 2010.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 53/2, 2003.

DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, Palo Alto, CA, 2002.

DE LIMA, D.C. et al. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 39–47, 2005.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A₂. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.269, p.13057-13060, 1994.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, College Station, v. 84, p. 634-643, 2005.

ELLIOTT, S.D.; BARNES, E.M. Changes in serological type and antibiotic resistance on Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. **Journal of General Microbiology**, London, v. 20, p. 426-433, 1959.

ELSBACH, P. Determinants of the anti-microbial action of 14-kDa phospholipase A₂. In: UHL, W.; NEVALAINEN, T.J.; BUCHLER, M.W. **Phospholipase A₂ basic and clinical aspects in inflammatory diseases**. Basel: Ed. S Karger Pu, p. 17-22, 1997, 250p.

ERPELDING, D.L. Promotores de crescimento: ciência vs política. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1999. Campinas, Brasil. **Anais...** Campinas, 1999. p. 187-197.

FERNANDES, C.H.A. et al. The role of Lys 122 and Ca²⁺ binding loop region for the catalytically inactive Lys-49 phospholipases A₂ from snake venoms. **Journal of Structural Biology**, v. 171, p. 31-43, 2010.

FERREIRA, S.H. Angiotensin Converting Enzyme: History and Relevance. **Seminars in Perinatology**, New York, v. 24, n. 1, p. 7-10, 2000.

FLETCHER, J.E. et al. Relationship between catalysis and and toxicological properties of three phospholipases A₂ from *Elapid* snake venoms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 59, p. 375-382, 1981.

FONSECA, F. **Animais peçonhentos**. São Paulo: Instituto Butantan, 1949. 127p.

FRANÇA, F.G.R. et al. Phylogeny and ecology determine morphological structure in a snake assemblage in the central brazilian cerrado. **Copeia**, Washington, v. 1, p. 23-38, 2008.

FRANCO, L.G. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de corte**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

FRANCO, Y.O. **Nova abordagem no estudo da farmacologia da Bothropstoxina-I (*Bothrops jararacussu*)**. 2001. 150 f. Tese (Doutorado em

Farmacologia da Farmacêutica). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, 2001.

FREER E. et al. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella sp.* counterparts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 20, p. 5867-5876, 1996.

FREITAS, J.C. Nomenclatura em toxinologia, relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 53, p. 191-195, 1991.

FREITAS, M.F.L. de; LEÃO, A.E.D. de S.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **B.CEPA**. Curitiba, v.. 22, p. 227, 2004.

GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus spp.*** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

GEDEK, B. Probiotics in animal feeding: effect performance and animal health. **Feed Management**, Rockford, v. 3, p. 21-24, 1986.

GERRARD, J. M.; ROBINSON, P. Increased phosphatidic acid and decreased lysophosphatidic acid in response to thrombin is associated with inhibition of platelet aggregation. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 71, p. 432-439, 1993.

GIOTTO, M.T.S. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, New York, v. 30, n. 4, p. 442-454, 1998.

GLASER, H.S.R. Bacterial activity of *Crotalus* venom *in vitro*. **Copeia**, Washington, v. 4, p. 245-247, 1948.

GREKO, C. Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K.E.; LINDBERG, J.E. (Ed). **Gut Environment of Pigs**, Nottingham University Press, 2001. p.219-230.

GUILLAUME, C. et al. Anti-Plasmodium properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A₂ are serum-dependent. **Toxicon**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 311-318, 2004.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 51, n. 14, p. 211-233, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, In KINI, R.M., Venom **Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism**, Wiley, Chichester, p.321-352, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Review article. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

HELUANY, N.F. et al. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, Oxford, v. 30, n. 10, p.1203-1210, 1992.

HIGUCHI, D.A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 89, p. 319-328, 2007.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

IGLESIAS, C. et al. Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂). **Toxicon**, Oxford, v. 46, p. 751-758, 2005.

IZIDORO, L.F.M. **Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-Aminoácido Oxidase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai***. 2007. 56 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

KANG, T.S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, Oxford, v. 278, n. 23, p. 4544-76. 2011.

LACERDA, J.B. **Leçons sur le venin des serpents du Brésil et sur la méthode de traitement des morsures venimeuses par le permanganate de potasse**. Rio de Janeiro: Lombaerts & C., 1884, 194p.

LINE, J. E.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; STERN, N. J. , TOMPKINS, T.. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. **Poultry Science**, v.77, p.405 – 410, 1998.

LODDI, M.M. et al. Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. **Revista brasileira de zootecnia**, Viçosa, v.29, n.4, p.1124-1131, 2001.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, Brasil. **Anais...** Santos, 2005. p. 21-33.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B**, Oxford, v. 102, p. 325-329, 1992.

LOMONTE, B.; YAMILETH, A.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 42, p. 307-312, 2003.

LOMONTE, B. et al. Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modelling. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 269, p. 29867-29873, 1994.

LOMONTE, B. et al. Comparative study of cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (c2C12) cells *in vitro*. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 145-158, 1999.

LU, Q.M. et al. L-Amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal of Natural Toxins**, Fort Collins, v. 11, p. 345-52, 2002.

MARCHINI, C.F.P. **Efeito da temperatura ambiente cíclica elevada sobre os parâmetros produtivos, fisiológicos, morfométricos e proliferação celular da mucosa intestinal de frangos de corte**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2005.

MAZZI, M.V. et al. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 215-223, 2004.

Mc DIARMID, R.W.; CAMPBELL, J.A.; TOURÉ, T. **Snake Species of the World: a taxonomic and geographic reference**, v. 1. Herpetologists' League, 1999, 511pp.

MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipase A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 24, p. 161-168, 1986.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD JR, V. (Orgs.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, p. 33-61, 2003.

MELIM, L.I.S.H. **Estudo das interações entre fosfolipases A₂ e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de *Cordia verbenácea* (Boraginaceae) por cocristalização e modelagem molecular**. 2009. 171p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I. de A.; MACARI, M. (Ed.). **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001. Piracicaba, Brasil. **Anais...** Piracicaba, 2001. p.141-157.

MORAES, J.C.; FONTOURA, M.M.C.; BENVEGNÚ, S.A. **Microbiologia: atividades práticas**. 2 ed., Passo Fundo: Ed. Danielli, 2000, 207p.

MOSCA, R.C.; DO NASCIMENTO, N. An in vitro preliminary study on the growth inhibition of oral microflora by snake venom. **Journal of Dentistry and Oral Hygiene**, Victoria Island, v. 3, n. 8, p. 114-118, 2011.

MUKHERJEE, A.B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, n. 48, v. 1, p. 1-10, 1994.

NIEWOLD, T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, College Station, v.86, p.605-609, 2007.

NEVALAINEN, T.J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1781, n. 1-2, p. 1-9, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, p. 461-477, 2007.

NUNES, E.S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom, **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B**, Oxford, v. 159, p. 57-63, 2011.

OLIVEIRA, A.V.B. **Avaliação microbiológica de carnes de frangos de corte comercializadas em granjas produtoras no município de Patos – PB**. 2010, 81 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

OWNBY, C.L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 411-445, 1999.

PÁRAMO, L. et al. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 253, p. 452-61, 1998.

PEREIRA, M.E. et al. The amino acid sequence of Bothropstoxin-II, na Asp-49 Myotixin from *Bothrops jararacussu* (Jararacussu) venom with low phospholipase A₂ activity. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 17, n. 4, p. 381-386, 1998.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PUORTO, G.; FRANÇA, F.O.S. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD JR, V. (Orgs.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, 2003, 468p.

QUEIROZ, S.J. **Identificação da atividade antimicrobiana no veneno da serpente bothrops moojeni em bactérias gram negativas**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde). Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.

RADIS-BAPTISTA, G. et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochemistry Biophysics**, Totowa, v. 44, n. 3, p. 412-423, 2006.

RAMOS, L.S.N. et al. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 8, 2011.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Review: Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains, **Comparative Biochemistry and Physiology: Part C**, Oxford, v. 142, p. 328-346, 2006.

ROBERTO, P.G. et al. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein Journal**, Dordrecht, v. 4; p. 273-285, 2004.

ROCHA E SILVA M.; BERALDO W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 156, p. 261-273, 1949.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGES, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, Durham, v. 10, p. 475-489, 1983.

RODRIGUES-SIMIONI, L. et al. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 33, p. 1479-1489, 1995.

- ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 138p.
- ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos; serpentes, aranhas, escorpiões. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.951-962.
- SAMEL, M. et al. L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. **Comparative and Biochemistry and Physiology: Part B**, Oxford, v. 149, n. 4, p. 572-580, 2008.
- SAMY, R.P. et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 650-659, 2007.
- SAMY, R.P. et al. Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 216, n. 1, p. 54-68, 2008.
- SANDRIN, M.F.N.; PUORTO, G.; NARDI, R. Serpentes e acidentes ofídicos: um estudo sobre erros conceituais em livros didáticos. **Investigações em Ensino de Ciências**, Porto Alegre, v. 10, n. 3, p. 281-298, 2005.
- SANTAMARÍA, C. et al. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A₂ from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon**, Oxford, v. 45, p. 807–815, 2005.
- SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its groups numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.
- SCHOLAR, E.M.; PRATT, W.B., The inhibitors of cell wall synthesis, I. Mechanism of action of the penicillins, cephalosporins, vancomycin, and other inhibitors of cell wall synthesis. In: SCHOLAR, E.M., PRATT, W.B. **The Antimicrobial Drugs**. Oxford University Press, 2000, 607p.
- SEGREST, J.P. et al. Amphipatic Helix Motif: Classes and Properties. **Proteins**, New York, v. 8, p. 103-117, 1990.
- SELIGMAN, B.G.S. The use of anti-microbials in general practice. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v. 48, n. 2, p. 121-125, 2004.
- SKARNES, R.C. L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. **Nature**, London, v. 225, p. 1072-1073, 1970.
- SOARES, A.M. et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake

venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 373, p. 7-15, 2000.

SOARES, A.M. **Estrutura, Função, Mecanismo de Ação e Inibição das Miotoxinas Homólogas a Fosfolipases A₂ Isoladas de Venenos de Serpentes**. 2000. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, 2000.

SOARES, A.M. et al. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 387, p. 188-196, 2001.

SOARES, L.L.P. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão do fabricante. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1996. Curitiba, Brasil. **Anais...** Curitiba, 1996. p.27-36.

SONCINI, R. Controle de Salmonella enteritidis na avicultura. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 2002. Chapecó, SC, Brasil. **Anais...** Chapecó, 2002. p. 81-86.

SOUZA, A.V.C.; CRISTINA. Alternativas ao uso de promotores de crescimento em avicultura, **Poli-nutri**, 2003. Disponível em: <www.polinutri.com.br/upload/artigo/213.pdf>. Acesso em: 15 fev 2013.

SPENCER, P.J. et al. A single-step purification of bothropstoxin-1. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 9, p. 125-1127, 1998.

STÁBELI, R.G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STARR, M.P.; REYNOLDS, D. M. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. **Proceedings of the 51st General Meeting**. Society of American Bacteriology, p. 15-34, 1951.

STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian King Brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 29, p. 1129-1141, 1991.

STOCKER, J.F.; TRAYNOR, J.R. The action of various venoms on *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 61, n. 5, p. 383-388, 1986.

STOKSTAD, E.L.R.; JUKES, T.H. Growth promoting effect os aureomycin on turkey poults. **Poultry Science**, College Station, v. 29, p. 611-612, 1950.

SWANN, M.M. Report of Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. **Her Majesty's Stationery Office** (HMSO), London, v. 791, 1969.

TEIXEIRA, C.F. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

TICLI, F.K. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma L-Aminoácido Oxidase do Veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua Ação Antitumoral, Antiparasitária e Bactericida**. 2006. 94 f. Tese (Doutorado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

TU, A.T. **Venoms: chemistry and molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1977, 560pp.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual UBABEF 2012**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>>. Acesso em: 18 janeiro 2013.

UETZ, P. **The Reptile Database**, 2012. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso em 15 fev 2013.

VALENTIN, E.; LAMBEAU G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, 2000.

VAN DEENEN, L.L.M.; DE HAAS, G.H. The substrate specificity of phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 70, p. 538-553, 1963.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e química medicinal moderna, **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, 326-337, 2006.

WARD, R.J. et al. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Gene**, Amsterdam, v.156, p. 305-306, 1995.

WARD, R.J.; AZEVEDO JR., W.F.; ARNI, R.K. At the interface: crystal structures of Phospholipases A₂. **Toxicon**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1623-1633, 1998.

WARRELL, D.A. Venomous bites and stings in the tropical world. **Medical Journal of Australia**, v. 159, n 11-12, p. 773-779, 1993.

WARRELL, D.A. Venomous bites, stings, and poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v.26, n.2, p.207-223, 2012.

WHITE, J. Bites and stings from venomous animals: a global overview. **Therapeutic drug monitoring**, New York, v. 22, n. 1, p. 65-8, 2000.

WHO – WORD HEALTH ORGANIZATION. The medical impact of antimicrobial use in farm animals. WHO/EMC/ZOO/97.4, **Report of a WHO Meeting**, Berlim, Germany, 13-14 October, 1997. p.1-24. Disponível em: <<http://www.who.int/emc.html>>. Acesso em 12 janeiro 2013.

WITTCOFF, H. **The Phosphatides**. Princeton, New Jersey: Van Nostrand-Reinhold. 1951.

YANG, C.A. et al. Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS 323. **FEBS Journal**, Oxford, v. 278, p. 3381–3394, 2011.

YUAN, Y. et al. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A₂: a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 70, n. 6, p. 471-481, 1993.

ZHONG, S.R. et al. Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 763-771, 2009.

Capítulo II – Antimicrobial activity of BthTx-I: Perspectives in aviculture

Antimicrobial activity of BthTx-I: Perspectives in aviculture

Antimicrobial activity of BthTx-I in aviculture

Ana Carolina Portella Silveira^{a*}, Sarah Natalie Cirilo Gimenes^a, Roberta Torres de Melo^b, Letícia Ríspoli Coelho^b, Mário Sérgio Rocha Gomes^a, Letícia Eulálio Castanheira^a, Daiana Silva Lopes^a, Paulo Fernando Alves de Freitas^b, Ednaldo Carvalho Guimarães^b, Daise Aparecida Rossi^b, Robson Carlos Antunes^b, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila^a, Maria Inês Homs Brandeburgo^a

^aInstituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU

Av. Pará, 1720, Campus Umuarama - 2E 32A, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil.

^bFaculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil.

* Corresponding author Tel +55 34 9231-4662.

E-mail address: anacarolinaportella@gmail.com (A. C. P. Silveira)

Abstract: The purpose of this study was to select the venom with the best potential to inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains of importance in aviculture to provide alternative performance improvers for broiler diets from among the venoms of *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, and *Crotalus durissus terrificus* of the *Viperidae* family and to identify the fraction of the venom showing activity. The Mueller-Hinton Agar disc-diffusion and broth microdilution methods were used according to standard techniques. Toxicity was evaluated by measuring the viability of endothelial cell cultures using the MTT assay. The *Bothrops jararacussu* venom demonstrated the most effective inhibition of the growth of the tested bacteria. This venom was then fractionated by chromatography on CM-Sepharose to determine which of its fraction(s) showed antimicrobial activity. The main toxin, lys49 phospholipase A₂ BthTx-I, was determined to be the best candidate because it showed little to no toxicity against cells at doses lower than the minimum inhibitory concentration; suppressed the growth of intestinal bacteria of interest in aviculture; and as a protein, does not promote residues in animal meat.

Keywords: Antimicrobial activity; *Bothrops jararacussu*; Broilers; BthTx-I; Performance Improver; Snake venom

1. Introduction

The current commercial broiler production system consists of chicks grown in an incubation system with efficient sanitary control, which has improved productivity in the industry. However, this system delays the establishment of the chick's intestinal microbiota, which leaves them susceptible to microorganisms, particularly enteric and respiratory pathogens, which adversely impact production performance (Ramos et al., 2011).

These sanitary issues are partially mitigated with the use of feed additives, currently referred to as performance improvers (Brasil, 2004). These additives consist of antibiotics at doses lower than the minimum inhibitory concentration (MIC) and are used to control the undesirable growth of certain microbial populations. These supplements reduce the secretion of toxic substances by the pathogenic bacteria and inflammation of the intestinal epithelium and produce an intestinal microbiota microenvironment that favors beneficial bacteria, thus promoting better nutrient absorption (Souza; Cristina, 2003).

There is concern that the prolonged use of antibiotics could result in increases in the prevalence of antibiotic-resistant bacterial strains in both animals and humans. Antibiotic residues have been detected in animal products destined for human consumption (Cervantes, 2005). Therefore, the use of antibiotics as performance improvers in animal nutrition has been gradually banned in several countries. The development of alternatives is required to meet the demands of a market valued at billions of dollars every year.

A good performance improver should survive adverse conditions in the gastrointestinal tract; it should be non-toxic and non-pathogenic for both humans and animals; it should be stable during storage and remain effective for long periods of time under normal storage conditions; and finally, it should suppress the growth of undesirable intestinal bacteria and provide beneficial effects to the hosts (Jin et al., 1997).

Snake venoms may represent alternatives to traditional antibiotics as performance improvers. These venoms are complex substances consisting primarily of proteins and peptides, which account for 90-95% of their dry weight (De Lima et al., 2005). Low concentrations of one or more active substances

isolated from these venoms have shown interesting pharmacological effects, including bactericidal action. Such effects have been described by several authors using distinct snake venoms, bacteria, and doses (Páramo et al., 1998; Ferreira et al., 2011).

The purpose of this study was therefore to select the toxin with greatest potential for inhibition of the growth of bacteria among venoms from six snakes of the *Viperidae* family (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, and *Bothrops jararacussu*) for use in aviculture. The most effective venom was then fractionated to determine the main protein(s) with the best potential as an alternative performance improver in broiler diets.

2. Materials and methods

2.1 Snake venoms

Venoms from six snake species of the *Viperidae* family were used: *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, and *Bothrops jararacussu*. The venoms were obtained from specimens kept at the Bioagents serpentarium (Batatais-SP).

To test the antimicrobial activity of each venom, approximately 2 mg of the venom was dissolved in 1.0 mL of 0.9% saline solution. Next, the samples were centrifuged at 10 000 x g for 10 min at a temperature of 4°C, and the supernatant was used in further experiments. The protein concentration of each supernatant was determined using the Bradford method (Bradford, 1976).

2.2 Bacteria

Strains of the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and Gram-negative *Escherichia coli* (ATCC 25922) were provided by the Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Reference Microorganisms Laboratory of the National Institute of Quality Control in Health – INCQS) from Fundação Osvaldo Cruz

(Oswaldo Cruz Foundation), located in Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. And the Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) and the Gram-negative bacteria *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) were supplied by the Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (Applied Animal Biotechnology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Uberlândia – FAMEV-UFU), located in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. All strains were originally obtained from the American Type Culture collection.

The samples containing *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) broth for 24 h in an incubator at 36°C.

2.3 Antimicrobial activity by disc-diffusion of snake venom

Testing was carried out with the Mueller-Hinton Agar disc-diffusion method, in accordance with standard technique (NCCLS, 2003). The snake venoms were evaluated at 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, and 2.0 mg/mL concentrations prepared as described. All tests were conducted in triplicate. Amoxicillin was used as a positive control and a solution of 0.9% saline served as the negative control.

2.4 Antimicrobial activity by broth microdilution of fractions and determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The reference strains of bacteria were cultivated in 7 mL of Mueller-Hinton medium with agitation at 37°C. When the optical density at 600 nm reached a value of 1.0, each initial bacterial suspension was diluted (1:50 for Gram-negative bacteria and 1:100 for Gram-positive bacteria) in fresh Mueller-Hinton medium. A volume of 50 µL of each bacterial culture (containing from 2 to 7 x 10⁵ CFUs depending on the bacterial strain employed) was incubated with 50 µL of a venom sample [a proportion of 1:1 (v/v)], in sterile 96-well flat bottom microtiter plates. Venom stocks concentrations of 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.12 µg/mL, and 1.56 µg/mL were evaluated.

Sterile culture medium (100µL) was used as the control for the absence of bacterial growth, and a sample containing 50 µL of the bacterial suspension and 50µL of the sterile culture medium was used as the control indicating maximum growth. After incubation for a period of 22 hours at 37°C, the plates were analysed at 595 nm in a microplate reader model 3550 UV (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

All tests were conducted in duplicate, and the MIC was defined by the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation (ANDREWS, 2001).

2.5 Fractioning of the B. jararacussu venom

Approximately 200 mg of snake venom from *B. jararacussu* was suspended in 2.0 mL of 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (AMBIC), pH 7.8. The sample was centrifuged at 10000 x g for 10 min at a temperature of 4°C, and the supernatant was applied to an ion exchange column (2 x 20 cm) containing CM-Sepharose resin, which was previously equilibrated with the same buffer. Next, the column was eluted at room temperature with a linear gradient from 0.05 to 0.5 M of the AMBIC pH 7.8 buffer using a mixing chamber with a volume of 150 mL. Fractions of 2.0 mL/tube were collected using a REDIFRAC fraction collector (Amersham Biosciences®) at a flow rate of 13.3 mL/hour. The absorbance of each collected fraction was read at 280 nm in an Ultrospec 1000UV/Visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech®). Once the chromatogram was plotted, the peaks were identified, the fractions corresponding to the peaks were pooled, and the pooled solutions were frozen, lyophilized, and stored at -20°C. The antimicrobial activity of the collected peaks was tested as described above at concentrations of 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.12 µg/mL, and 1.56 µg/mL.

2.6 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) under native conditions

PAGE for basic proteins was conducted in accordance with the technique previously presented in detail (Andrião-Escarso et al., 2000). The electrophoresis was conducted for 57 min at 20 mA. The gel was stained with 2.5% Coomassie

Brilliant Blue R-250 for 10 min and then destained in 10% acetic acid/30% ethanol in deionized water.

2.7 Cell viability

A murine endothelial cell line derived from a thymus hemangioma (tEnd) (Bussolino et al., 1991) was cultured in RPMI1640 medium containing 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 60 µg/mL gentamicin, and incubated at 37°C and 5% CO₂, under standard procedures.

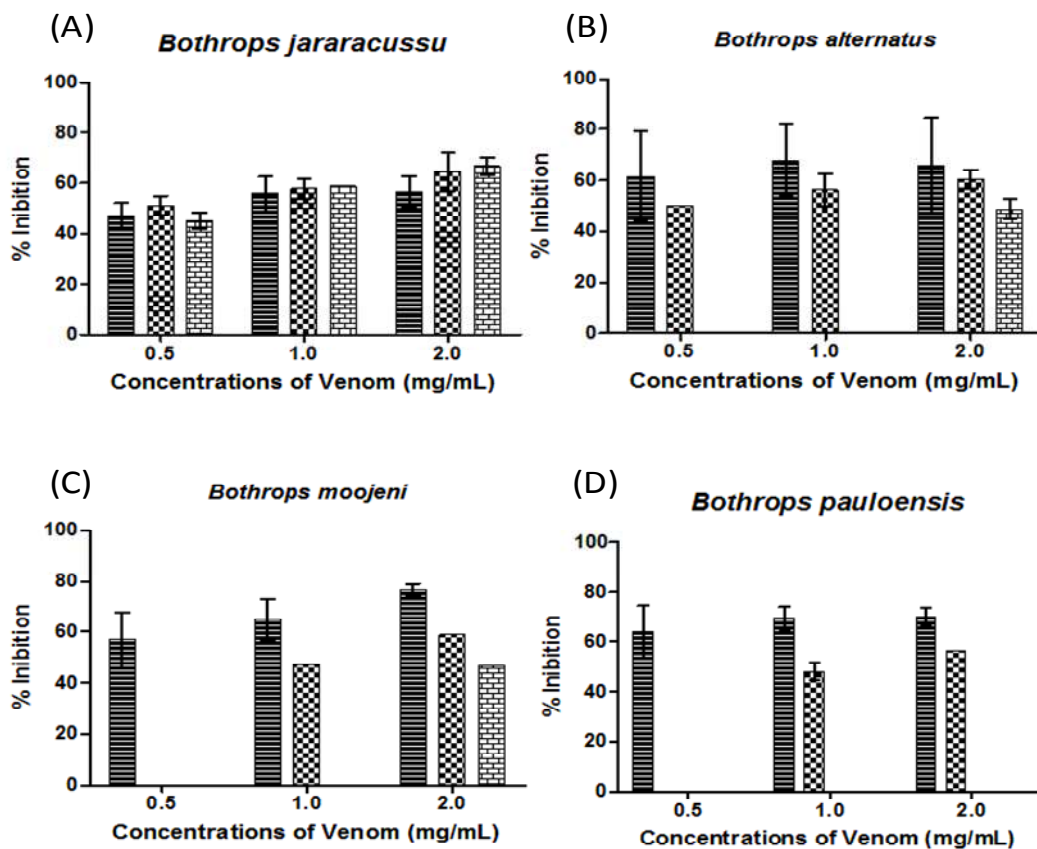
The viability of the cell cultures treated with the sample was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The cells were seeded at 5×10^4 cells per well in 96-well microplates. After 24 h, the medium was replaced with medium containing the sample (250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.2 µg/mL, 15.6 µg/mL, and 7.8 µg/mL) or control (PBS (phosphate buffered saline) 1:10 in culture media). After 6 or 24 h, the cells were incubated with 5 mg/mL MTT for 3 h at 37°C. The formazan crystals resulting from the MTT reduction were dissolved by the addition of 100 µL of PBS containing 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) and 0.01 M HCl (18 h, 37°C and 5% CO₂). The absorbance was read on a multiwell scanning spectrophotometer (ELISA reader) using a 570 nm filter.

2.8 Statistical analysis

To verify statistically significant differences between factors and interactions, an analysis of variance using a completely randomized, factorial design was conducted: 3 doses x 4 bacteria x 6 snake venoms with three repetitions and 8 doses x 4 bacteria x 6 fractions of *B. jararacussu* with two repetitions. The Scott-Knott test was used to compare the means. All analyses were carried out using SISVAR software with the significance set at 5%.

3. Results

The data for the bactericidal action of the venoms are presented in Figure 1. The results for *E. faecalis* bacterium are not included because none of the venoms was able to inhibit its growth at any of the tested concentrations. The size of each halo was divided by the size of the halo of the positive control: this ratio was designated “% inhibition.” Only *B. jararacussu* was able to inhibit the growth of three out of the four bacteria assayed at all three concentrations tested, while *B. moojeni* and *B. alternatus* were only able to prevent the growth of *E. coli* at 2.0 mg/mL. *B. pauloensis* and *B. jararaca* only inhibited *S. enteritidis* at 1.0 mg/mL and 2.0 mg/mL concentrations, and *C. d. terrificus* was only effective against *S. enteritidis* at 2.0 mg/mL. The differences among venoms and target bacteria were statistically significant. Thus, the *B. jararacussu* venom showed the broadest inhibition spectrum for the tested bacteria.



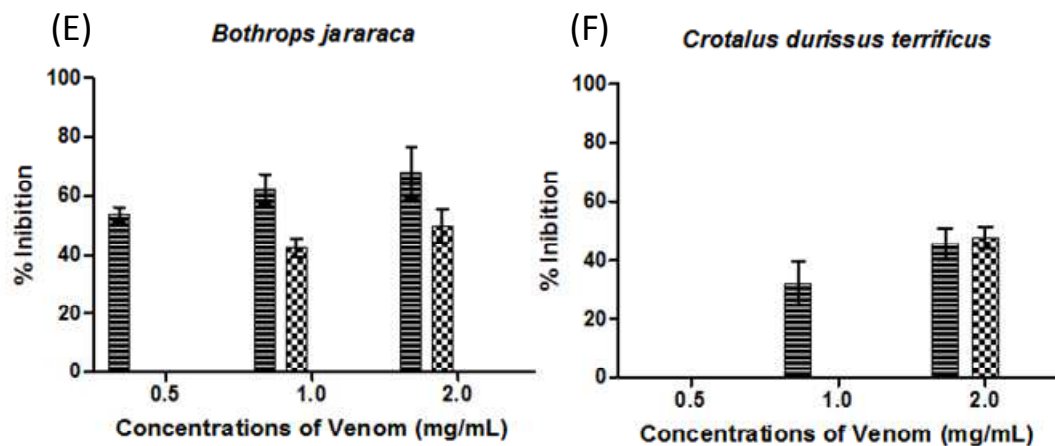


Figure 1. Antibacterial activity in disk-difusion assay: (A) *B. jararacussu* (B) *B. alternatus* (C) *B. moojeni* (D) *B. pauloensis* (E) *B. jararaca* (F) *C. d. terrificus*. *S. aureus* (▨); *S. enteritidis* (▩); *E. coli* (▧). The values represent mean \pm SEM of independent assay realized in triplicate.

The MICs against the four types of bacteria were determined for each venom. The venom from *B. jararacussu* showed the smallest values (Table 1). It was not possible to determine the MIC of the venoms from *C. d. terrificus*, *B. jararaca*, and *B. pauloensis* for the *E. coli* bacterium, due to the absence of bactericidal activity against this strain (MIC > 2.0 mg/mL).

Table 1. Minimum inhibitory concentration, in mg/mL, of venoms from snakes of the *Viperidae* family for inhibition of *S. aureus*, *S. enteritidis*, and *E. coli* growth

Snake Venom	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. durissus terrificus</i>	1,0mg/mL	2,0mg/mL	-
<i>B. jararaca</i>	0,5mg/mL	1,0mg/mL	-
<i>B. pauloensis</i>	0,5mg/mL	0,5mg/mL	-
<i>B. moojeni</i>	0,25mg/mL	1,0mg/mL	2,0mg/mL
<i>B. alternatus</i>	0,5mg/mL	0,5mg/mL	2,0mg/mL
<i>B. jararacuçu</i>	0,25mg/mL	0,5mg/mL	0,5mg/mL

In the present study, *B. jararacussu* venom was statistically demonstrated to be the most effective against three of the bacterial strains tested over the three doses evaluated. Therefore, this species' venom was separated into fractions by chromatography, to isolate the fraction or fractions with the greatest antimicrobial activity. Six distinct fractions were obtained by chromatographic separation with the CM-Sepharose column (Figure 2). These fractions were assayed for their

capacity to inhibit the growth of the same strains of bacteria tested using the unfractionated snake venom.

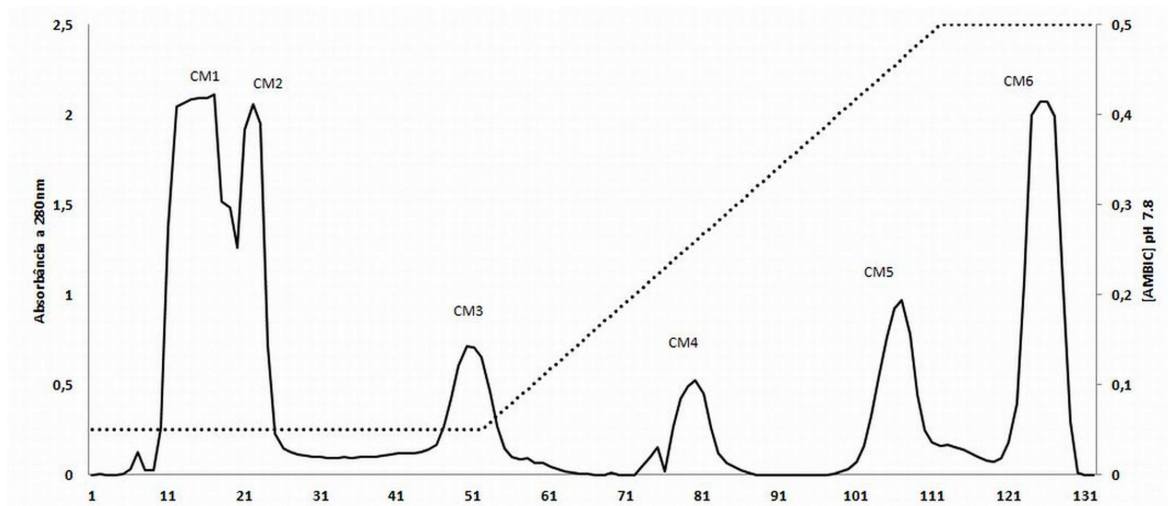
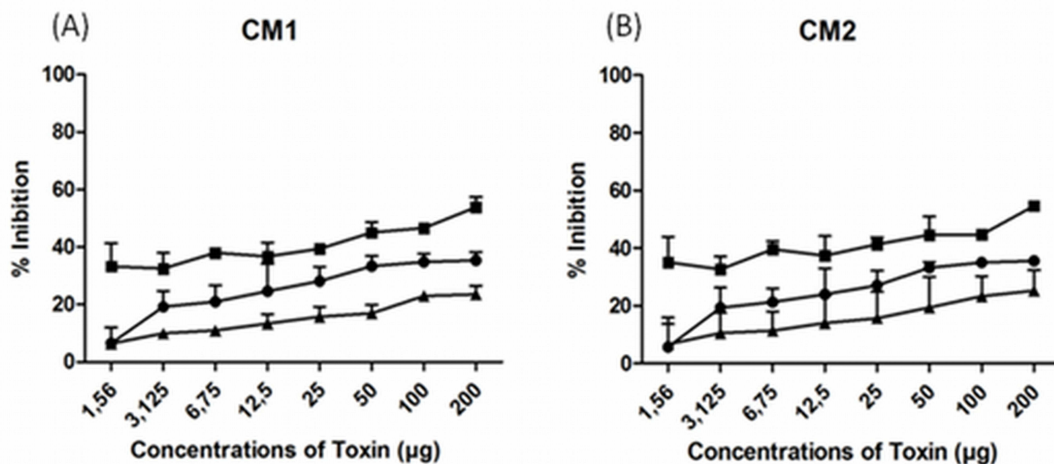


Figure 2. Chromatography (CM-Sepharose (20 x 2 cm), ammonium bicarbonate elution buffer 0.05 M and pH 7.8) of 200 mg of *Bothrops jararacussu* venom. The sample was eluted in continuous gradient up to 0.5 M of the same buffer. Fractions of 2.0 mL/tube were collected at room temperature and absorbance was read at 280 nm.

All peaks showed bactericidal activity, but the CM6 peak was significantly more effective than the others (Figure 3). The MIC values for the fractions are presented in Table 2. The electrophoretic profile of the CM6 fraction showed a single band with molecular weight of approximately 14 kDa (Figure 4).



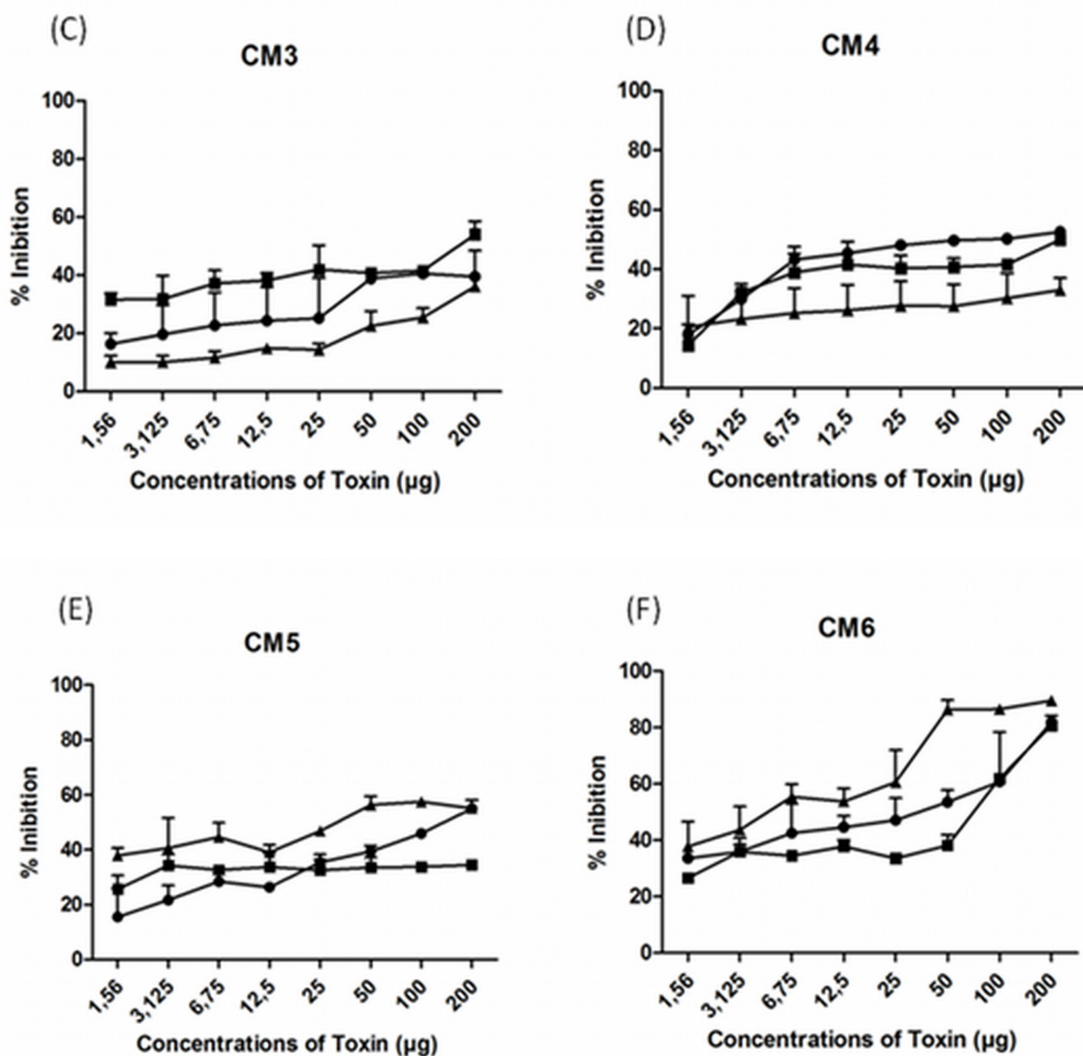


Figure 3. Broth Microdilution Antibacterial Assay at fractions from *B. jararacussu* venom: (A) CM1 (B) CM2 (C) CM3 (D) CM4 (E) CM5 (F) CM6. *S. aureus* (●); *S. enteritidis* (▲); *E. coli* (■). The values represent mean \pm SEM of independent assay realized in duplicate.

Table 2. Minimum inhibitory concentration, in $\mu\text{g}/\text{mL}$, of fractions of *B. jararacussu* venom for *S. aureus*, *S. enteritidis*, and *E. coli* growth inhibition

Snake Venom	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
CM1	-	-	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CM2	-	-	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CM3	-	-	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CM4	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
CM5	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-
CM6	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

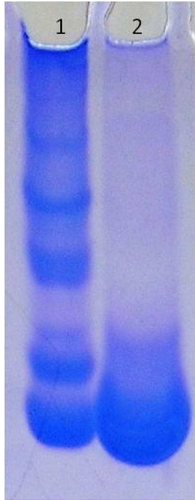


Figure 4. Electrophoresis in polyacrylamide gel (12%) in native conditions of the CM6 fraction obtained from chromatography in CM-sepharose: 1- *Bothrops jararacussu* venom 2- CM6 fraction. Flow time of 57 min at 20 mA. The gel was colored with Coomassie Brilliant Blue R-250 at 2.5% for 10 min and then discolored in acetic acid 10%, ethanol 30%, and deionized water.

The cytotoxic activity of CM6 peak was determined using endothelial cells (tEnd) at doses of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 6 and 24 hours (Figure 5). After 6 hours, the protein caused a significant reduction in cell viability at doses of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with morphologic damage to the cells, including membrane rupture and cellular lysis, when compared to the control. After 24 hours, in addition to the doses causing damage at 6 hr, the 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations also caused significant cellular damage.

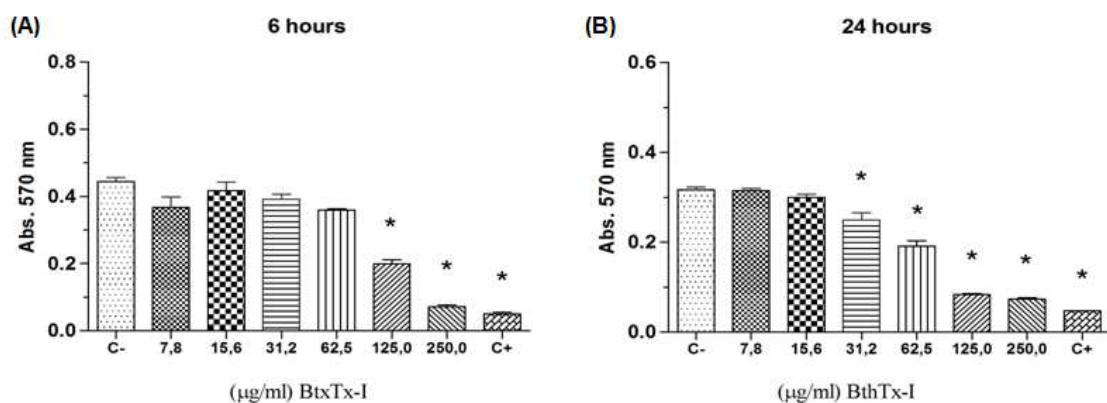


Figure 5. Cytotoxic effect of different concentrations of BthTx-I on tEnd cells: (A) at 6h. (B) at 24h. The graph presents mean \pm SEM. C- Negative control; C+ Positive control

4. Discussion

To be employed as performance improvers, venoms from snakes of the *Viperidae* family should prevent the excessive growth of undesirable intestinal bacteria as *S. aureus*, *E. coli*, and *S. enteritidis*. Overall, the tested venoms showed dose-dependent action, i.e., the dose used was directly related to its effects. Concentration dependence is one of the best indicators of the bactericidal capacity of a drug. Thus, antibiotics with concentration-dependent bactericidal activity will only achieve the maximal bactericidal effect at concentrations above the MIC, usually around five or ten times the MIC (Seligman, 2004).

The assayed venoms were unable to prevent the growth of Gram-positive *Enterococcus faecalis* at any of the tested concentrations. However, this bacterium is part of the normal microbiota of broilers (Salanitro et al., 1978) and some strains have been used for a variety of beneficial purposes in broiler nutrition, including the production of probiotics used as dietary supplements and foods that help to treat conditions such as infectious diarrhea. Probiotic species belonging to *Enterococcus* are very resistant to the surrounding conditions and have high viability (Nováková et al., 2010). Along with some other bacteria, they have shown beneficial effects on broiler performance, modulation of intestinal microbiota and pathogen inhibition, immunomodulation, and intestinal histological changes and improve the sensory characteristics of broiler meat and promote meat quality of broilers (Kabir, 2009).

The venom from *B. jararacussu* showed the smallest values for MIC. Previous studies have confirmed a linear relationship between the inhibition halos and the logarithm of the MIC values, demonstrating that the inhibition halo is inversely proportional to the antimicrobial's MIC (Brasil, 2004).

These results suggest that the venoms from snakes of the *Viperidae* family are promising sources of antimicrobial molecules. Identification of these molecules, which may include peptides with therapeutic potential (De Lima et al., 2005), may provide important options for the production of powerful antibiotics against bacteria resistant to multiple distinct classes of antimicrobial agents. Such resistant strains are frequently related to hospital infections and more recently to community infections (Queiroz, 2010).

Some previous studies have demonstrated a dose-dependent relationship for the antibacterial activity of functional proteins found in snake venoms against distinct bacteria species (Stábeli et al., 2004). Fraction CM6 is Bothropstoxin-I (BthTx-I), first described and characterized by Homsí-Brandeburgo et al. (1988), who combined gel filtration chromatography on Sephadex G-75 with ion exchange chromatography on SP-Sephadex C-25 to purify this protein. BthTx-I comprises 15% of the proteins of the whole venom. This protein is an Lys-49 phospholipase A₂ consisting of a single polypeptide chain with 121 amino acids and a molecular mass of approximately 13.8 kDa (Homsí-Brandeburgo et al., 1988). These results are consistent with those of Andrião-Escarso et al. (2000), who fractionated the *B. jararacussu* venom in a manner similar to that in the present study.

Phospholipases A₂, including BthTx-I (Páramo et al., 1998; Soares et al., 2000), show lytic effects on the phospholipids of the plasma membranes of both Gram-positive and Gram-negative bacteria (De Lima et al., 2005; Ferreira et al., 2011). Nevertheless, this protein was unable to prevent the growth of *Enterococcus faecalis* at any of the concentrations assayed in this study. This negative result suggests that the venom's antibiotic activity is modulated by bacterial diversity, in particular the structures of the external membranes and cell walls (Ferreira et al., 2011).

The antimicrobial mechanism of action for PLA₂s has not yet been fully elucidated, but it is known that catalytic activity is not necessary for some of its pharmacologic properties (Lomonte et al., 1994; Páramo et al., 1998; Valentin and Lambeau, 2000). Some evidence suggests that these activities are mediated by interactions between the venom PLA₂s and endogenous PLA₂ receptors on the membranes of the target cells (Segrest et al., 1990). Alternatively, positively charged groups of residues found on the surface of certain proteins and peptides may interact with biologic membranes to form structures able to penetrate the lipid bilayer (Ward et al., 1998).

In the PLA₂s Lys49 enzymes isolated from venoms of the *Viperidae* family, the C-terminal domain (residues 115-129) includes a high density of positively charged residues, as well as three or four aromatic amino acids (Santamaría et al., 2005). These structures may be important for the bactericidal effect on both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Páramo et al., 1998; Chioato and Ward,

2003). Chiato and Ward (2003) showed that the amino acids in the C-terminal region of the BthTx-I from *Bothrops jararacussu* contribute to the myotoxic domain and mediate the membrane-damaging mechanism. The presence of combinations of basic and hydrophobic amino acids next to the molecule's C-terminal region, which encompasses residues 115-129 (Páramo et al., 1998), may partially explain these effects.

Studies describing the bactericidal activity of PLA₂s-Lys49 have been performed, but there is not a consistent model that explains these effects (Aragão et al., 2008). Freer et al. (1996) proposed a mechanism similar to that of other cationic peptides, in which the lateral chains of the peptide's cationic residues compete with metal ions associated with negatively charged groups on the bacteria's surfaces. The larger volume of the peptides relative to that of the metal ions destabilizes the membrane, allowing the insertion of the peptide's hydrophobic domain into the lipid bilayer. This would cause permeabilization of the membrane and cell death.

The venom is main protein, BthTx-I, is a protein with low molecular mass and seven disulfide bonds (Burke and Dennis, 2009). These features contribute to its stable at physiological pH and temperature. The three-dimensional structure of the protein is maintained by attractive forces including hydrogen bonds and Van der Waals forces among the amino acid side chains and by covalent bonds between the sulfhydryl groups of the Cys moieties. Because the disulfide bridges are covalent bonds and much more difficult to break than the weak interactions of hydrogen bonding and Van der Waals forces, larger numbers of disulfide bridges present in a protein provide greater stability.

A good performance improver should be non-toxic and non-pathogenic for both humans and animals. Despite its relative cytotoxicity, further investigation of BthTx-I for these purposes is appropriate because efficient bactericidal activity was observed at 62.5 µg/mL, a concentration at which it induced less than 40% damage to cells at 24h. Importantly, agents used as performance improvers are generally employed at concentrations lower than the MIC.

5. Conclusion

Snake venoms from the *Viperidae* family show significant antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Of the venoms evaluated in the present study, the *B. jararacussu* venom demonstrated the lowest MIC for the largest number of bacterial strains. The most effective bactericidal component of this venom was the A₂ lys49 BthTx-I phospholipase.

Under the conditions evaluated in this study, BthTx-I as appears to be the best candidate for an alternative performance improver in broilers because it showed little to no toxicity against cells at doses lower than the MIC; demonstrated an antagonistic ability against intestinal bacteria of interest in aviculture; is stable under a wide range of pH and temperature conditions; and as a protein, does not promote residues in animal meat.

References

Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48:5-16.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Ângulo Y, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. 2000. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755–763.

Aragão EA, Chioato L, Ward RJ. 2008. Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, A LYS49 phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 51, 538–546.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 2248–2254.

Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de

Saúde. Available at: www.anvisa.gov.br/servicos/medicamentos/manuais/microbiologia.asp. Accessed February 20, 2012.

Burke JE, Dennis EA. 2009. Phospholipase A₂ Biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49–59.

Bussolino F, De Rossi M, Sica A, Colotta F, Wang JM, Bocchietto E, Padura IM, Bosia A, DeJana E, Mantovani A. 1991. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. *J. Immunol.* 147, 2122–2129.

Cervantes H. 2005. Assessing the results of the European Union ban of antibiotics feed additives. In: *Proceedings, 32nd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference, North Carolina*, pp. 26–27.

Chioato L, Ward RJ. 2003. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon* 42, 869–883.

De Lima DC, Abreu PA, Freitas CC, Santos DO, Borges RO, Santos TC, Cabral LM, Rodrigues CR, Castro HCC. 2005. Snake venom: any clue for antibiotics and CAM? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 39–47.

Ferreira BL, Santos DO, Santos AL, Rodrigues CR, Freitas CC, Cabral LM, Castro HC. 2011. Comparative analysis of Viperidae venoms antibacterial profile: a short communication for proteomics. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011. doi: 10.1093/ecam/nen052

Freer E, Moreno E, Moriyon I, Pizarro-Cerda J, Weintraub A, Gorvel JP. 1996. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native counterparts. *J. Bacteriol.* 178, 5867–5876.

Homsí-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santos-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of botropstoxin. *Toxicon* 26, 615–627.

Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. 1997. Probiotics in poultry: modes of action. *Worlds Poult. Sci. J.* 53, 351–368.

Kabir SM. 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3531–3546.

Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarama M. 1994. Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modelling. *J. Biol. Chem.* 269, 29867–29873.

NCCLS. 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard Eighth Edition. NCCLS, Wayne, PA.

Nováková I, Kačániová M, Arpášová H, Haščík P, Kunová S, Čuboň J. 2010. Antibiotic resistance of enterococci and coliform bacteria in dairy products from commercial farms. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 43, 307–309.

Páramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerdá J, Bengoechea JA, Gorvel JP, Moreno E. 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom-synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253, 452–461.

Queiroz SJ. 2010. Identificação da atividade antimicrobiana no veneno da serpente *Bothrops moojeni* em bactérias gram negativas. Dissertation. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO.

Ramos LSN, Lopes JB, Silva SMMS, Silva FES, Ribeiro MN. 2011. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. *Rev. Bras. Zootecn.* 40, 1738–1744.

Salanitro JP, Blake IG, Muirhead PA, Maglio M, Goodman JR. 1978. Bacteria isolated from the duodenum, ileum and caecum of young chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 782–790.

Santamaría C, Larios S, Angulo Y, Pizarro-Cerda J, Gorvel J, Moreno E, Lomonte B. 2005. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A₂ from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. *Toxicon* 45, 807–815.

Segrest JP, de Loof H, Dohlman JG, Brouillette CG, Anantharamaiah GM. 1990. Amphipatic helix motif: classes and properties. *Proteins* 8, 103–117.

Seligman BGS. 2004. The use of anti-microbials in general practice. *Rev. AMRIGS* 48, 121–125.

Soares AM, Andrião-Escarso SH, Angula Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Marangoni S, Toyama MH, Arni RK, Giglio JR. 2000. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 7–15.

Souza AVC, Cristina. 2003. Alternativas ao uso de promotores de crescimento em avicultura. Available at: <http://www.polinutri.com.br/upload/artigo/213.pdf>. Accessed February 8, 2013.

Stábeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RCL, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR. 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg. Medic. Chem.* 12, 2881–2886.

Valentin E, Lambeau G. 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488, 59–70.

Ward RJ, Rodrigues Alves A, Rugierro Neto J, Arni RK, Casari J. 1998. A SequenceSpace analysis of Lys49 phospholipases A₂: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Eng.* 11, 285–294.

**Capítulo III – BthTx-I como
melhorador de desempenho
alternativo em frangos de corte**

BthTx-I como melhorador de desempenho alternativo em frangos de corte

BthTx-I as alternative performance improver in broilers

Ana Carolina Portella Silveira^{a*}; Sarah Natalie Cirilo Gimenes^a; Luiz Fernando Barbaresco^b; Carolina Magalhães Caires Carvalho^c; Edison Magalhães Filho^c; Camila Perdoncini Carvalho^d; Régis Kamimura^d; Bernardo José Rezende^c; Julyana Machado da Silva Martins^c; Evandro de Abreu Fernandes^c; Marcelo Emílio Beletti^d; Antônio Vicente Mundim^c; Humberto Eustáquio Coelho^e; Mara Regina Bueno Mattos^c; Ednaldo Carvalho Guimarães^c; Robson Carlos Antunes^c; Veridiana de Melo Ávila Rodrigues^a; Maria Inês Homs Brandeburgo^a

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU
Av. Pará, 1720, Campus Umuarama - 2E 32A, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil.

^b Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil.

^d Laboratório de Técnicas Histológicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil

^e Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdades Associadas de Uberaba, FAZU, Uberaba, MG, Brazil.

* Corresponding author: E-mail address: anacarolinaportella@gmail.com (A. C. P. Silveira)

Resumo

Na produção de frangos de corte utiliza-se antimicrobianos em subdosagens como melhoradores de desempenho, que vem sendo banidos em vários países, pela possibilidade de resistência em humanos e animais. São necessárias alternativas, das quais a BthTx-I, uma fosfolipase A₂ Lys 49 oriunda da peçonha de *Bothrops jararacussu*, é candidata, pois apresenta atividade antimicrobiana em bactérias de importância na avicultura. Avaliou-se a BthTx-I como um melhorador de desempenho alternativo em frangos de corte por meio de parâmetros zootécnicos, microbiológicos, bioquímicos e histológicos. Utilizou-se 84 frangos de corte dos 21 aos 28 dias, divididos em três tratamentos sendo: um com inclusão de bacitracina de zinco na ração, outro com a adição de BthTx-I e o terceiro sem melhorador de desempenho. Microbiologicamente, a BthTx-I diminuiu a população microbiana em relação aos demais grupos nos swabs cloacais. Não se observou diferenças significativas no desempenho zootécnico, na composição química das carcaças e na histomorfometria intestinal. Na bioquímica sérica, a creatinina foi maior no tratamento com BthTx-I em relação ao

grupo controle, porém dentro da normalidade. A BthTx-I consolida-se como uma candidata a um melhorador de desempenho alternativo, pois conseguiu atuar em nível intestinal, diminuindo a carga microbiana de bactérias potencialmente patogênicas e sem causar lesões musculares, renais e hepáticas nos frangos.

Palavras-chave: Avicultura; *Bothrops jararacussu*; Fosfolipases A₂; Peçonhas de serpentes; Promotor de crescimento

1. Introdução

O Brasil consolidou-se como terceiro maior produtor e o maior exportador de carne de frango do mundo, movimentando cerca de 8,2 bilhões de dólares em 2011 (UBABEF, 2012). Para atingir esse patamar e visando economias de escala e redução nos custos de produção, grandes investimentos vêm sendo realizados em material genético, instalações e equipamentos, manejo, nutrição e sanidade (MENDES; SALDANHA, 2004; BELLAVÉR, 2005).

Nesta cadeia produtiva, parte dos problemas sanitários é minimizada pelo uso de antimicrobianos e quimioterápicos em dosagens muito menores que as recomendadas para fins terapêuticos. Conhecidos como promotores de crescimento e, atualmente caracterizados como melhoradores de desempenho (BRASIL, 2004), eles promovem o crescimento e/ou a eficiência alimentar e previnem e/ou controlam as doenças que afetam os animais. Em geral, aceita-se que a ação benéfica desses compostos é resultado da alteração seletiva da população microbiana intestinal (BELLAVÉR, 2005).

Entretanto, estes produtos vêm sendo banidos da alimentação animal com o intuito de satisfazer a necessidade de assegurar também a qualidade e a inocuidade da carne de frango, pela possibilidade da presença de seus resíduos na carne e derivados e pela indução da resistência cruzada para bactérias que são patógenas para humanos (RUTZ; LIMA, 2001). De fato, há evidências de que os genes de resistência a antimicrobianos podem ser e são transmitidos dos animais para a microbiota humana (GREKO, 2001). Assim, torna-se imprescindível a busca por alternativas naturais para atender a demanda e manter a viabilidade da cadeia produtiva.

Neste contexto, as peçonhas ofídicas tornam-se candidatas, pois são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas e peptídeos, chegando a compor de 90-95% do seu peso seco e; em pequenas proporções apresentam carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos (MEIER, 1990; DE LIMA et al., 2005). O isolamento de uma ou mais substâncias ativas destas peçonhas podem apresentar efeitos farmacológicos de interesse na pesquisa de medicamentos, dentre elas a atividade bactericida já comprovada na literatura por diversos autores em variadas doses, bactérias e toxinas.

Dentre as toxinas já avaliadas, a proteína BthTx-I , uma fosfolipase A₂ Lys 49 isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (jararacuçu), mostrou-se eficiente na inibição do crescimento tanto de bactérias gram-negativas quanto de gram-positivas de importância na avicultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a BthTx-I como um melhorador de desempenho alternativo em frangos de corte por meio de parâmetros zootécnicos, microbiológicos, bioquímicos e histológicos.

2. Material e métodos

2. 1. Local e Período de realização

O experimento, previamente aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal da UFU, protocolo número 040/12, foi conduzido na granja de experimentação de aves sem ambiente controlado, da Fazenda do Glória da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, Minas Gerais em setembro de 2012.

2.2 Bothropstoxina I (BthTx-I)

A fosfolipase A₂ lys49 BthTx-I obtida a partir do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* por cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose (ANDRIÃO-ESCARSO, 2000) foi fornecida pelo Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia.

2.3 Animais

Utilizou-se 84 pintos de corte de 21 dias de idade, adquiridos em uma granja comercial de Uberlândia, Minas Gerais, que foram alojados em 21 gaiolas com quatro aves em cada e uma densidade de 625 cm²/ave.

2.4 Delineamento experimental

O experimento iniciou-se a partir do vigésimo primeiro dia de idade das aves com duração de sete dias em um delineamento inteiramente casualizado e constituído de três tratamentos com sete repetições de quatro aves cada, resultando em 28 animais por tratamento e totalizando 84 animais distribuídos aleatoriamente nas gaiolas, sendo:

- Tratamento A: Adição de Bacitracina de zinco na dosagem de 1g/kg de ração
- Tratamento B: Adição de BthTx-I na dosagem de 20 mg/kg de ração
- Tratamento C: Ração sem a presença de melhorador de desempenho

2.5 Avaliação do ambiente térmico

A temperatura, a umidade relativa do ar e a temperatura de ponto de orvalho foram monitorados de hora em hora pelo datalogger da marca Homis colocado a 1,50m do solo, na lateral da gaiola de criação das aves.

Para avaliar o conforto térmico calculou-se o índice de temperatura e umidade (THI) por meio da fórmula: $THI = t_a + 0,36 t_{po} + 41,5$, na qual “ t_a ” é a temperatura do ar (°C) e “ t_{po} ” a temperatura de ponto de orvalho (°C) (THOM, 1959) e os valores comparados com os definidos como ideais por Abreu e Abreu (2001) para aves de 21 a 28 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Valores ideais de temperatura, umidade relativa do ar e do índice de temperatura e umidade (THI), em função da idade das aves, segundo Abreu e Abreu (2001)

Idade (semanas)	Temperatura (C°)	Umidade Relativa do Ar (%)	THI
1 ^a	32 - 35	60 - 70	72,5 – 80
2 ^a	29 – 32	60 – 70	68,4 – 76
3 ^a	26 – 29	60 – 70	64,5 – 72
4^a	23 – 26	60 – 70	60,5 – 68
5 ^a	20 – 23	60 – 70	56,6 – 64
6 ^a	20	60 – 70	56,6 - 60

2.6 Desafio ambiental

Para promoção de desafio sanitário, reutilizou-se cama de frango de granja comercial em uso. As gaiolas continham uma bandeja na parte inferior para colocação da cama de tal forma que as aves mantivessem contato direto com a mesma durante todo o período experimental.

Além disso, aplicou-se o protocolo de trabalho criado por Ramos et al. (2011), no qual se preparou uma solução de 1 L de água limpa com 50 g de cama de palha de arroz reutilizada. Em seguida, uma alíquota de 100 mL da solução da cama reutilizada foi misturada com 900 mL de água limpa e fornecida aos animais.

2.7 Arraçoamento e tipo da ração

As formulações das rações foram feitas de acordo com as exigências nutricionais propostas por Rostagno (2011) (Tabela 2). As aves foram acompanhadas até o 28º dia para observação de possíveis efeitos do experimento realizado na quarta semana de criação. Ração e água foram disponibilizados à vontade durante todo o experimento. O manejo das aves ao longo do experimento seguiu as práticas comuns de criação de frangos de corte rotineiras na Granja de Pesquisa.

Tabela 2. Composição da dieta experimental de frangos de corte de 21 a 28 dias

Alimento	Quantidade (%)
Sorgo 8,8%	88,1836
Soja farelo 46,5%	46,7512
Oleo de soja	9,6511
Fosfato bicálcico	2,0156
Calcário	1,1777
Sal comum	0,6288
Px vitamínico + minerais ¹	0,6
DL-metionina	0,4685
L-Lisina HCL	0,4042
L-treonina	0,1192
Custo/kg:	0,774
Níveis nutricionais da dieta	
Energia Metabolizável (Mcal/Kg)	3,15
Proteína bruta (%)	20,1657
Cálcio (%)	0,7580
Fósforo disponível (%)	0,3540
Sódio (%)	0,2000
Metionina dig. (%)	0,5754
Met + Cist dig. (%)	0,8260
Lisina dig. (%)	1,1310
Treonina dig. (%)	0,7350
Arginina dig. (%)	1,2210
Triptofano dig. (%)	0,2269

¹Px vitamínico + minerais - Composição por quilo de ração - Vit-A 5.400 UI; D3 900UI; E 9,0 mg; Pantotenato cálcio 7,2 mg; Biotina 27,0 µg; Niacina 9,0 mg; Piridoxina 720 µg; Riboflavina 1800 µg; Tiamina 540 µg; B12 5,4 µg; K3 900 µg; Se 360 µg; Colina 260 mg; Metionina 1812 mg; Cu 18 mg; Zn 120 mg; I 2 mg; Fe 60 mg; Mn 120 mg; Antioxidante 240 mg

2.8 Abate

Após o 28º dia de criação, 30 animais (10 de cada tratamento) foram identificados com anilhas nos pés e submetidos a um período de seis horas de jejum. Em seguida foram pesados, insensibilizados por eletr narcose, abatidos por sangria na artéria jugular, depenados e eviscerados. O abate seguiu de acordo com as normas de ambiência, manejo, bem-estar animal e sanidade exigidos pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM).

2.9 Parâmetros Avaliados

2.9.1 Desempenho zootécnico

A) Ganho de Peso (GP) e Ganho de Peso Médio Diário (GPMD)

O GP de cada gaiola foi determinado por diferença entre as pesagens das aves ao início e final da fase experimental. O GPMD foi obtido pela divisão entre o GP total das aves pelo número de dias do experimento.

B) Consumo de Ração (CR) e Conversão Alimentar (CA)

O consumo de ração foi obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra de cada parcela. As pesagens da ração foram realizadas nas mesmas datas das pesagens das aves (21 e 28 dias). A conversão alimentar foi obtida pela relação entre o consumo total de ração pelo ganho de peso em cada parcela e corrigida pela mortalidade.

C) Rendimento de carcaça e vísceras

As carcaças foram pesadas com cabeça, pescoço e pés. Em seguida foram pesados separadamente cabeça e pescoço, peito com osso e pele e sobrecoxa. O rendimento de carcaça (RC) e das partes (RP) foi calculado em relação ao peso vivo antes do abate, sendo: $RC = \{(Peso\ Carcaça / Peso\ Vivo) * 100\}$ e $RP = \{(Peso\ Parte / Peso\ Vivo) * 100\}$. As vísceras (proventrículo, moela, coração, fígado e intestino delgado) foram pesadas e o intestino delgado também foi medido. Utilizou-se uma balança mecânica Filizola, com subdivisões de 100 gramas, com carga máxima para 50 kg.

2.9.2 Análise bromatológica

Aos 28 dias de idade, foram selecionadas cinco aves por tratamento para avaliar a composição química da carcaça. Após serem abatidas, as carcaças foram cortadas e moídas e em seguida, secas em estufa de ventilação forçada a

55°C por 72 horas para análises no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UFU. As análises bromatológicas realizadas foram de matéria seca (MS%), proteína bruta (PB%) e extrato etéreo (EE%) de acordo com Silva e Queiroz (2009).

2.9.3 Parâmetros microbiológicos

As amostras coletadas foram de cama de frango reutilizada e swabs de cloaca nas idades de 21 e 28 dias de vida das aves, armazenadas dentro de tubos estéreis, devidamente identificados, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da UFU para análise e contagem de *E.coli*, *S. aureus* e *Salmonella* spp.

Para realização do procedimento de contagem os swabs cloacais e as amostras de cama foram diluídos em água peptonada 2% e rediluídos em tubos com água peptonada 0,1% até atingir a concentração 10^{-3} UFC/mL.

O pré-enriquecimento dos swabs foi realizado em Água Peptonada Tamponada, incubando-se por 18-24 horas a 37°C. Após a etapa de enriquecimento seletivo, 100 µL de cada diluição foi plaqueada em duplicata em meio seletivo-diferenciais: Ágar de Baird-Parker (BAIRD-PARKER, 1962), Ágar SS (Salmonella-Shigella) (LEIFSON, 1935) e MacConkey (MACCONKEY, 1905), utilizados, respectivamente, para a identificação presuntiva de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli*.

As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas a posterior contagem das colônias típicas. A contagem de colônias foi transformada em Log 10 para análise estatística, conforme os Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº6 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

2.9.4 Análise morfométrica da mucosa do intestino delgado

Imediatamente após o abate, abriu-se a cavidade abdominal e colheu-se fragmentos dos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) que foram acondicionados individualmente. Os critérios anatômicos utilizados para

colheita foram: o duodeno distalmente a 10 cm do piloro, o jejuno distalmente 150 cm do piloro e o íleo a 15 cm após observação na mudança visual do tecido do órgão, que o caracteriza.

Com aproximadamente um centímetro de comprimento, os fragmentos anelares foram abertos no sentido longitudinal e lavados cuidadosamente com soro fisiológico preservando-se ao máximo as vilosidades. Com a superfície da mucosa voltada externamente, as extremidades do corte foram grampeadas em papel cartão de cor branca, para evitar o fechamento luminal do tecido. Foram colocados em solução aquosa a 10% de formol PA, tamponada com fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio com pH 7,4 para fixação por 24h.

O material foi analisado no Laboratório de Técnicas Histológicas da UFU e os procedimentos adotados foram: inclusão em parafina, cortes no micrótomo de aproximadamente 5 µm e coloração em hematoxilina e eosina (HE). Capturou-se as imagens das lâminas prontas em aumento de 40 vezes, com o microscópio óptico (Olympus BX 40 com câmera Olympus OLY 200) acoplada a um computador, pela placa digitalizadora Data Translation 3150.

Foram mensuradas 20 larguras das vilosidades, 20 comprimentos dos vilos e 20 larguras de criptas por lâmina e realizada a média, sendo três lâminas de cada segmento intestinal por animal e 10 aves por tratamento pelo programa de análise de imagens HL Image 97 (Western Vision Softwares).

O número de vezes em que a superfície da mucosa intestinal é aumentada (M) foi calculado, seguindo o método proposto por Kisielinski et al. (2002):

$$M = \frac{(L V \times CV) + \left(\frac{LV}{2} + \frac{LC}{2}\right)^2 - \left(\frac{LV}{2}\right)^2}{\left(\frac{LV}{2} + \frac{LC}{2}\right)^2}$$

No qual: M = Número de vezes em que a superfície da mucosa intestinal é aumentada; LV = Largura média do vilo; CV= Comprimento médio do vilo; LC = Largura média da cripta.

2.9.4.1 Porcentagem de células caliciformes por área delimitada

A análise quantitativa das células caliciformes foi realizada em uma região previamente delimitada da mucosa com vilosidades íntegras dos segmentos duodeno, jejuno e íleo do intestino delgado em lâminas coradas por azul de alcian e PAS (Periodic Acid Schiff). Utilizando o microscópio óptico (Olympus BX 40) com câmera Olympus OLY 200, conectada ao computador pela placa digitalizadora Data Translation 3150, as imagens foram capturadas em aumento de 40 vezes. Para segmentação das mesmas por “threshold” ou contraste limiar (WALDEMARIN, BELETTI, COSTA, 2004), formaram-se imagens binárias e calculou-se o percentual da cor preta nas áreas delimitadas que evidenciam a região das células caliciformes pelo programa de análise de imagens HL Image 97 (Western Vision Softwares).

2.9.5 Bioquímica sérica

Coletou-se 3 mL de sangue da veia jugular de 30 animais aos 28 dias de idade (10/tratamento) e armazenou-se em frascos estéreis sem anticoagulante previamente identificados. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 2 h para completa coagulação, centrifugados a 720 g por 5 min para separação do soro e armazenados em alíquotas em microtubos, identificados e congelados a -20 °C até o momento das análises.

Os testes foram realizados no Laboratório Clínico da Universidade Federal de Uberlândia, determinando-se as concentrações séricas de: proteínas totais (método do biureto), albumina (método de verde de bromocresol), globulinas (diferença entre proteínas totais e albumina), relação albumina/globulina, ureia (método cinético UV), creatinina (método picrato alcalino), ácido úrico (método enzimático Trinder), alanina aminotransferase (ALT) (método cinético UV-IFCC), Aspartato aminotransferase (AST) (método cinético UV-IFCC), gama glutamil transferase (GGT) (método Szasz modificado), colorimetricamente em analisador automático multicanal ChemWell (Awareness Technology Inc.) à temperatura de 37 °C, utilizando Kits comerciais (Labtest Diagnóstica®). O analisador automático

foi previamente calibrado com Calibra H e aferido com soro controle universal Qualitrol 1H (Labtest Diagnóstica®).

2.9.6 Histopatologia do fígado e rim

Coletaram-se amostras de fígado e rim dos animais abatidos, que foram fixadas em formol a 10% e processadas conforme rotina de preparação de lâminas histológicas: desidratadas em álcoois, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina histológica, cortadas a 5 µm de espessura, coradas pela hematoxilina eosina (HE) e examinadas à luz da microscopia óptica.

2.10 Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado composto de três tratamentos e sete repetições utilizando um total de 84 aves (28 aves por parcela). Os dados obtidos das variáveis estudadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste F ao nível de significância de 5%. As médias dos tratamentos em cada variável foram comparadas entre si pelo teste de Tukey.

Quando as suposições de normalidade e/ou homogeneidade de variâncias requeridas para a aplicação da ANOVA não foram atendidas, utilizou-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e/ou de Wilcoxon para as comparações a 5% de significância. A normalidade foi testada por meio do Teste de Anderson-Darling e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Para todas as análises utilizou-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3. Resultados e discussão

3.1 Desempenho zootécnico

Os resultados de Ganho de Peso (GP), Ganho de Peso Médio Diário (GPMD), Consumo de Ração (CR) e Conversão Alimentar (CA) estão apresentados na tabela 3. A mortalidade foi de 8,3% nos três tratamentos, não havendo diferença entre eles.

A inclusão da BthTx-I não levou a alterações significativas no consumo de ração pelas aves, pois o mesmo foi igual nos três tratamentos avaliados. Assim como, os resultados de ganho de peso, ganho de peso médio diário e conversão alimentar. O fato de o grupo controle ter apresentado resultados semelhantes aos demais poderia ser consequência de um baixo desafio microbiológico. Corrêa et al. (2003), Dionizio et al. (2002) e Ramos et al. (2011) ao avaliarem próbióticos e prebióticos alternativos em frangos de corte, atribuíram a igualdade dos resultados ao baixo desafio microbiológico imposto aos animais, uma vez que quando há o estímulo sanitário na granja, ocorre melhora no desempenho nas aves alimentadas com antimicrobianos.

Entretanto na idade avaliada neste estudo acredita-se que os resultados semelhantes tenham sido devido a uma maior resistência e adaptação das aves ao ambiente (BUTOLO, 1999). Hays e Muir (1979) avaliaram diversos estudos sobre o uso de antibióticos na produção de frangos e suínos como melhoradores de desempenho e concluíram que, com o aumento da idade as melhorias em ganho de peso e eficiência alimentar diminuem consideravelmente, principalmente em testes com baixo número amostral e experimentais em relação aos de campo.

Tabela 3. Valores médios de ganho de peso corporal (GP) (g), ganho de peso médio diário (GPMD) (g), consumo de ração (CR) (kg) e a conversão alimentar (CA) no período de 21 a 28 dias de idade dos frangos de corte em função dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos ¹		
	A	B	C
GP (g)	837,14 ^a	817,85 ^a	793,33 ^a
GPMD (g)	120 ^a	117 ^a	113 ^a
CR (kg)	1,425 ^a	1,539 ^a	1,468 ^a
CA	1,73 ^a	1,92 ^a	1,89 ^a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

Correa et al. (2003) enfatizam que alguns fatores afetam a eficácia dos melhoradores de desempenho como: idade do animal, tipo de aditivo e condições de estresse e sanidade. De acordo com Dibner e Richards (1995), os efeitos dos melhoradores de desempenho podem incluir ganho de peso, mas em geral, limita-se a melhoria na eficiência alimentar.

Não se encontrou alteração na deposição de tecidos (massa magra e gordura) nas carcaças, uma vez que os resultados de rendimento de carcaça e cortes e a composição química da carcaça não apresentaram diferenças entre os tratamentos testados (Tabela 4 e 5). Assim como, a adição de antibiótico e BthTx-I na ração não influenciou o peso das principais vísceras e o comprimento do intestino delgado dos frangos de corte (Tabela 6).

De acordo com Macari, Furlan e Nakaghi (1994) a ingestão de alimentos por animais selecionados para crescimento rápido, como os frangos de corte, é determinada pelas características anatomohistológicas e pela capacidade do trato digestivo e alterações neste sistema podem causar profundo efeito sobre o desempenho produtivo.

Tabela 4. Valores médios de rendimento de carcaça (RC), rendimento de cabeça e pescoço (RCP), rendimento de peito com osso e pele (RPOP) e rendimento de sobrecoxa (RS), no período de 21 a 28 dias de idade dos frangos de corte em função dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos ¹		
	A	B	C
RC	75,13 ^a	77,74 ^a	77,81 ^a
RCP	15,12 ^a	15,47 ^a	15,87 ^a
RPOP	17,88 ^a	18,20 ^a	17,40 ^a
RS	18,77 ^a	19,36 ^a	18,96 ^a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

Tabela 5. Composição percentual da carcaça de frangos de corte aos 28 dias em Matéria Seca (MS), Extrato Etéreo (EE) e Proteína Bruta (PB)

Variáveis da ração	Tratamentos ¹		
	A	B	C
MS	25,54 ^a	27,92 ^a	25,21 ^a
EE (MS)	23,62 ^a	27,92 ^a	26,46 ^a
PB (MSD)	72,37 ^a	74,04 ^a	76,83 ^a
PB (MS)	53,58 ^a	53,03 ^a	58,44 ^a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$) ¹: A:

Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

MSD = Matéria Seca Desengordurada

Segundo Makkink et al. (1994) fontes proteicas não afetam o peso do estômago. O estudo macroscópico dos intestinos é de grande relevância, pois o crescimento e a manutenção do trato digestivo são fatores que contribuem para que as aves tenham aumento na eficiência dos processos digestivos (FURLAN et al. 2001). De acordo com Costa, Tsé e Miyada (2007) os antibióticos utilizados

nas dietas, podem reduzir as inflamações e a espessura da parede intestinal e conseqüentemente, aumentar a eficiência de absorção de nutrientes. Do ponto de vista nutricional, o tamanho dos intestinos poderia afetar a taxa de passagem do alimento pelo trato digestivo, e com isso, afetar a eficiência da digestão e absorção dos nutrientes da dieta (FURLAN et al., 2001). Segundo Teixeira et al. (2004), há uma correlação positiva entre o comprimento total dos intestinos e o ganho de peso de frangos de corte.

Tabela 6. Valores médios, em gramas (g), dos pesos das vísceras proventrículo, moela, fígado, coração e intestino delgado e medida, em centímetros, do intestino delgado aos 28 dias de idade dos frangos de corte em função dos diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos ¹		
	A	B	C
Proventrículo	4,36 ^a	4,29 ^a	4,78 ^a
Moela	14,81 ^a	15,00 ^a	16,86 ^a
Fígado	17,71 ^a	18,38 ^a	17,99 ^a
Coração	3,45 ^a	4,02 ^a	3,71 ^a
Intestino delgado (g)	47,84 ^a	48,82 ^a	49,37 ^a
Intestino delgado (cm)	158,90 ^a	158,35 ^a	157,19 ^a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

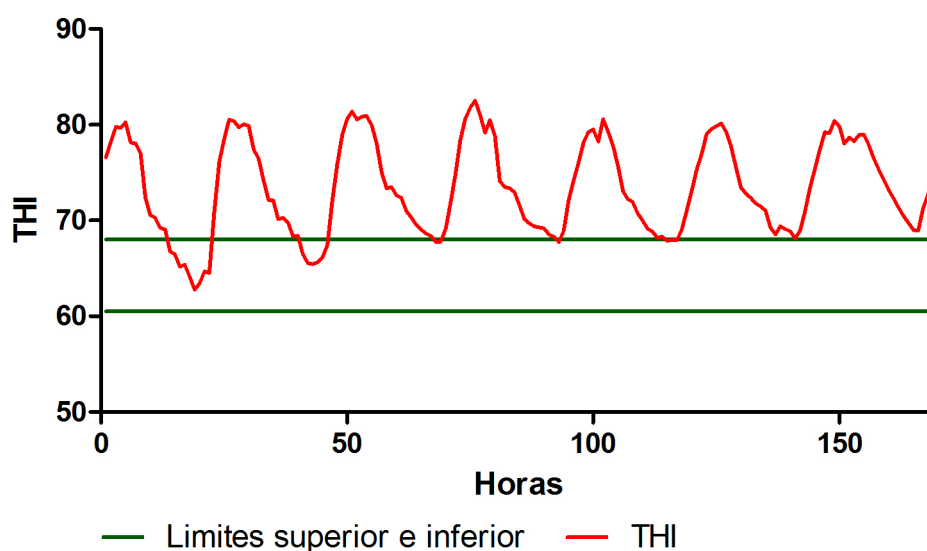
3.2 Caracterização do ambiente térmico

Conforto térmico é definido como a variação da temperatura ambiente dentro da qual os animais apresentam metabolismo mínimo, sem demonstrar quaisquer sintomas de desconforto térmico (BLIGH; JOHNSON, 1973). As médias e os desvios padrão da temperatura, umidade relativa do ar e da temperatura de ponto de orvalho no interior do galpão durante o período experimental foram, respectivamente $27,5^{\circ}\text{C} \pm 4,94$; $41,3 \pm 13,9\%$ e $12,2 \pm 2,77^{\circ}\text{C}$.

De acordo com os limites de THI estabelecidos por Abreu e Abreu (2001), verificou-se que as aves permaneceram em estresse de calor a maior parte do tempo (Gráfico 1). Quanto maior a temperatura ambiente, mais respostas fisiológicas as aves desencadeiam com o objetivo de aumentar a dissipação do calor ou reduzir sua produção, como: aumento da frequência respiratória (ofegantes), bicos e asas abertas (FURLAN; MACARI, 2002), diminuição na

ingestão de alimentos (YAHAV; HURWITZ, 1996), aumento na ingestão de água (OLIVEIRA NETO et al., 2000) e desidratação (MACARI; FURLAN, 2001).

Gráfico 1. Índice de temperatura e umidade no ambiente de criação dos frangos de corte de 21 a 28 dias de idade e os limites inferior e superior de conforto térmico definidos por Abreu e Abreu (2001).



As temperaturas ambientais elevadas no período experimental levaram as aves a um estresse térmico que pode ter influenciado os resultados zootécnicos encontrados. A inclusão de aditivo na ração proporciona maiores ganhos de peso em ambientes de baixa temperatura, estando relacionado à densidade dos vilos intestinais das aves, aumentando a superfície de absorção de nutrientes e melhora o aproveitamento do alimento (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002).

Quanto mais próximo à idade de abate, mais susceptível o frango de corte se torna às temperaturas altas, apresentando efeito estressante, que pode prejudicar o desempenho e desenvolvimento das aves levando a diminuição na taxa de crescimento, piora na conversão alimentar (GERAERT; PADILHA; GUILLAUMIN, 1996), diminuição no ganho de peso (MITCHELL; CARLISLE, 1992) e até elevação significativa dos índices de mortalidade de um lote principalmente, próximo à idade de abate (FABRÍCIO, 1994, YAHAV; HURWITZ, 1996; DIONELLO et al., 2002; FURLAN; MACARI, 2002; MAZZI et al., 2002).

Em condições de conforto térmico, há menor gasto de energia e, conseqüentemente, melhor ganho de peso e conversão alimentar, além do melhor

desenvolvimento e fisiologia do sistema digestório das aves (MITCHELL; CARLISLE, 1992; DIONELLO et al., 2002; FURLAN; MACARI, 2002).

3.3 Avaliações microbiológicas

Existe uma microbiota natural do trato gastrointestinal das aves composta por muitas espécies em equilíbrio entre si e o hospedeiro, sendo necessária e benéfica para o bem estar dos animais e, apresentando papel relevante na digestão dos alimentos ingeridos. Desequilíbrios em sua composição podem trazer transtornos no desempenho e na capacidade de aproveitamento dos nutrientes (GEDEK, 1986; RAMOS et al., 2011).

Estima-se que 90% desta microbiota seja composta por bactérias facultativas (aeróbicas/anaeróbicas) e produtoras de ácido lático (*Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbicas como *Bacterioides* spp, *Fusobacterium* spp e *Eubacterium* spp. Os 10% restantes são constituídos de bactérias consideradas potencialmente nocivas ao hospedeiro, entre elas, a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Quando em equilíbrio, a microbiota auxilia o animal na resistência a infecções bacterianas, porém o desequilíbrio, em favor das bactérias indesejáveis, diminui a absorção de nutrientes por aumentar a espessura da parede intestinal, a velocidade de passagem do bolo alimentar, a frequência de reposição da mucosa intestinal e a necessidade de nutrientes pelo hospedeiro (CANALLI et al., 1992; LODDI et al., 2001; RAMOS et al. 2011).

Avaliou-se quantitativamente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp aos 21 e aos 28 dias de idade, antes e após a inclusão do antibiótico e da BthTx-I na ração dos animais (Tabelas 7 e 8). Para base dos cálculos estatísticos, considerou-se o valor de 400×10^3 UFC/mL nas placas consideradas incontáveis. Os resultados microbiológicos obtidos evidenciaram a presença de *E. coli* e *S. aureus* em amostras de swabs cloacais e cama de frango, uma vez que são microrganismos normais da microbiota intestinal de aves.

A *Salmonella* spp não foi detectada em nenhum momento na cama ou nos swabs de cloaca. Esta bactéria não é parte integrante da microbiota intestinal

sadia das aves e de acordo com Silva e Duarte (2012), não há ocorrência de sorovares adaptados às aves. Porém, sua ocorrência tem pouco ou nenhum impacto na produtividade das granjas. O principal problema está nas altas taxas de carcaças de frangos contaminadas, sendo responsáveis por surtos em humanos.

Tabela 7. Contagem de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (log 10) na cama de frango reutilizada, aos 21 e aos 28 dias de idade de frangos de corte submetidos a diferentes tratamentos

Cama de frango				
Tratamento	21 dias		28 dias	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
A	4,8 ^{aA}	4,4 ^{aA}	5,1 ^{aA}	5,6 ^{aA}
B	5,3 ^{aA}	5,6 ^{aA}	4,8 ^{aA}	5,4 ^{aA}
C	4,5 ^{aA}	5,6 ^{aA}	5,6 ^{aA}	4,5 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)
Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas linhas entre Primeiro (aos 21 dias) e Segundo cultivos (aos 28 dias) de cada bactéria não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

A contagem de bactérias na cama de frango manteve-se antes e após o experimento, o que era esperado, pois foi reutilizada de uma granja comercial em uso. A presença de bactérias na cama de frangos de corte, incluindo as entéricas, é inerente à produção, sendo imprescindível o conhecimento de suas condições bromatológicas e microbiológicas para contribuir no programa de boas práticas de produção de frangos de corte, pois promove desafio sanitário às aves (ALMEIDA et al., 2011).

Tabela 8. Contagem de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (log 10) em swabs cloacais, aos 21 e aos 28 dias de idade de frangos de corte submetidos a diferentes tratamentos

Swabs de cloaca				
Tratamento	21 dias		28 dias	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
A	5,0 ^{aA}	-	4,3 ^{aA}	-
B	4,6 ^{aA}	5,6 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{bB}
C	5,1 ^{aA}	5,6 ^{aA}	4,4 ^{aA}	5,6 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p>0,05$)
Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas linhas entre Primeiro (aos 21 dias) e Segundo cultivos (aos 28 dias) de cada bactéria não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

Na contagem de bactérias dos swabs cloacais observou-se uma diminuição significativa dos 21 aos 28 dias de idade das aves do tratamento B, sinalizando que a BthTx-I incluída na ração foi capaz de atuar em nível intestinal, apresentando atividade antimicrobiana, anteriormente comprovada *in vitro* (BARBOSA, 2005; COSTA, 2005; ARAGÃO, 2005; ALVES FERREIRA, 2007).

Diversos fatores podem prejudicar ou beneficiar o desenvolvimento da microbiota intestinal como: uso de antibióticos, estresse fisiológico, radiação, alteração do peristaltismo do trato gastrointestinal e mudança da dieta (HAWRELAK; MYERS, 2004).

3.4 Histomorfometria intestinal

O trato digestivo sofre processos de maturação por até 10 dias após a eclosão do ovo, como hiperplasia e hipertrofia celular, diferenciação da mucosa gastrintestinal e a maturação do sistema termorregulador que influenciarão o peso corporal e a conversão alimentar da ave até a idade de abate (MACARI; FURLAN, 2001). O intestino delgado é a porção mais longa do sistema digestório e nele podem-se distinguir três segmentos: duodeno, jejuno e íleo (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002). O seu desenvolvimento segue diferentes padrões, sendo que o duodeno e o jejuno continuam a desenvolver depois que o íleo tenha atingido um número constante de criptas por vilos (SKLAN, 2001). A largura dos vilos também aumenta com a idade da ave, bem como o número de enterócitos por vilos (GEYRA; UNI; SKLAN, 2001).

O ganho de peso das aves está diretamente relacionado à nutrição e a integridade morfofuncional do sistema digestório, em especial, o intestino delgado onde parte dos processos digestivos e absorção dos nutrientes ocorrem nos enterócitos (FURLAN et al., 2001). De acordo com Macari (1995), a capacidade absorptiva dos nutrientes, é proporcional à área de mucosa disponível para a absorção e Geyra, Uni e Sklan (2001) relatam que o crescimento das aves está correlacionado à área de absorção do duodeno. Portanto, calculou-se a área de mucosa dos três segmentos do intestino delgado dos frangos de corte avaliados neste estudo aos 28 dias e os resultados estão na tabela 9.

Tabela 9. Médias da área de mucosa (AM) (μm^2) calculado pelo método de Kisielinski et al. (2002) dos segmentos duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte de 28 dias submetidos a diferentes tratamentos

Segmento	Tratamentos ¹		
	A	B	C
Duodeno	16,75 ^a	18,37 ^a	16,89 ^a
Jejuno	14,90 ^a	15,91 ^a	14,71 ^a
Íleo	11,70 ^a	11,87 ^a	13,46 ^a

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

As medidas avaliadas foram iguais em todos os tratamentos e segmentos do intestino delgado em consonância com os resultados de ganho de peso encontrados. Os vilos intestinais proporcionam um aumento na superfície interna do órgão, ou seja, na área de digestão e absorção intestinal e sua altura varia ao longo de todo o intestino. No duodeno, os vilos são mais longos e digitiformes, no jejuno e no íleo podem ser lameliformes com aspecto foliáceo. São revestidos por epitélio simples, constituído por três tipos celulares: as células caliciformes, os enterócitos e as células enteroendócrinas, que respondem pela defesa, digestão e absorção, e pela regulação desses processos e pela proliferação e diferenciação desses mesmos tipos celulares, respectivamente (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002).

3.4.1 Porcentagem de células caliciformes

As células caliciformes são produtoras de muco, uma secreção espessa, composta, principalmente por água, eletrólitos e a mistura de várias glicoproteínas, cujas funções são: lubrificar o revestimento intestinal, conferindo proteção contra agentes abrasivos da dieta e agentes patogênicos e participar da absorção dos nutrientes (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; PICKLER et al., 2012).

Neste estudo, não se observou diferença na produção de células caliciformes entre os tratamentos, porém em todos eles, o íleo apresentou maior quantidade destas células em relação aos demais segmentos (Tabela 10). De acordo com Junqueira e Carneiro (2004), o número de células caliciformes determina a produção de muco no intestino delgado, sendo menos abundantes no duodeno e aumentando em número em direção ao íleo.

Tabela 10. Porcentagem de células caliciformes por área delimitada nos segmentos duodeno, jejuno e íleo do intestino delgado de frangos de corte submetidos a diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos ¹		
	A	B	C
Duodeno	0,45 ^{aA}	0,69 ^{aA}	0,47 ^{aA}
Jejuno	0,74 ^{aA}	1,08 ^{aA}	1,13 ^{aA}
Íleo	3,37 ^{aB}	2,68 ^{aB}	3,11 ^{aB}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

¹: A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

Para a ANOVA os dados foram transformados em $\ln(X)$

O muco participa da resposta imune inespecífica, e quando há a grande expressão de células caliciformes indica que pode haver algum tipo de desafio sanitário que demande maior produção de muco. Em contrapartida, o muco quando em grandes quantidades pode trazer prejuízos para a saúde da ave, pois aumenta o trânsito intestinal, reduzindo a absorção dos nutrientes, o que não foi observado neste experimento (PICKLER et al., 2012).

3.5 Bioquímica sérica

A dosagem de parâmetros bioquímicos sanguíneos fornece importante informação com relação ao estado fisiológico, clínico, metabólico e produtivo de um grupo de animais (GONZÁLEZ; SILVA, 2006), incluindo aqueles expostos a diferentes efeitos ambientais relacionados à nutrição e oferta de alimento (SCHMIDT et al., 2007). Para avaliação do metabolismo proteico foram realizadas análises de proteínas totais, albumina, globulinas juntamente com ácido úrico, ureia, além da creatinina para avaliação renal. E para função hepática foram mensuradas as enzimas ALT, AST e GGT (DIAL, 1995).

Na literatura não se encontra valores de referência fixos para comparação dos níveis séricos das diferentes enzimas avaliadas. Os valores são influenciados pelo uso de kits comerciais, aparelhagem usada para as dosagens e ao método de colheita de amostras e da obtenção do soro. Ressalta-se que fatores relacionados ao clima, ao tipo de alimentação e ao manejo podem refletir nos resultados das análises (BORSA et al., 2006). Por essa razão, foram utilizados

diferentes autores como base de comparação entre os resultados encontrados neste estudo e os valores de referência de normalidade (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios de parâmetros bioquímicos séricos (Ureia (U/L), Ácido Úrico (mg/dL), Albumina (g/dL), Globulinas (g/dL), Proteínas Totais (g/dL), Relação Albumina/Globulina, GGT (U/L), AST (U/L), ALT (U/L) e Creatinina (mg/dL) de frangos de corte aos 28 dias de idade, submetidos a diferentes tratamentos

Variáveis	Tratamentos ¹			Referência*
	A	B	C	
Ácido Úrico	5,82 ^a ±2,39	5,42 ^a ±1,82	4,59 ^a ±1,51	4,42 – 11,14 ²
Ureia	7,49 ^a ±3,86	6,09 ^a ±3,12	7,33 ^a ±2,85	6,55 – 7,76 ⁶
Creatinina	0,38 ^{ab} ±0,14	0,41 ^a ±0,1	0,28 ^b ±0,05	0,25 – 0,41 ⁵
Albumina	1,20 ^a ±0,23	1,20 ^a ±0,25	1,15 ^a ±0,15	1,08 – 1,61 ²
Globulinas	2,79 ^a ±0,34	2,59 ^a ±0,51	2,48 ^a ±0,27	2,0 – 2,93 ²
Prot. totais	4,00 ^a ±0,30	3,78 ^a ±0,45	3,67 ^a ±0,34	3,41 – 4,21 ²
Alb/Glob	0,44 ^a ±0,12	0,48 ^a ±0,18	0,48 ^a ±0,09	0,54 ²
Gama GT	22,07 ^a ±10,94	25,96 ^a ±11,22	19,45 ^a ±3,33	18,4 – 26,5 ⁴
AST	241,27 ^a ±53,01	217,63 ^a ±18,22	232,62 ^a ±64,00	Até 275 ³
ALT	46,60 ^a ±33,48	38,81 ^a ±26,82	30,12 ^a ±20,08	19 - 50 ³

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

* Valores de referência

¹ A: Tratamento com antibiótico; B: Tratamento com BthTx-I; C: Tratamento controle

² Ross et al, 1978

³ Campbell, 2004

⁴ Rojas, 2012

⁵ Maciel et al., 2007

⁶ Batina et al., 2005

Somente a creatinina apresentou diferença estatística significativa, na qual, o tratamento B (inclusão da BthTx-I) teve maior valor em relação ao tratamento C (grupo controle), porém dentro da referência de normalidade. A creatinina apresenta baixa concentração plasmática nas aves e alterações na sua concentração não demonstram correlação com disfunção renal, principalmente quando os valores de ácido úrico não estão alterados. Para qualquer população saudável os valores de normalidade estarão entre a média e o desvio padrão, lembrando que 5% da população apresentam valores fora do padrão por características unicamente individuais (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994).

A creatinina é um composto nitrogenado e é produzida a partir da fosfocreatina muscular e dependente da creatina do organismo, que varia com a massa muscular. A quantidade diária formada é relativamente constante para um determinado indivíduo, sendo pouco afetada pela alimentação, principalmente pelo consumo de proteína (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

O ácido úrico é o composto nitrogenado excretado em maior quantidade nas aves, sendo o principal produto catabólico de proteínas, de nitrogênio proteico e das purinas, sintetizado no fígado e parcialmente nos rins. Cerca de 90% é secretado pelos túbulos contorcidos proximais em aves saudáveis (HARR, 2002). Sua concentração sérica aumenta quando a função renal está prejudicada, reduzindo sua eliminação pelos rins (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Porém, é necessária uma lesão de 75% dos rins para que o ácido úrico se encontre elevado. Apesar de ser bastante utilizado, valores dentro da normalidade não garantem a integridade do órgão (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2007).

Os demais índices não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos indicando que a inclusão da BthTx-I na ração não causou alterações no metabolismo proteico e enzimático das aves em relação aos demais tratamentos. Em relação às proteínas totais, a albumina é considerada o indicador mais sensível para avaliar o status nutricional proteico (GONZÁLEZ; BORGES; CECIM, 2000). Os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais nas aves são a idade, sazonalidade, condições de manejo e doenças (LUMEIJ, 1997). O ganho de peso está relacionado com proteínas totais plasmáticas, a temperatura corporal e stress térmico (BERRONG; WASHBURN, 1998). Além disso, não se observou resposta inflamatória em nenhum dos grupos. Para tal, calculou-se a relação albumina/globulina, que nas aves é um indicador de alta significância clínica, pois quando há infecções a relação albumina/globulina se altera, pois ocorre um aumento na concentração das imunoglobulinas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; BACILA, 2003).

Já o nível de ureia no sangue das aves não permanece constante, sendo influenciado pela quantidade, qualidade e proximidade da última refeição, pelo conteúdo de ureia e de proteínas na dieta e pelo grau de desidratação do animal (WILSON et al., 1974). O fornecimento de proteína de baixa qualidade ao animal resulta em menor utilização dos aminoácidos para a síntese protéica e uma conseqüente perda de nitrogênio na forma de ureia (ALLEN, 1970).

Em relação ao perfil enzimático, a ALT e AST são as principais aminotransferases de um grupo de enzimas que catalizam a conversão de aminoácidos em α -cetoácidos pela transferência de um grupamento amina. Alterações em seus níveis podem ser indicativas de desordens hepáticas ou

musculares (RITCHIE, HARRISON, HARRISON, 1994). Em aves, além do fígado, podem ser encontradas em diversos tecidos como rins, fígado e musculatura (FRANSON; MURRAY; BUNK, 1985). De acordo com Harr (2002), a GGT é, provavelmente, mais específica ao epitélio biliar em aves que em mamíferos e seu aumento é mais plausível em condições colestáticas e nas desordens do epitélio biliar, não sendo sensível apenas nos danos hepatocelular.

3.6 Histopatologia do fígado e rim

Em consonância com os resultados de bioquímica sérica, não foram encontradas lesões renais ou hepáticas em nenhuma das aves avaliadas neste estudo em nível histopatológico.

4. Conclusão

A BthTx-I apresentou atividade *in vivo*, consolidando-se como uma candidata a melhorador de desempenho alternativo na produção de frango de corte, uma vez que, atuou diminuindo a carga microbiana de bactérias potencialmente patogênicas da microbiota intestinal das aves e não causou danos ou lesões musculares, hepáticas ou renais na dosagem avaliada.

REFERENCIAS

ABREU, V.M.N.; ABREU, P.G. Diagnóstico Bioclimático: qual sua importância na produção de aves? **Avicultura Industrial**, Porto Feliz, v. 91, n. 9, p.16-20, edição 1093, 2001.

ALLEN, R.S. Protein metabolism. In: SWENSON, M.J. (Editor) **Duke's physiology of domestic animal**. 8 ed. New York, Cornell University Press. p. 576-594, 1970.

ALMEIDA, T.B. et al. Análise bromatológica e microbiológica da cama de frangos de corte, 2011. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2011. Florianópolis, Brasil. **Anais...** Florianópolis, 2011.

ALVES FERREIRA, B.L. Identificação da atividade Antibiótica e relação Estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal. 2007. 110 f. **Dissertação** (Mestrado em Neuroimunologia), Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2007.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H. et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

ARAGÃO, E.A. Efeito bactericida de Fosfolipases A₂-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais. 2005. 118 f. **Dissertação** (Mestrado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Robe, 2003. 583p.

BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 25, n. 1, p.12-19, 1962.

BARBOSA, P.S. et al. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 376-386, 2005.

BATINA, P.N. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.4, p.826-831, 2005.

BELLAVER, C. Utilização de melhoradores de desempenho na produção de suínos e de aves. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 2005. Campo Grande, Brasil. **Anais...** Campo Grande, 2005, p.1-29.

BERRONG, S.L.; WASHBURN, K.W. Effects of Genetic Variation on Total Plasma Protein, Body Weight Gains, and Body Temperature Responses to Heat Stress. **Poultry Science**, College Station, v. 77, n. 3, p. 379-385, 1998.

BLIGH, J.; JOHNSON, K.G. Glossary of terms for thermal physiology. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 35, n. 6, p. 941-961, 1973.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Normativa nº6 **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 30 jan 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.13, de 30 de novembro de 2004. **Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização**. Brasília, 2004. Disponível em:

<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>>. Acesso em: 18 jan 2013.

BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 75-95.

BORSA, A. et al. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 675-677, 2006.

BUTOLO, J.E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SOCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1999. Piracicaba, Brasil. **Anais...** Piracicaba: UNIMEP, 1999. p. 85-98.

CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and clinical chemistry**. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, p. 479-492.

CANALLI, L.S. et al. Alteração da microbiota intestinal de frangos de corte pela utilização de probiótico na alimentação. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 125-132, 1996.

CORRÊA, G.S.S. et al. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.4, p.467-473, 2003.

COSTA, L.C.G.P. Efeito citotóxico e antitumoral da Bothropstoxina-I e da Crotamina. 2005. 89 f. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Bioquímica), Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; MIYADA, V.S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores do crescimento de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.3, p.589-595, 2007.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007.

DE LIMA, D.C. et al. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

DIAL, S.M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **Veterinary clinics of north america**, Philadelphia, v. 25, p. 257-273, 1995.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, College Station, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

DIONELLO, N.J.L. et al. Respostas fisiológicas associadas à termotolerância em pintos de corte de duas linhagens por exposição a altas temperaturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 1, p.79-85, 2002.

DIONIZIO, M.A. et al. Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – Desempenho e Rendimento de carcaça. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, p.1580-1587, 2002. Edição especial.

FABRÍCIO, J.R. Influência do estresse calórico no rendimento da criação de frangos de corte, 1994. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, Brasil. **Anais...** Campinas: FACTA, 1994. p. 129-136.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, São Carlos, Brasil. **Anais...** UFSCar, São Carlos, SP, 2000, p. 255-258.

FRANSON, J.C.; MURRAY, H.C.; BUNK, C. Enzyme activities in plasma, kidney, liver and muscle of five avian species. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 21, n.1, p.33-39, 1985.

FURLAN, R.L. et al. Efeito da restrição alimentar inicial e da temperatura ambiente sobre o desenvolvimento de vísceras e ganho compensatório em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n. 4, p. 1-7, 2001.

FURLAN, R.L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 209-230.

GEDEK, B. Probiotics in animal feeding: effect performance and animal health. **Feed Management**, Rockford, v. 3, p. 21-24, 1986.

GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C. F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.75, n.2, p.195-204, February 1996.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, College Station, v.80, n. 6, p. 776-782, 2001.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 357p.

GONZALÉZ, F.H.D.; BORGES, J.B.; CECIM, M. (Eds). **Uso de provas de campo e laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais em bovinos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GREKO, C. Safety aspects on non-use of antimicrobials as growth promoters. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K.E.; LINDBERG, J.E. (Ed). **Gut Environment of Pigs**, Nottingham University Press, 2001. p.219-230.

HAYS, V.W.; MUIR, W.M. Efficacy and safety of feed additive use of antibacterial drugs in animal production. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 59, n. 36, p. 447-456, 1979.

HARR, K. Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 31, n.3, 2002.

HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Alternative Medicine Review: a journal of clinical therapeutic**, Saindpoint, v. 9, n. 2, p. 180-197, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animal**. 6. ed. San Diego: Academic, 2008, 916p.

KISIELINSKY, K. et al. A Simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v.2, n.3, p.131-135, 2002.

LEIFSON, E. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 40, n. 3, p. 581-599, 1935.

LODDI, M.M. et al. Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. **Revista brasileira de zootecnia**, Viçosa, v.29, n.4, p.1124-1131, 2001.

LUMEIJ, J.T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. Academic Press. New York, 1997, p.857-879.

MACARI, M. Mecanismos de proliferação e reparo da mucosa gastrintestinal em aves – coccidiose aviária. In: SIMPÓSIO DE COCCIDIOSE E ENTERITE, 1995. Campinas, Brasil. **Anais...** Campinas: Roche, 1995.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. Ambiência na produção de aves em clima tropical. In: SILVA, I.J.O. (Ed.) **Ambiência na produção de aves em clima tropical**. Piracicaba: FUNEP/UNESP, v. 1, 2001. p. 31-37.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; NAKAGHI, L.O. Anatomia e histologia funcional do trato digestivo. In: **Fisiologia da digestão e absorção das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994.

MACCONKEY, A. Lactose-fermenting bacteria in faeces. **The Journal of hygiene**, London, v. 5, p. 333-378, 1905.

MACIEL, R.M. et al. Função hepática e renal de frangos de corte alimentados com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1221-1225, 2007.

MAKKINK, C.A. et al. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. **British Journal of Nutrition**, London, v. 72, n. 3, p. 353-368, 1994.

MAZZI, C.M. et al. Effect of heat exposure on the thermoregulatory responses of selected naked neck chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, p.35-41, 2002.

MEIER, J. Venomous Snakes. In: STOCKER, K.F. **Medical use of snake venom proteins**. Boca Raton, Boston: CRC, 1990, p. 1-32

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. (Ed.). **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: FACTA, 2004, p. 1-22.

MITCHELL, M.A.; CARLISLE, A.J. The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 101A, n. 1, p.137-142, 1992.

OLIVEIRA NETO, A.R. et al. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dieta controlada e dois níveis de energia metabolizável. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 183-190, 2000.

PICKLER, L. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis* e *Minnesota* e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2012.

RAMOS, L.S.N. et al. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 8, p. 1738-1744, 2011.

RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: principles and applications**. WINGERS PUBLISHING, INC.: Florida, 1994.

ROJAS, I.C.O. Estratégias nutricionais para redução dos níveis protéicos de dietas para frangos de corte na fase inicial. 2012, 72 p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2012.

ROSS, J.G. et al. Hematological and blood chemistry “comparison values” for clinical pathology in poultry. **Veterinary Record**, London, 102: 29-31, 1978.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. 141p.

RUTZ, F.; LIMA, G.J.M.M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre, RS. **Anais...** Concórdia, SC: CNPSA, 2001. 10p. (CD-ROM).

SILVA, E.N.; DUARTE, A. **Salmonella Enteritidis em Aves**: Retrospectiva no Brasil, Portal Engormix. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/salmonella-enteritidis-aves-retrospectiva-t1183/165-p0.htm>>. Acesso em: 12 abr 2013.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

SCHMIDT, E.M.S. et al. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.12, n.3. p.9-20, 2007.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, London, v. 57, n. 4, p. 415-428, 2001.

TEIXEIRA, T.C.S. et al. Interferência de minerais quelatados no comprimento intestinal e peso ao abate em frangos de corte. (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus 1758). In: ENCONTRO DE CIÊNCIAS AVÍCOLAS, 7. 2004, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2004, p. 25.

THOM, E.C. **The discomfort index**. Weatherwise. v. 12, p. 57-59, 1959.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual UBABEF 2012**. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>>. Acesso em: 18 jan 2013.

WALDEMARIN, K.C.A.; BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. **Real-Time Imaging**, London, v. 10, n.4, p.197-204, 2004.

WILSON, M.R. Immunological development of the young pig. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 38, p. 1105-1112, 1974.

YAHAV, S.; HURWITZ, S. Induction of thermotolerance in male broiler chickens by temperature conditioning at an early age. **Poultry Science**, College Station, v. 75, n. 3, p. 402-406, 1996.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-UFU)



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 075/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 040/12

Projeto Pesquisa: "Avaliação da BthTX-I como promotor de crescimento alternativo em frangos de corte"

Pesquisador Responsável: Profa. Maria Inês Homs Brandeburgo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 16 de Agosto de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU