

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA

Programa de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento

LORENZA EIVAZIAN VIANNA NOGUEIRA BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE OVOS E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO EM
AVES POEDEIRAS SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO COM O PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO Ctx(Ile²¹)-Ha**

TUPÃ

2025

LORENZA EIVAZIAN VIANNA NOGUEIRA BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE OVOS E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO EM
AVES POEDEIRAS SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO COM O PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO Ctx(Ile²¹)-Ha**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronegócio e Desenvolvimento da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Tupã, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Agronegócio e Desenvolvimento

Linha de pesquisa: Desenvolvimento e Meio Ambiente

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente

Coorientadores:

Prof. Dr. Danilo Florentino Pereira

Prof. Dr. Diogo de Lucca Sartori

TUPÃ

2025

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação da FCE – Unesp, Câmpus Tupã:

Brandão, Lorenza Eivazian Vianna Nogueira.
B817a Avaliação da qualidade de ovos e do sistema imunológico em aves poedeiras submetidas à suplementação com o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha. / Lorenza Eivazian Vianna Nogueira Brandão. – Tupã: [s.n.], 2025.
73 f.
Dissertação (Mestrado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Universidade Estadual Paulista UNESP – Faculdade de Ciências e Engenharia, 2025.
Orientador: Eduardo Festozo Vicente
Coorientador: Danilo Florentino Pereira
Coorientador: Diogo de Lucca Sartori

1. Aves de postura. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3. Sistema imunológico. 4. Qualidade de ovos. I. Título. II. Autor.

Fonte: Eliana Kátia Pupim, bibliotecária CRB 8 – 6202. Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Esta pesquisa apresenta impactos científicos e sociais. Os resultados poderão ser utilizados para geração de novos conhecimentos e soluções para os problemas relacionados à resistência microbiana dentro da dimensão sanitária na nutrição de animais. Ademais, a pesquisa relaciona-se com as metas previstas no Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) de número 3, intitulado “Saúde e Bem-Estar”, estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU).

Potential impact of this research

This research has scientific and social impacts. The results can be used to generate new knowledge and solutions to problems related to microbial resistance within the health dimension in animal nutrition. Furthermore, the research is related to the goal set out in Sustainable Development Goal (SDG) number 3 entitled “Health and Well-Being”, established by the United Nations (UN).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Tupã



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da qualidade de ovos e do sistema imunológico em aves poedeiras submetidas à suplementação com o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile21)-Ha

AUTORA: LORENZA EIVAZIAN VIANNA NOGUEIRA BRANDÃO

ORIENTADOR: EDUARDO FESTOZO VICENTE

COORIENTADOR: DANILO FLORENTINO PEREIRA

COORIENTADOR: DIOGO DE LUCCA SARTORI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br EDUARDO FESTOZO VICENTE
Data: 17/01/2025 17:19:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - FCE - UNESP - Tupã/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO HENRIQUE BRAZ
Data: 17/01/2025 14:40:36-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE BRAZ (Participação Virtual)
Docente do Curso de Medicina Veterinária / Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS - Realeza/PR

Documento assinado digitalmente
gov.br SANDRA CRISTINA DE OLIVEIRA
Data: 17/01/2025 21:28:35-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a SANDRA CRISTINA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Gestão Desenvolvimento e Tecnologia / Faculdade de Ciências e Engenharia - FCE - UNESP - Tupã/SP

Tupã, 17 de janeiro de 2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Tupã



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da suplementação do peptídeo antimicrobiano ctx(ile21)-ha na dieta oral de aves poedeiras e seus efeitos sob a qualidade de ovos e no sistema imunológico**", registrada com o nº 01/2024, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA, UNESP, CÂMPUS DE TUPÃ, em reunião em **08/12/2023**.

Tupã, 26 de fevereiro de 2024.


Prof. Dr. Danilo Florentino Pereira

Coordenador da Comissão de Ética em Uso de Animais

Faculdade de Ciências e Engenharia
Av. Domingos da Costa Lopes, 780 - Jardim Itaipu - CEP 17.802-406 - Tupã - SP
Fone: (14) 3404-4200 - Fax: (14) 3404-4201 - www.tupa.unesp.br
CNPJ, 48.031.918/0001-40

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Luciana Eivazian Vianna Nogueira e José Osano Brandão Neto. Aos meus avós paternos Célio Brandão e Maria da Conceição Lima Brandão, e à minha irmã Louise Eivazian Vianna Nogueira Brandão que me apoiaram durante toda a minha trajetória acadêmica.

“Não tenha medo do trabalho duro. Nada que valha a pena é fácil. Não deixe que os outros digam que não pode fazer algo. Um dia me disseram que as mulheres não podem ser químicas. Não encontrei nenhuma razão para que não pudesse” (*Gertrude Bell Ellion, bioquímica e desenvolvedora de fármacos antivirais, [s.d.]*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar no barco junto comigo em todos os momentos e pela sua permissão para que eu pudesse realizar este trabalho.

Agradeço ao Prof. Eduardo Festozo Vicente por sua dedicação e empenho durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus coorientadores Prof. Danilo Florentino Pereira e Prof. Diogo de Lucca Sartori por todo o empenho.

A todos os membros do grupo de pesquisa do qual faço parte, intitulado “PeSEAp”, Wendell Queiroz Leite, Mariane Genari de Freitas Severino, Rayssa Piton Rijo Costa, Vitor Sampaio Fernandes, Acsa Thalita Ferreira Pimenta dos Santos, Gabriel da Silva Teodoro, Pedro Henrique, Thais Fregoneze, Gabrielli de Paula Affonso Borges, Bianca Lana Sousa, Jéssica Serafim, Andréia Boaro. muito obrigada por cada um que me auxiliou durante todo o processo.

Aos membros do grupo de pesquisa do Prof. Danilo Pereira. Ariadne Ramos Gomes, Silvana Gomes Gonzales, Maria Alice Pires Neves, Mariana Garib e Jainy Kelly Matos, muito obrigada por todo o apoio durante a pesquisa.

À Prof. Andréia Bagliotti Meneguín e a sua aluna Maria Fernanda Ortolani Pollini pelos ensinamentos.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento pelo compartilhamento de seus conhecimentos profissionais. Principalmente àqueles que me auxiliaram na construção do meu conhecimento durante o processo de mestrado: Eduardo Guilherme Satolo, Ana Elisa Bressan Smith Lourenzani, Cristiane Hengler Corrêa Bernardo, Angélica Góis Morales, Priscilla Ayleen Bustos Mac-Lean, Luana Fernandes Melo, Angela Vacaro de Souza e Sandra Cristina Oliveira.

Aos professores Paula Henrique Braz da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e Camila Pires Cremasco Gabriella FCE, que fizeram parte da minha banca de qualificação, promovendo uma discussão e apontando tópicos para a melhoria do trabalho.

À Yasmin Saegusa Tadayozzi técnica do laboratório de química da Unesp Tupã, por me auxiliar em todos os processos laboratoriais.

Aos colaboradores e técnicos administrativos da Unesp Tupã pelo rápido atendimento e resolução de problemas, principalmente ao Fábio Fontolan Sampaio, Elisa Yurie Matsumaru, João Paulo Freitas e Ananias Pereira dos Santos.

Aos assistentes de suporte acadêmico Bruno Éric Siqueira Albino, Regiane, Sidney Juliatto e Antônio Pereira.

Ao meu noivo Lauro Neves da Silva Júnior por me apoiar e me entender durante todos os momentos.

Aos amigos que estiveram ao meu lado durante este processo, eles sabem quem são, meu agradecimento e bênçãos de Deus.

Agradeço também o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2023/01834-4, vinculado ao Auxílio JP2 nº 2021/06706-9 para a realização deste trabalho científico.

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

BRANDÃO, Lorenza Eivazian Vianna Nogueira. **Avaliação da qualidade de ovos e do sistema imunológico em aves poedeiras submetidas à suplementação com o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha**. 2025. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Faculdade de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Tupã, 2024.

RESUMO

A resistência microbiana requer atenção da comunidade científica pois diferentes microrganismos patogênicos resistentes às drogas convencionais podem levar, até 2050, 10 milhões de pessoas à morte. Neste contexto, os peptídeos são moléculas naturais pertencentes ao sistema imunológico inato de praticamente todos os organismos vivos. Existe uma classe deles, denominada peptídeos antimicrobianos, as quais não oferecem resistência aos patógenos. Estas moléculas exibem um amplo espectro de atividades biológicas no combate a vírus, fungos e bactérias. Em particular, o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha tem se mostrado uma alternativa promissora para um novo aditivo zootécnico natural como substituição de antibióticos convencionais utilizados na criação de aves de postura como gentamicina, ampicilina e tetraciclina, os quais promovem uma maior saúde gástrica e sanidade dos animais, porém, oferecem resistência microbiana devido às suas potentes atividades biológicas. Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a qualidade dos ovos após a adição de microcápsulas do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha na dieta oral de aves e verificar se o mesmo promoveu melhorias ao sistema imunológico das aves de postura da linhagem *Lohmann White* com 40 semanas de vida. O peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha foi sintetizado, clivado, purificado, caracterizado, microencapsulado pela técnica de gelificação e adicionado à dieta oral de aves poedeiras. A partir disto a qualidade do ovo foi avaliada por meio de análises como peso do ovo, resistência da casca, espessura da casca, altura do albúmen, unidade “Haugh” e gravidade específica. Os dados de consumo diário, temperatura retal e peso corporal foram monitorados semanalmente. Os parâmetros sanguíneos foram verificados por meio da realização do hemograma completo, perfil eletrolítico, e monitoramento da glicose. A avaliação dos tecidos foi realizada através de um estudo histopatológico com marcadores específicos. Fragmentos de baço, fígado, intestino delgado e grosso foram avaliados com base na observação do corte dos tecidos em um todo, identificando a distribuição das células positivas. Foram descartadas as células imunomarcadas dentro de vasos sanguíneos. Os resultados atestam que a síntese, purificação, microencapsulação e liberação do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foram realizadas com sucesso, e os testes mostraram que a incorporação nas micropartículas foi eficiente, com boa liberação nas soluções simuladas estomacal e intestinal, impactando positivamente parâmetros como consumo de ração, conversão alimentar e produção de ovos, embora com variações na qualidade dos ovos e parâmetros sanguíneos das galinhas. Conclui-se nas condições estudadas que não houve diferenças significativas relacionadas ao uso do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha para melhoria da qualidade de ovos e sistema imunológico em galinhas poedeiras, entretanto, fornecem base para futuras investigações de modo a contribuir para a busca de soluções.

Palavras-chave: Aves de postura. Peptídeos antimicrobianos. Sistema imunológico. Qualidade de ovos.

BRANDÃO, Lorenza Eivazian Vianna Nogueira. **Evaluation of egg quality and the immune system in laying hens submitted to supplementation with the antimicrobial peptide Ctx(Ile²¹)-Ha**. 2025. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócio e Desenvolvimento) – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences and Engineering, Tupã, 2024.

ABSTRACT

Microbial resistance requires attention from the scientific community as different pathogenic microorganisms resistant to conventional drugs could lead to the death of 10 million people by 2050. Peptides are natural molecules belonging to the innate immune system of virtually all living organisms. There is a class of these molecules called very versatile antimicrobial peptides, which do not offer resistance to pathogens. These molecules exhibit a broad spectrum of biological activities in combating viruses, fungi and especially bacteria. In particular, the antimicrobial peptide Ctx(Ile²¹)-Ha has shown to be a promising alternative for a new natural zootechnical additive as a replacement for conventional antibiotics used in the breeding of laying birds such as gentamicin, ampicillin, tetracycline that promote greater gastric health and sanitation. of animals, however, they offer antimicrobial resistance due to their potent biological activities against pathogens that affect animal production. Therefore, the present project aims to evaluate the quality of eggs after the addition of microcapsules of the peptide Ctx(Ile²¹)-Ha in the oral diet of birds and verify whether it promoted improvements in the immune system of laying birds of the Lohmann White lineage. at 40 weeks of age. The Ctx(Ile²¹)-Ha peptide was synthesized, cleaved, purified, characterized, microencapsulated by the gelation technique and added to the oral diet of laying birds. From this, egg quality was evaluated through analyzes such as egg weight, shell strength, shell thickness, albumen height, “Haugh” unit and specific gravity. Daily consumption data, rectal temperature and body weight were monitored weekly. Blood parameters were checked by performing a complete blood count, electrolyte profile, and glucose monitoring. Tissue evaluation was carried out through a histopathological study with specific markers. Fragments of spleen, liver, small and large intestine were evaluated based on observation of the tissue section as a whole, identifying the distribution of positive cells. Immunostained cells within blood vessels were discarded. The results attest that the synthesis, purification, microencapsulation and release of the antimicrobial peptide Ctx(Ile²¹)-Ha were carried out successfully, and the tests showed that incorporation into microparticles was efficient, with good release in simulated stomach and intestinal solutions, positively impacting parameters such as feed consumption, feed conversion and egg production, although with variations in egg quality and blood parameters of the hens. It is concluded under the studied conditions that there were no significant differences related to the use of the Ctx(Ile²¹)-Ha peptide to improve egg quality and immune system in laying hens, however, they provide a basis for future investigations in order to contribute to the search for solutions.

Keywords: Antimicrobial peptides. Egg quality. Immune system. Laying hens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mecanismos de interação do peptídeo com a membrana plasmática. modelo "barrel-stave", modelo "carpete" e modelo de poro "toroidal". A cor azul representa os resíduos de peptídeo enquanto os amarelos são resíduos hidrofóbicos. 27
- Figura 2 - Distribuição das aves na câmara climática submetidas a A) conforto térmico (26°C) e B) estresse por calor (35°C). O tamanho das gaiolas representadas pelos retângulos na imagem não condiz com as dimensões reais utilizadas no experimento. O desenho foi feito a fim de conceder ao leitor um entendimento visual da separação das aves nas gaiolas. A gaiolas representadas pela cor branca correspondem as aves que não receberam peptídeo (D0 ou controle); as gaiolas amarelas receberam a dosagem de 2,5 mg/kg de ração (D1) e as gaiolas laranjas receberam a dosagem de 5,0 mg/kg de ração (D2). 45
- Figura 3 - Perfil cromatográfico do peptídeo antimicrobiano puro Ctx(Ile²¹)-Ha. 51
- Figura 4 - Espectro de massa do peptídeo antimicrobiano Ctx (Ile²¹)-Ha purificado. 51
- Figura 5 - Peso médio das galinhas no período do experimento, para cada dosagem testada, no tratamento A) Conforto e B) Estresse por calor. 54
- Figura 6 - Produção de ovos acumulada no período do experimento, para cada dosagem testada, no tratamento A) conforto e B) estresse por calor. As marcações de cor magenta indicam os dias que se aplicaram as doses: controle: 0,0 mg/kg, D1: 2,5 mg/kg e D2: 5,0 mg/kg. 55
- Figura 7 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 20 vezes, do intestino grosso de uma ave que não recebeu dosagem de peptídeo (controle) submetida ao estresse por calor. 59
- Figura 8 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 40 vezes, do baço de uma ave que recebeu a dosagem 1 de peptídeo (D1) submetida ao estresse por calor. 60
- Figura 9 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 40 vezes, do baço de uma ave que recebeu a dosagem 1 de peptídeo (D1) submetida ao conforto térmico. 60
- Figura 10 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 40 vezes, do baço de uma ave que recebeu a dosagem 2 do peptídeo (D2) submetido ao estresse por calor. 61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Coleta e análise de dados.	49
Quadro 2 - Marcadores utilizados	58
Quadro 3 - Marcadores utilizados	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros ideais para a qualidade dos ovos.	21
Tabela 2 - Tipos de tratamento proporcionado às aves de acordo com dosagem do peptídeo e presença de desafio térmico.	44
Tabela 3 - Níveis nutricionais da ração fornecida às aves.	46
Tabela 4 - Ingrediente da ração fornecida às aves.	46
Tabela 5 - Perfil de liberação do peptídeo em solução estomacal simulada (SES) das microcápsulas de Ctx(Ile ²¹)-Ha revestidas com HPMCP de acordo com as massas (%).	53
Tabela 6 - Perfil de liberação do peptídeo em solução intestinal simulada (SIS) das microcápsulas de Ctx(Ile ²¹)-Ha revestidas com HPMCP de acordo com as massas (%).	53
Tabela 7 - Total de ração consumida, total de ovos produzidos e conversão alimentar das galinhas, para cada tratamento de dosagem (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5mg/kg e dose 2: 5,0mg/kg).	53
Tabela 8 - Comparação das médias das variáveis de qualidade do ovo, para a condição de conforto, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).	56
Tabela 9 - Comparação das médias das variáveis de qualidade do ovo, para a condição de estresse por calor, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).	56
Tabela 10 - Comparação das médias dos parâmetros sanguíneos, para a condição de conforto, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).	57
Tabela 11 - Comparação das médias dos parâmetros sanguíneos, para a condição de estresse por calor, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).	57
Tabela 12 - Total de microcápsulas consumidas em porcentagem para a condição de conforto e estresse por calor, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).	62

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA	15
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PANORAMA GERAL DA AVICULTURA DE POSTURA NA REGIÃO DA ALTA PAULISTA	16
1.2 PROBLEMÁTICA	18
2 A PRODUÇÃO DE OVOS E AS AVES DE POSTURA	18
2.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE OVOS	20
2.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	22
2.2.1 Plasma	22
2.2.2 Eritrócitos	23
2.2.3 Leucócitos	24
3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	25
3.1 PANORAMA GERAL	25
3.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	26
3.3 ESTUDOS SOBRE APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM NUTRIÇÃO ANIMAL	28
3.4 SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA (SPFS)	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE OVOS E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE AVES POEDEIRAS SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO COM O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Ctx(Ile²¹)-Ha	39
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile ²¹)-Ha	40
2.2 MICROENCAPSULAÇÃO E REVESTIMENTO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile ²¹)-Ha	41
2.3 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO PEPTÍDEO EM SOLUÇÕES SIMULADAS DO INTESTINO E ESTÔMAGO DAS AVES	42
2.4 DESIGN EXPERIMENTAL	43
2.5 ARRAÇOAMENTO E MONITORAMENTO DO PESO DAS GALINHAS	45
2.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DOS OVOS	46
2.7 ANÁLISE DA CONVERSÃO ALIMENTAR	46
2.8 ANÁLISE DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E FISIOLÓGICOS	47

2.9 AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA	48
2.10 VERIFICAÇÃO DA INGESTÃO DE MICROCÁPSULAS	48
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3 RESULTADOS	50
3.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile ²¹)-Ha	50
3.2 MICROENCAPSULAÇÃO E REVESTIMENTO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile ²¹)-Ha	52
3.3 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS EM SOLUÇÃO ESTOMACAL E INTESTINAL	52
3.4 ANÁLISE DO CONSUMO DE RAÇÃO, CONVERSÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO DAS GALINHAS	53
3.4.1 Produção de ovos	55
3.4.2 Qualidade do ovo	56
3.5 PARÂMETROS SANGUÍNEOS	56
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOPATOLOGIA	57
3.6.1 Interferentes na realização da imunohistoquímica (IHQ)	57
3.6.2. Protocolo utilizado - FLEX Monoclonal Mouse Anti-Myogenin Clone F5D	58
3.7 CONSUMO DAS MICROCÁPSULAS	61
4 DISCUSSÃO	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6 DESAFIOS E ESTUDOS FUTUROS	67
REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A produção de ovos de galinhas poedeiras enfrenta desafios complexos, especialmente em relação à sustentabilidade e à qualidade dos produtos. A crescente demanda por soluções que reduzam os impactos ambientais, ao mesmo tempo em que aumentam a produtividade, tem impulsionado inovações no setor avícola (Almeida; Martins, 2022). Dentro deste cenário, a qualidade dos ovos se configura como um fator de importância central, sendo influenciada por múltiplos aspectos intrínsecos, como a genética, a dieta e as condições de manejo das aves (Cunha; Souza; Pereira, 2023).

Pesquisas recentes enfatizam a relevância de entender os mecanismos biológicos que impactam a qualidade dos ovos, como a influência de compostos bioativos e a interação das aves com o ambiente (Benfield; Henriques, 2020). Nesse sentido, o avanço tecnológico tem se tornado uma prioridade na avicultura, com ênfase na minimização do uso de antimicrobianos, dado o risco de resistência bacteriana associada ao seu uso excessivo (BRASIL, 2018).

A resistência microbiana é uma das questões mais críticas para a saúde pública e animal, sendo particularmente desafiadora em sistemas de produção intensiva, como na avicultura de postura. Estratégias para mitigar essa resistência têm sido amplamente discutidas, incluindo o uso de peptídeos antimicrobianos (PAMs) como alternativas mais seguras e eficazes aos antibióticos convencionais (Aguilar *et al.*, 2023). Esses peptídeos são projetados para inibir patógenos sem prejudicar as células hospedeiras, o que representa uma abordagem promissora para a saúde das aves (Brand *et al.* 2012).

Além disso, o conforto térmico das aves exerce uma influência significativa na qualidade dos ovos. O estudo de Oliveira Castro *et al.* (2023) mostrou que a temperatura ambiente adequada é essencial para garantir o bom desempenho das poedeiras, principalmente em sistemas expostos a temperaturas extremas. A pesquisa sobre práticas sustentáveis na produção de ovos, como melhorias nas condições de alojamento e a adoção de tecnologias inovadoras, tem se destacado, especialmente em sistemas de produção orgânica e alternativas sustentáveis (Rodrigues *et al.*, 2022).

Este capítulo visa explorar a interação entre os fatores fisiológicos, ambientais e tecnológicos que afetam a produção de ovos de galinhas poedeiras, com foco nas estratégias que promovem a sustentabilidade e qualidade no setor avícola.

1.1 PANORAMA GERAL DA AVICULTURA DE POSTURA NA REGIÃO DA ALTA PAULISTA

A avicultura de postura na região da Alta Paulista é uma atividade de grande importância e destaque. O município de Bastos, pertencente a essa região, é o maior polo de produção de ovos do Brasil. Esta atividade movimenta a economia local, pois gera empregos devido à alta incidência de indústrias de insumos para estes animais, como ração e medicamentos, além de embalagens e transporte para comercialização destes produtos. A produção de ovos concentra-se em propriedades rurais de grande e médio porte, que abastecem varejos regionais e de outros estados, como Paraná e Minas Gerais (Silva, 2021).

As principais modalidades de produção presentes no Brasil também são encontradas nesta região: sistema convencional, sistema alternativo e sistema de criação orgânica. O primeiro deles utiliza gaiolas para alavancar a produção e reduzir custos, porém é muito questionado por questões relacionadas ao bem-estar animal. Neste sistema as aves ficam confinadas em gaiolas que limitam seus movimentos, mas, em contrapartida, a produção é mais eficiente (Costa; Almeida, 2019).

O sistema *cage free* vem crescendo devido ao não uso de gaiolas. Este modelo busca atender o mercado de produtos mais sustentáveis, que levam em consideração o bem-estar animal. Nesta modalidade as galinhas ficam livres para se movimentar e o manejo é adaptado às suas necessidades, de modo que o estresse é minimizado. O sistema de criação orgânica compreende a inutilização de produtos químicos para a produção, gerando alimentos mais saudáveis e sustentáveis (Pereira *et al.*, 2020).

A produção de alimentos de qualidade está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas, especialmente ao ODS 2 que visa acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria na nutrição e promover a agricultura sustentável, ao ODS 3 que visa promover a saúde e o bem-estar e ao ODS 13 que busca concentrar esforços para reforçar a resiliência e a capacidade de adaptação a riscos relacionados ao clima e às catástrofes naturais em todos os países (BRASIL, 2018). Nesse sentido, o conceito de Saúde Única, proposto pelo Ministério da Saúde, destaca a importância da integração entre as áreas de saúde humana, animal, vegetal e ambiental. A abordagem de Saúde Única enfatiza a necessidade de práticas sustentáveis e preventivas para garantir alimentos seguros e de qualidade (BRASIL, 2024). A segurança alimentar, que faz parte dessa abordagem, é um dos principais focos deste estudo, já que está relacionada à qualidade nutricional, à inocuidade e à disponibilidade dos alimentos para todos (Ferreira;

Lima; Moura, 2021). Dentre as premissas desta abordagem encontra-se a segurança alimentar que entra em consonância com o presente estudo, resumida na seguinte afirmação:

Considerando que a origem alimentar humana pode ser de base vegetal ou animal, a transformação dos sistemas agroalimentares necessita de boas práticas de produção e de manejo para prevenir, mitigar e gerir o adoecimento de plantas e animais, ao mesmo tempo que se preocupam com a qualidade nutricional, inocuidade e disponibilidade desse alimento para todas as pessoas (BRASIL, 2024).

Dentro desse contexto, a segurança alimentar exige práticas adequadas de produção tanto de alimentos de origem vegetal quanto animal. O Ministério Público tem apontado a importância de melhorar as práticas produtivas no setor agroalimentar para proteger a saúde pública, o que inclui o manejo responsável e a utilização de tecnologias que ajudem a melhorar a qualidade dos alimentos (Silva; Lima; Santos, 2020). No setor avícola, por exemplo, o uso de aditivos que favoreçam a saúde das aves tem sido estudado como uma estratégia importante para reduzir doenças e melhorar a qualidade dos produtos. Dentre essas opções, os PAMs se destacam como promissores para a saúde das aves e a qualidade dos ovos (Santos, 2023).

Em contrapartida, a produção de ovos na Alta Paulista enfrenta desafios econômicos e sociais. A sustentabilidade e bem-estar são questionamentos que têm levado o produtor a buscar novas alternativas para criação, como mudança de práticas de manejo, o que inclui remodelamento de granjas e investimentos em infraestrutura (Rodrigues; Santos; Carvalho, 2022).

Além disso, o mercado de ovos é instável, pois está sujeito a fatores que alteram o preço de venda do produto final como oferta e demanda de ração e crises sanitárias. Por isso, as granjas devem realizar as vacinas necessárias corretamente, além de respeitar as normas para uso de antibióticos, visando evitar multas que geram gastos que poderiam ser evitados. O preço variável dos insumos para a produção de ração de aves de postura como milho e soja afeta diretamente o valor do produto final, o que compromete a rentabilidade do produtor, e, consequentemente, de seus funcionários (Ferreira; Lima; Moura, 2021).

As perspectivas de oportunidades nesta região são o investimento em tecnologia e inovação como automação e rastreabilidade para melhorar a eficiência de produção e reduzir custos. O aumento da exigência por selos de qualidade e certificações por parte dos consumidores pode abrir lacunas para novos entrantes como produtores de ovos orgânicos e ovos advindos de galinhas livres de gaiolas, que agregam valor ao produto (Cunha; Souza; Pereira, 2023).

Portanto, a avicultura de postura da Alta Paulista tem grande potencial para crescimento devido à sua produção em larga escala e alta demanda de consumidores e de granjas e propriedades rurais com aves de postura. No entanto, os desafios ligados à sustentabilidade, manejo e custos produtivos demandam atenção. Concomitantemente as oportunidades de modernização para atender ao público preocupado com o bem-estar animal e manejo adequado promovem competitividade em mercados nacionais e internacionais (Almeida; Martins, 2022).

1.2 PROBLEMÁTICA

O município de Bastos, no Estado de São Paulo, é um exemplo significativo para a análise do impacto das condições climáticas na produção de ovos. Responsável por 55% da produção de ovos do estado, Bastos é considerado um polo nacional dessa produção (IBGE, 2017). Porém, as altas temperaturas e as variações climáticas entre o inverno seco e o verão quente exigem atenção especial, pois essas condições afetam a saúde das aves e, consequentemente, a qualidade dos ovos. Durante períodos de calor excessivo, as aves reduzem a ingestão de alimentos, o que prejudica seu sistema imunológico e as torna mais vulneráveis a doenças, comprometendo a segurança alimentar (Almeida; Martins, 2022).

Nesse cenário, o peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha surge como uma alternativa promissora para o controle de infecções em aves, contribuindo para a redução da mortalidade e para o aumento da resistência a patógenos. Estudos recentes (Silveira; Roque-Borda; Vicente, 2021. Roque-Borda *et al.*, 2022) demonstraram que esse peptídeo pode combater bactérias, fungos e parasitas, além de desempenhar uma função que ajuda a regular o sistema imunológico das aves, melhorando sua saúde em condições de estresse. Esses achados estão em consonância com as necessidades apontadas pelo Ministério da Saúde e pelo Ministério Público, que buscam melhorias nas práticas sanitárias e de manejo na produção de alimentos.

Dado o potencial do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha, o presente estudo se propôs a sintetizar, purificar, caracterizar e microencapsular esta molécula para avaliar sua eficácia na promoção da imunidade das aves e sua contribuição para a melhoria da qualidade dos ovos.

O objetivo é investigar como esse peptídeo pode ser integrado nas práticas de manejo avícola, seguindo as diretrizes das políticas públicas de saúde e segurança alimentar (BRASIL, 2024). Com isso, o estudo pretende não só entender os mecanismos de ação do peptídeo, mas também avaliar seu uso como uma ferramenta para fortalecer a segurança alimentar e melhorar a saúde pública.

2 A PRODUÇÃO DE OVOS E AS AVES DE POSTURA

A faixa de temperatura na qual as galinhas encontram-se em bem-estar térmico situa-se entre 21 e 28°C (Freeman, 1988). Visto isso, qualquer faixa de temperatura acima deste intervalo compromete o desempenho de postura das aves. Deste modo, as aves podem apresentar aumento da ingestão de água, diminuição do consumo de ração, e, por consequência, da qualidade dos ovos (Oliveira *et al.*, 2014).

Isto ocorre porque o estresse por calor causa um desequilíbrio da capacidade das células do duodeno transportarem o cálcio necessário para a casca do ovo, fazendo com que exista uma perda dos ovos por trincas. Além disso, pode ocorrer uma baixa produtividade de postura devido a diminuição do consumo alimentar (Oliveira Castro *et al.*, 2023). Ademais, a redução do consumo alimentar pode causar diminuição dos nutrientes necessários para o crescimento da ave e reduzir a digestibilidade de proteínas e aminoácidos (Sanjaya *et al.*, 2024).

As aves sob estresse térmico podem apresentar deficiências nos parâmetros hematológicos e, consequentemente, nos fatores imunológicos presentes no sangue. A necessidade da realização de hemogramas para contagem de hemácias, concentração de hemoglobinas e hematócritos é primordial para verificação da incidência de anemias (Rodrigues *et al.*, 2021).

As aves de postura possuem uma estrutura de formação de ovos. Este sistema é composto por ovário e oviduto esquerdo, que são controlados pelo sistema endócrino que contém o hipotálamo, hipófise e folículos ovarianos. Para que a postura ocorra, é necessário que o sistema endócrino e os órgãos reprodutores estejam em consonância (Floriano, 2013).

Entre 18 e 20 semanas de idade, a ave atinge a maturidade sexual: o ovário começa a se desenvolver e passa a ter uma conformação parecida com um “cachos de uva”; dentro dele, forma-se a estrutura da gema e com a produção do Hormônio Luteinizante (LH), no qual é liberado rompendo uma camada chamada estigma, que não contém vasos sanguíneos. Após o desprendimento do óvulo, este é levado para o oviduto até chegar ao útero. Durante o processo, ocorre a deposição de albúmen e a formação da casca, que leva em média um dia. Após 30 minutos, a galinha está pronta para um novo ciclo de formação de ovos (Floriano, 2013).

Para que o ciclo de postura seja eficiente, existem diversos fatores que influenciam a produção de ovos. Dentre eles, pode-se destacar a genética das aves, nutrição, ambiente e manejo. O fornecimento de ração com ingredientes e quantidade adequada promovem um ganho de peso e eliminação de deficiências nutricionais que podem causar decaimento na qualidade e produção de ovos e/ou suspensão de postura (Camargo *et al.*, 2020).

As condições ambientais como temperaturas entre 15- 28 ° C, umidade dentro da faixa de 40-80% e um período entre 14-16 horas de luz contribuem para que a ave não fique

estressada e mantenha-se em conforto para realizar a postura. O manejo adequado, com a verificação e controle de ectoparasitas e endoparasitas, por exemplo, são essenciais para alavancar a produção de ovos. Sendo assim, a produção de ovos de qualidade depende da união de fatores diversos, e, dentre eles, destaca-se a saúde das galinhas, conforto térmico, manejo adequado e genética (Camargo *et al.*, 2020).

2.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE OVOS

A qualidade do ovo é medida pela densidade ou gravidade específica, resistência e espessura da casca, peso do ovo, altura do albúmen e unidade Haugh (UH) (Sjofjan *et al.*, 2021).

É possível medir a densidade do ovo mergulhando-os em soluções salinas que variam entre 1,060 e 1,100 g/cm³. A gravidade específica ou densidade da casca consiste no valor da menor densidade que o ovo flutua. Caso o ovo não flutue, deve-se mergulhá-lo na próxima solução, que contém mais sal. O valor adequado para esse parâmetro está acima de 1,085 g/cm³, pois quanto maior a gravidade específica, maior a densidade da casca e, consequentemente, maior a resistência (Johnson; Merritt, 1955).

A resistência da casca é avaliada através da força de compressão necessária para quebrar a casca. Este valor deve encontrar-se acima de 4 kgf para que a casca seja resistente. A espessura da casca é avaliada como auxílio de um micrômetro, onde são elencados três pontos equidistantes na zona equatorial da casca e, após as mensurações e cálculo da média aritmética entre os três valores, encontra-se a espessura (Kocevski; Nikolova; Kuzelov, 2011). Espera-se que o valor seja acima de 0,35 mm para a espessura ser considerada adequada (Vaccinar, 2019). Há uma relação entre o peso do ovo e a resistência da casca. Estas duas grandezas, geralmente são inversamente proporcionais (Kocevski; Nikolova; Kuzelov, 2011).

Assim, o peso ideal do ovo é um parâmetro fundamental na avaliação da qualidade dos ovos produzidos por galinhas poedeiras comerciais. De acordo com Camargo *et al.* (2020), o peso ideal para ovos de galinhas comerciais varia entre 55 e 65 gramas, dependendo da linhagem da ave e da fase de produção. Esse valor está relacionado a fatores como a alimentação, a genética e o manejo adotado, sendo um dos principais indicadores na classificação dos ovos. O peso adequado assegura uma proporção equilibrada entre gema e clara, o que contribui para a boa qualidade física e química do produto. Além disso, Kocevski, Nikolova e Kuzelov (2011) destacam que o controle do peso do ovo pode evitar defeitos estruturais, como rachaduras e deformações, melhorando a aparência e o valor comercial do produto.

Quanto à altura do albúmen, é outro aspecto importante para a qualidade interna do ovo, refletindo seu frescor e integridade. Segundo Oliveira Castro *et al.* (2023), a altura ideal do albúmen deve ser de, no mínimo, 6 mm, o que indica um ovo fresco, com clara firme e bem formada. Quando essa altura diminui, isso pode ser um sinal de envelhecimento do ovo ou de condições de estresse nas aves. Oliveira *et al.* (2014) afirmam que fatores como temperatura, iluminação e qualidade da alimentação afetam diretamente a altura do albúmen e, consequentemente, a qualidade do ovo. Manter uma altura adequada do albúmen é essencial para preservar as características sensoriais do ovo, como a consistência da clara e a facilidade de quebra da casca.

A UH é a medida da altura do albúmen corrigida pelo peso do ovo e deve encontrar-se acima de 72 para que o ovo seja considerado de excelente qualidade a partir deste parâmetro. Os valores entre 60 e 73 indicam que o ovo possui alta qualidade e os valores abaixo de 60 indicam baixa qualidade (Romero *et al.*, 2024). Desse modo, a Tabela 1 abaixo ilustra os parâmetros ideais para a qualidade de ovos na revisão.

Tabela 1 - Parâmetros ideais para a qualidade dos ovos.

Parâmetros	Valor Ideal	Autores
Densidade	> 1,085 g/cm ³	Johnson; Merritt, 1955
Resistência	4 kgf	Kocevski; Nikolova; Kuzelov, 2011
Espessura da casca	> 0,35 mm	Vaccinar, 2019
Peso do ovo	55 - 65 g	Camargo <i>et al.</i> , 2020; Oliveira <i>et al.</i> , 2014
Altura do albúmen	≥ 6 mm	Kocevski; Nikolova; Kuzelov, 2011; Oliveira Castro <i>et al.</i> , 2023
Unidade Haugh (UH)	> 72	Romero <i>et al.</i> , 2024

Fonte: Autora (2024).

O tempo de análise dos ovos têm um impacto direto na avaliação de diversos parâmetros de qualidade, como densidade, resistência, espessura da casca, peso do ovo, altura do albúmen e a UH, de acordo com os valores ideais apresentados na Tabela 1.

A densidade do ovo, que deve ser superior a 1,085 g/cm³ (Johnson; Merritt, 1955), pode ser alterada por condições inadequadas de armazenamento ou por análises realizadas após longos períodos de tempo. Durante o armazenamento, o ovo tende a perder massa, o que pode diminuir sua densidade e, consequentemente, sua qualidade. A resistência da casca, que idealmente deve ser de 4 kgf (Kocevski; Nikolova; Kuzelov, 2011), também é sensível ao tempo de análise, pois a casca pode sofrer alterações em sua integridade com o envelhecimento, tornando-se mais frágil.

A espessura da casca é outro parâmetro relevante, sendo o valor ideal superior a 0,35 mm (Vaccinar, 2019). Com o tempo, a casca pode se tornar mais fina devido à perda de cálcio, o que diminui a resistência física do ovo. A altura do albúmen, que deve ser de pelo

menos 6 mm (Kocevski; Nikolova; Kuzelov, 2011; Oliveira Castro *et al.*, 2023), também diminui à medida que o ovo envelhece. Isso ocorre porque o albúmen perde água e suas proteínas se alteram, prejudicando a avaliação da frescura do ovo.

A UH, que, como mencionado, deve ser superior a 72 (Romero *et al.*, 2024), é uma medida que reflete a qualidade do albúmen. O tempo de análise influencia diretamente essa medição, pois o albúmen se torna mais ralo com o envelhecimento do ovo. Dessa forma, se a análise não for realizada rapidamente após a postura, os valores da UH podem ser comprometidos, o que resulta em uma avaliação menos precisa da qualidade do ovo.

O peso do ovo, que deve variar entre 55 e 65 g (Camargo *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2014), também pode ser alterado por fatores como a alimentação das aves e o tempo de armazenamento. O ovo perde peso com o tempo, o que pode reduzir o valor registrado e dificultar a avaliação de seu valor nutricional e qualidade.

Em resumo, o tempo entre a postura e a análise é fundamental para garantir a precisão na avaliação dos parâmetros de qualidade dos ovos. A manutenção da qualidade está diretamente relacionada ao tempo de armazenamento e às condições de manejo do ovo até o momento da análise. O prolongamento desse período pode afetar negativamente a avaliação dos parâmetros ideais e, consequentemente, a classificação do produto final.

2.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

2.2.1 Plasma

Os eletrólitos presentes no plasma sanguíneo das aves fazem parte da composição dos órgãos e tecidos das aves, além de auxiliar o equilíbrio ácido-base e compor os fluídos corporais. O cálcio (Ca) participa majoritariamente da formação da casca do ovo enquanto o sódio (Na), cloro (Cl) e potássio (K) controlam o equilíbrio ácido-base (Lumeji, 1997).

Valores de Na e K alterados podem indicar problemas renais como hipercalemia e hiperfosfatemia. Quando as aves não recebem o Ca necessário em sua alimentação, elas desenvolvem uma patologia denominada hiperparatireoidismo secundário nutricional que corresponde a absorção de Ca que seria disponibilizado para a formação de seus ossos; esse fato causa problemas de ordem óssea, como osteoporose e "fadiga de gaiola", que resulta em uma ave que apresenta dificuldades para ficar em pé e, por isso, não se alimenta e nem bebe água o suficiente para o seu bom desenvolvimento de postura. Sendo assim, os níveis de Ca podem diminuir em até 50%, afetando a formação do ovo (Schmidt *et al.*, 2007; Saif *et al.*, 2008; Berchieri Jr. *et al.*, 2009).

O cálcio é o mineral que forma parte dos ossos e a casca dos ovos, por isso, tem um importante papel diante de reações bioquímicas no corpo dos animais. O cálcio iônico (iCa) não é a fração ativa do cálcio e seus valores não são alterados pela concentração de albumina, enquanto o cálcio total (tCa) sofre uma queda quando há baixas doses de albumina no sangue da ave (Schmidt *et al.*, 2007; Saif *et al.*, 2008; Berchieri Jr. *et al.*, 2009).

As aves possuem concentrações mais altas de cálcio no sangue quando comparadas a mamíferos, podendo chegar a 30g/L, por conta da sua fisiologia de formação dos ovos. Em sua fase reprodutiva o cálcio é transportado para o ovário induzido por hormônios estrógenos. Por isso, a idade dos animais é um fator primordial para a correta análise de valores de cálcio em aves. Valores >11 mg/dL ou <8,42 mg/dL constituem hipercalcemia e hipocalcemia, respectivamente. A hipocalcemia pode estar relacionada a deficiências nutricionais ou excesso de fósforo nas dietas (Schmidt *et al.*, 2007; Saif *et al.*, 2008; Berchieri Jr. *et al.*, 2009).

As proteínas plasmáticas totais (PPT) são divididas em albuminas, globulinas e fibrinogênios; elas participam de processos relacionados ao transporte de substâncias, regulação de enzimas, imunidade e pressão osmótica do plasma (Swenson; O'Reece, 1996; Boettcher, 2004). As albuminas são sintetizadas no fígado e os níveis normais encontram-se dentro da faixa de 16 a 20 g/L (Lumeij, 1997; Kaneko; Harvey; Bruss, 1997; Schmidt *et al.*, 2007). Em processos inflamatórios e/ou desidratação, ocorre um aumento das PPT. Em contrapartida, aves com problemas renais e doenças gastrointestinais apresentam diminuição na quantidade de PPT. O teor de PPT no soro das galinhas em período de postura é de cerca de 54 g/L (Burke, 1996; Swenson; O'Reece, 1996).

2.2.2 Eritrócitos

Os glóbulos vermelhos do sangue são conhecidos como eritrócitos ou hemácias, mas, diferentemente dos seres humanos, as galinhas possuem hemácias nucleadas e ovais que vivem entre 28 e 35 dias. A contagem das hemácias permite verificar a incidência de anemias ou hemoconcentração, além de auxiliarem no processo de coagulação (Sturkie; Griminger, 1976; Noriega, 2000). Além disso, há presença de heterófilos que são células próprias de aves e répteis (Harris, 2000).

Os hematócitos são unidades de medida para contabilizar as hemácias presentes no sangue. Por isso, em aves com doenças crônicas ou agudas, há uma diminuição do valor de hematócitos (Campbell, 1994).

A hemoglobina é a proteína que confere a cor vermelha ao sangue e é a responsável pelo transporte de CO₂ dos tecidos até o pulmão das aves e de O₂ do pulmão aos tecidos. Deste

modo, o valor do pH do sangue é mantido e as trocas gasosas ocorrem (Noriega, 2000). A quantificação da hemoglobina serve também para indicar uma possível anemia.

A mensuração da glicose também é um parâmetro importante para verificar a saúde das aves. Os parâmetros de glicose nas aves podem variar entre 130 a 270 mg/dL. Nas aves saudáveis, estes parâmetros podem variar entre 200 a 500 mg/dL e, como nos mamíferos, o metabolismo da glicose nesses animais é regulado pela insulina e tem como o seu antagonista o glucagon (Swenson; O'Reece, 1996).

A hipoglicemia e hiperglicemia ocorrem quando os níveis de glicose caem para menos de 200 mg/dL ou ficam acima de 500 mg/dL, respectivamente. A hiperglicemia é detectada quando a ave apresenta poliúria, aumento do consumo de água e alimento, bem como perda de peso. Altos níveis de glicocorticóides em situações de esforço, excitação ou estresse térmico por calor favorecem o aparecimento da hiperglicemia em aves, podendo ser um marcador de estresse para esses animais (Schmidt *et al.*, 2007).

2.2.3 Leucócitos

Os leucócitos têm uma porcentagem muito menor no sangue quando comparados aos eritrócitos. Estes, são divididos em granulócitos e agranulócitos. Os granulócitos compreendem os basófilos, eosinófilos e heterófilos, enquanto os linfócitos e monócitos compõem os agranulócitos.

Estas células, geralmente, estão presentes no sangue em casos de infecções de vias respiratórias ou parasitárias (Harris, 2000). Estas células também fazem parte da coagulação dos tecidos, onde auxiliam a chegada de macrófagos no local afetado. O estresse térmico, tensão ou processos septicêmicos podem fazer com que o número de basófilos também aumente (Goulart, 2006).

Os eosinófilos, assim como os basófilos também são arredondados e possuem núcleo evidente. Estas células estão presentes no sangue das aves quando alguma doença produz um quadro de eosinofilia, como parasitismo, por exemplo (Harris, 2000).

Os heterófilos são irregulares e longos, muito semelhante aos neutrófilos. Porém, as aves não possuem neutrófilos na constituição do seu sangue. O núcleo destas células é pouco evidente. Eles participam da defesa do organismo contra infecções bacterianas e inflamações.

Quando o processo inflamatório é severo, ocorre a estimulação de heterófilos, o que leva a um quadro de leucocitose (Goulart, 2006). Quando a contagem de heterófilos é demasiada alta, elas acompanham quadros de aspergilose, tuberculose ou infecções por

clamídia, ao passo que o aumento sutil de leucócitos pode indicar a presença de necrose das células (Harris, 2000).

Os linfócitos são morfologicamente redondos, responsáveis pela produção de anticorpos. Estes fazem com que ocorra o amadurecimento do sistema de defesa. Nas aves, eles são divididos em linfócitos T e B, como nos mamíferos (Goulart, 2006). A linfocitose pode estar associada a infecções virais, como clamidiose ou em quadros de leucemia (Harris, 2000).

3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

3.1 PANORAMA GERAL

A eficácia dos antimicrobianos não é previsível contra alguns patógenos emergentes, os quais podem causar efeitos colaterais indesejáveis, além da resistência microbiana. Sendo assim, a urgência pelo desenvolvimento de novos fármacos é uma realidade, fato já anunciado pela Organização Mundial da Saúde em 2015 e que está colocando em risco o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) (BRASIL, 2018). Da mesma forma, fatores ambientais afetam a saúde das aves domésticas, o que pode influenciar sua suscetibilidade às infecções microbianas (Freeman, 1988).

Visto isso, peptídeos são moléculas orgânicas compostas por aminoácidos ligados por intermédio de uma ligação peptídica, e possuem diversas aplicações. Dentre elas, encontra-se uma promissora alternativa ao uso de fármacos convencionais para a erradicação de doenças causadas por fungos e bactérias. Uma classe de peptídeos que combatem esses microrganismos são os PAMs, moléculas que fazem parte do sistema inato de defesa da maioria dos organismos vivos (He; Deber, 2024). A compreensão dos mecanismos de doenças em aves fornece *insights* sobre interações microbianas, essenciais para o avanço dos AMPs como agentes terapêuticos (Berchieri Junior *et al.*, 2009).

Os PAMs podem ser classificados em cinco grupos principais: (1) peptídeos que adotam conformações de fitas- β , estabilizadas por duas ou três ligações de dissulfeto; (2) peptídeos sem resíduos de cisteína (Cys), que formam estruturas α -hélice anfipáticas; (3) peptídeos aniônicos, ricos em aspartato (Asp) e glutamato (Glu); (4) peptídeos ricos em resíduos de Triptofano (Trp), Prolina (Pro) e/ou Histidina (His) e (5) peptídeos compostos por aminoácidos raros, como as gramicidinas, que consiste em um antibiótico polipeptídico obtido a partir do *Bacillus brevis* (Primo *et al.*, 2024). Essas classificações oferecem *insights* valiosos

para o desenvolvimento de novos medicamentos baseados em AMP (Benfield: Henriques, 2020).

Os PAMs atuam interagindo com a membrana plasmática das bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo que a parede celular das bactérias gram-positivas é composta por uma camada espessa de peptidoglicanos e por ácidos lipoproteicos, ao passo que a parede celular das bactérias gram-negativas é composta pela presença de uma membrana externa, apresentando lipopolissacarídeos externos a esta membrana (Espeche *et al.*, 2024). Desse modo, a interação seletiva do peptídeo com a membrana do microrganismo faz com que haja um extravasamento do líquido intracelular, causando a morte do mesmo (Primo *et al.*, 2024).

Especificamente um peptídeo antimicrobiano denominado Ctx(Ile²¹)-Ha, que foi isolado da secreção cutânea da rã *Boana albopunctata*, uma família de anfíbios denominada Hylidae (Aguilar *et al.*, 2023), tem a capacidade de destruir as membranas plasmáticas das bactérias, podendo levar o patógeno à morte (Vicente *et al.*, 2013). Recentemente, alguns trabalhos foram publicados relacionando o uso deste peptídeo como aditivo nutricional para aves de postura com a promoção de saúde intestinal, imunidade e melhoria da qualidade de ovos.

3.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os PAMs membranolíticos atuam interagindo com a membrana plasmática das bactérias gram-positivas e gram-negativas. A parede celular de ambas as bactérias possuem diferenças estruturais. A primeira é composta por uma espessa camada de peptidoglicanos (PG) e ácidos lipoproteicos, ao passo que a parede celular das bactérias Gram-negativas possui uma membrana externa com lipopolissacarídeos (Brand, 2012).

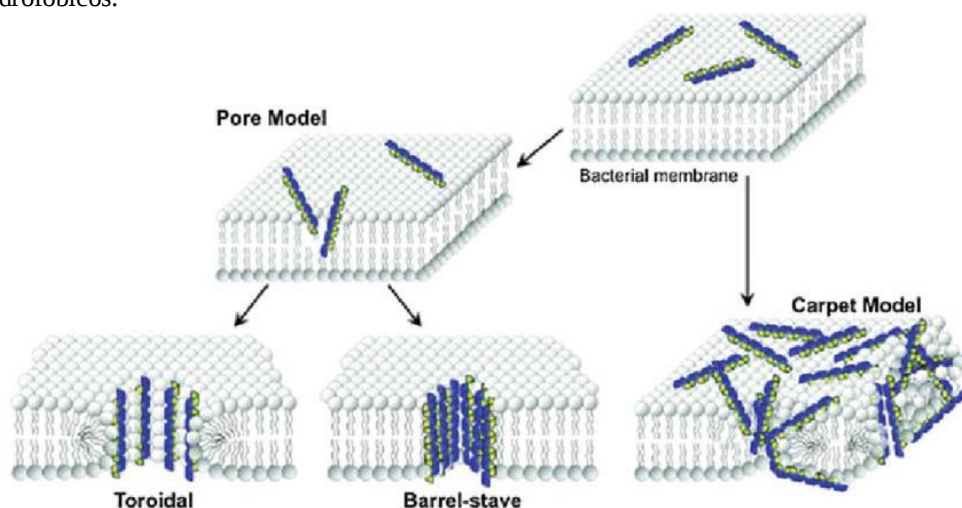
Desse modo, há uma seletividade na interação das bactérias com os peptídeos, causando extravasamento do líquido intracelular levando à morte do agente patogênico. Basicamente, há três maneiras de interação peptídeo-membrana: poro do tipo barril (*barrel-steve*), poro toroidal ou carpete. O modelo tipo poro barril foi proposto por Xu e Huang (2000); os peptídeos helicoidais revestem a camada interna do poro e as superfícies hidrofóbicas começam a interagir entre si e entre as cadeias dos fosfolipídeos. Para isso, o comprimento do peptídeo deve ser suficiente para conseguir atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana plasmática.

O modelo poro toroidal foi descrito por Yang (2001), onde a bicamada lipídica e a hélice anfipática do peptídeo interagem entre si formando um “canal”. O modelo Carpete proposto por Shai (1999) consiste na aglomeração paralela dos peptídeos à bicamada lipídica

da membrana plasmática, que forma uma espécie de carpete. As interações eletrostáticas e hidrofóbicas agem em conjunto para promover ligações entre lipídeos e peptídeos. Os resultados satisfatórios no combate a agentes microbianos dependem destas interações. A Figura 1 retrata esquematicamente a interação peptídeo-membrana.

Os peptídeos bioativos, especialmente os catiônicos, têm uma ampla ação antimicrobiana, o que os torna um tema de crescente interesse nas áreas de biotecnologia e medicina. Os peptídeos catiônicos, como os encontrados em anuros, são bastante estudados por sua capacidade de interagir com membranas lipídicas e exercer atividades antimicrobianas, antibiofilme, antifúngicas e antivirais. De acordo com Aguilar *et al.* (2023), esses peptídeos são eficazes devido à sua carga positiva, que facilita a interação com as cargas negativas nas membranas das células microbianas, levando à sua desestabilização e, por fim, à morte celular.

Figura 1 - Mecanismos de interação do peptídeo com a membrana plasmática. modelo "barrel-stave", modelo "carpete" e modelo de poro "toroidal". A cor azul representa os resíduos de peptídeo enquanto os amarelos são resíduos hidrofóbicos.



Fonte: Palermo; Vemparala; Kuroda, 2013.

Esses peptídeos também apresentam um mecanismo de ação diferente dos antibióticos convencionais, uma vez que não dependem de mecanismos de resistência específicos, tornando-os uma alternativa promissora para combater patógenos resistentes. O estudo de Espeche *et al.* (2024) explica que, ao interagir com as membranas celulares, os peptídeos catiônicos podem criar poros ou canais, permitindo a entrada de substâncias tóxicas ou a saída de componentes essenciais para a célula, o que leva à perda do equilíbrio celular. Essa ação pode ser ampliada pela modificação de suas estruturas ou pela combinação com outras substâncias, como nanopartículas ou polímeros, o que aumenta suas propriedades terapêuticas, como demonstrado por Roque-Borda *et al.* (2022).

Além disso, esses peptídeos têm sido usados em várias áreas, desde a medicina veterinária até a indústria farmacêutica, sendo explorados no tratamento de infecções bacterianas, especialmente aquelas causadas por bactérias resistentes, como as do gênero *Salmonella*, conforme relatado por Roque-Borda *et al.* (2024). A eficácia dos peptídeos catiônicos também está sendo investigada para prevenir infecções em aves, destacando seu potencial para melhorar a saúde animal e, assim, aumentar a produtividade em sistemas de produção de ovos (He; Deber, 2024).

O uso de PAMs, além de sua capacidade de combater infecções, também é uma estratégia importante para a sustentabilidade, pois pode reduzir a dependência de antibióticos e diminuir os impactos ambientais relacionados ao uso excessivo desses medicamentos (Almeida; Martins, 2022). No entanto, como enfatizado por Pereira *et al.* (2020), o desenvolvimento de peptídeos terapêuticos precisa ser cuidadoso, levando em conta fatores como estabilidade, toxicidade e absorção dos compostos.

3.3 ESTUDOS SOBRE APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM NUTRIÇÃO ANIMAL

Houve redução da mortalidade de frangos e da contagem bacteriana nos primeiros dias de vida, com diminuição de 69% da mortalidade em relação ao grupo controle após avaliação do efeito *in vivo* de microcápsulas que continham o PAM Ctx(Ile²¹)-Ha, as quais foram suplementadas em dietas de poedeiras previamente infectadas com *Salmonella enteritidis* (Roque Borda *et al.*, 2022)

O peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha reduziu a carga bacteriana no fígado, apresentando diferenças estatísticas significativas entre o grupo controle e o grupo que recebeu 2,5 mg de Ctx(Ile²¹)-Ha/kg com dois dias pós-infecção, indicando eficácia do peptídeo sobre a infecção (Roque-Borda *et al.*, 2022; Silveira; Roque-Borda; Vicente, 2021). Além do peptídeo Ctx (Ile²¹)-Ha ter demonstrado atividade antimicrobiana contra bactérias, outros estudos com peptídeos se mostraram promissores.

Um peptídeo pequeno com três aminoácidos misturado a uma ração composta por farelo de milho e soja, cuja dosagem foi 4,5 g/kg de peptídeo, demonstrou ser um promissor promotor de crescimento e saúde intestinal, devido à melhoria da condição da microbiota e integridade do intestino de pintainhas da linhagem *Tianfu Green Shell* com uma semana de vida. Além disso, a molécula elevou parâmetros de imunidade como imunoglobulina sérica e índices antioxidantes em aves de postura com 40 semanas (Zhao *et al.*, 2022).

A taxa de produção e peso dos ovos aumentou significativamente após a suplementação da ração com um peptídeo derivado da soja e vitamina E em aves com 45

semanas de idade da linhagem *Lohmann White* para a dosagem de 5g/kg de peptídeo adicionado à dieta basal dos animais (Sharma *et al.*, 2024).

A suplementação da ração de aves de postura de linhagem *Leghorn* com 36 semanas de vida com proteínas de célula única (SCP) melhora a eficiência de produção por meio da promoção e modulação de saúde intestinal e fortalecimento do sistema imunológico (Dehsahraee *et al.*, 2024).

Posto isto, devido ao vasto estudo com peptídeos dentro do setor da avicultura, o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha é um candidato promissor para ser usado como aditivo nutricional em dietas de aves para controlar infecções microbianas.

3.4 SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA (SPFS)

Existem dois métodos para a obtenção de moléculas peptídicas. A reação de obtenção pode ocorrer em solução ou com o auxílio de um suporte polimérico conhecido como resina. Quando a reação acontece por meio do segundo método citado, a mesma é intitulada Síntese peptídica em Fase Sólida (SPFS).

O processo é realizado com o amparo do suporte inerte e insolúvel, que é a resina. Esta, possui grupos que reagem com os aminoácidos da sequência peptídica. Os resíduos de aminoácidos são protegidos por grupos em suas cadeias laterais e em sua porção N-terminal. A função destes grupos é impedir que ocorram reações secundárias que não são interessantes ao processo (Vicente *et al.*, 2013).

As etapas da SPFS são divididas em três partes: acoplamento, desproteção e clivagem. O acoplamento consiste na união de dois aminoácidos por meio da ligação entre os grupamentos Fmoc de cada um deles junto ao suporte polimérico. Para que ocorra essas ligações é necessário que o aminoácido em questão reaja com agentes acoplantes sólidos e líquidos para formar um estado reativo, o que possibilita o ataque nucleofílico do carbono pertencente ao grupo carboxílico livre (Silveira; Roque-Borda; Vicente, 2021).

A desproteção consiste em retirar o grupamento Fmoc da porção N-terminal do aminoácido para que seja possível que outras ligações ocorram. Essa retirada não pode comprometer os protetores das cadeias laterais. Na química Fmoc estes protetores são base-lábeis à piperazina, que é uma base orgânica (Finn; Hofmann, 1976).

Entre as etapas de acoplamento e desproteção, solventes orgânicos são usados para fazer a lavagem da molécula para retirar sujidades e eliminar possíveis subprodutos formados, além de facilitar a obtenção de uma molécula pura (Finn, Hoffman, 1976).

A clivagem consiste na quebra da ligação entre o peptídeo e o suporte polimérico com o auxílio de éter extremamente gelado, para facilitar a precipitação da molécula. A remoção dos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos também ocorre nesta etapa após a adição de ácido trifluoracético (TFA). Inúmeras reações adversas podem ocorrer durante esse processo da SPFS como mudanças na cadeia lateral, reações com grupos ionizáveis ou necessidade de mais cautela durante o processo (Cilli *et al.*, 2017).

Após a clivagem, os peptídeos passam pelas etapas de purificação, caracterização e, em alguns casos, microencapsulação para garantir sua funcionalidade e estabilidade em aplicações clínicas e industriais. A purificação é essencial para eliminar impurezas e obter peptídeos em alta pureza. Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia por afinidade são empregadas para separar as moléculas com base em propriedades como peso molecular, carga elétrica e solubilidade. Esse refinamento é importante, pois a eficácia dos PAMs depende diretamente de sua estrutura preservada e composição pura (Ma *et al.*, 2024).

Em seguida, a caracterização é realizada para identificar as propriedades estruturais e funcionais dos peptídeos. Métodos como espectrometria de massa, dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear permitem determinar sua composição, estabilidade e resistência à degradação. Essas informações são fundamentais para prever o comportamento dos peptídeos em diferentes ambientes, como no organismo humano ou em formulações industriais (Zhang *et al.*, 2021; Talapko *et al.*, 2022).

Por fim, a microencapsulação é uma estratégia eficaz para proteger os peptídeos em condições desfavoráveis, como variações de pH, degradação enzimática e oxidação. Essa técnica envolve encapsular os peptídeos em materiais como polímeros ou lipídios, formando estruturas que preservam sua integridade. Além disso, permite uma liberação controlada, prolongando sua atividade antimicrobiana e otimizando sua eficácia em tratamentos ou aplicações industriais (Benfield; Henriques, 2020; Ma *et al.*, 2024).

Assim, as etapas de purificação, caracterização e microencapsulação desempenham funções fundamentais no aproveitamento do potencial dos PAMs. Esses processos garantem moléculas mais seguras e eficazes, destacando os PAMs como ferramentas inovadoras no combate a infecções e em diversas aplicações biotecnológicas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os PAMs surgem como uma alternativa promissora para enfrentar os problemas causados pela resistência aos antimicrobianos, um dos maiores desafios para a saúde pública

mundial. Sua capacidade de combater uma ampla variedade de patógenos, incluindo bactérias resistentes aos antibióticos convencionais, os torna uma opção importante no controle de infecções, tanto em hospitais quanto na indústria. Além disso, a ação dos PAMs não se limita ao tratamento de infecções, podendo também promover a saúde intestinal e fortalecer o sistema imunológico, especialmente no contexto da avicultura.

O uso de peptídeos como aditivos em rações de aves de postura tem mostrado resultados positivos, como a redução da mortalidade, o controle de infecções bacterianas e o aumento da produção de ovos. A capacidade de modificar a estrutura dos peptídeos e combiná-los com outras substâncias, como nanopartículas, pode ainda melhorar suas propriedades terapêuticas, tornando-os mais eficazes no combate a doenças e na promoção da saúde.

A síntese peptídica em fase sólida (SPFS) é uma técnica fundamental para a produção desses compostos, permitindo a obtenção de peptídeos com alta pureza e eficácia. Embora o processo envolva alguns desafios técnicos, as etapas de purificação, caracterização e microencapsulação garantem a qualidade e a estabilidade dos peptídeos, tornando-os mais eficazes para diferentes aplicações científicas e médicas.

Em resumo, o uso dos PAMs, especialmente na avicultura, oferece não apenas benefícios para a saúde e a produção animal, mas também contribui para a diminuição do uso de antibióticos convencionais, ajudando a preservar a saúde pública e o meio ambiente. O avanço dos estudos e das inovações nessa área é essencial para consolidar os PAMs como uma solução segura e eficaz no combate a infecções, representando uma alternativa viável diante da crescente resistência aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, S.; BRUNETTI, A. E.; GARAY, A. V.; SANTOS, L. C.; PEREZ, L. O.; MOREIRA, D.; CANCELARICH, N. L.; BARBOSA, E. A.; BASSO, N. G.; FREITAS, S. M.; FAIVOVICH, J.; BRAND, G.; CABRERA, G. M.; LEITE, J. R. S. A.; MARANI, M. M. Structure and function of cationic hylin bioactive peptides from the tree frog *Boana pulchella* in interaction with lipid membranes. **Peptides** (N.Y.), v. 159, p. 170-900, jan., 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170900>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978122001668>. Acesso em: 12 ago. 2024.
- ALMEIDA, F. L.; MARTINS, G. P. Avicultura de postura e o futuro da produção sustentável. **Estudos em Economia Agrícola**, v. 37, n. 2, p. 50-60, 2022.
- ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. M. Patologia clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. S.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 939-966.

BENFIELD, A. H.; HENRIQUES, S. T. Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs. intracellular mechanisms. **Frontiers in Medical Technology**, v. 2, p. 610997, dez., 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.610997>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/medical-technology/articles/10.3389/fmedt.2020.610997/full>. Acesso em: 04 dez. 2024.

BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009.

BRAND, G. D.; MAGALHÃES, M. T. Q.; TINOCO, M. L. P.; ARAGÃO, F. J. L.; NICOLI, J.; KELLY, S. M.; COOPER, Alan; BLOCH JR, Carlos. Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. 45848, set., 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0045848. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045848>. Acesso em: 09 nov. 2024.

BRASIL. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília: Ministério da Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2018. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_. Acesso em: 11 ago. 2024.

BRASIL. Uma Só Saúde: o que é uma só saúde. **Ministério da Saúde**, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/u/uma-so-saude>. Acesso em: 10 nov. 2024.

BURKE, W. H. Reprodução das aves. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O., DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 660-680.

CAMARGO, S.; OLIVEIRA, H.; CARVALHO, D.; ISMAR, M.; REZENDE, P.; SOUTO, C.; OLIVEIRA, S. Fatores intrínsecos à poedeiras comerciais que afetam a qualidade físico-química dos ovos. **Pubvet**, v. 14, n. 03, p. 1-11, abr., 2020. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n3a529.1-11>. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/631/631>. Acesso em: 03 ago. 2024.

CAMPBELL, H. How effective are GIS in practice? A case study of British local government. **International Journal of Geographical Information Systems**, v. 8, n. 3, p. 309-325, mai., 1994. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/02693799408902002>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02693799408902002>. Acesso em: 05 set. 2024.

CILLI, E. M.; PICCOLI, J. P.; ERNANDES, J. R.; NAKAIE, C. R.; JUBILUT, G. N. Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo. **Biociência Aplicada À Agro&Indústria**, v. 4, p. 175-196, jan., 2017. Editora Blucher. DOI: <http://dx.doi.org/10.5151/9788521211150-05>. Disponível em: <https://openaccess.blucher.com.br/article-details/reacoes-de-clivagem-acida-de-aminoacidos-e-peptideos-ligados-a-polimeros-20256/>. Acesso em 09 nov. 2024.

COSTA, M. F.; ALMEIDA, C. R. Avicultura e sustentabilidade: Desafios na produção de ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, n. 3, p. 220-240, 2019.

CUNHA, M. A.; SOUZA, B. H.; PEREIRA, C. M. Inovação e sustentabilidade na avicultura: o papel da tecnologia na produção de ovos. **Engenharia e Inovação na Agricultura**, v. 10, n. 1, p. 70-80, 2023.

DEHSAHRAEE, R. R.; MAHDAVI, A. H.; SEDGHI, M.; SALEH, H. Effect of different levels of single cell protein and probiotic microorganisms on performance, immunological responses, and intestinal histology in laying hens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)**, n. 108, p.1177–1188, abr., 2024. DOI: 10.1111/jpn.13963. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jpn.13963>. Acesso em: 30 nov. 2024.

EQUIPE TÉCNICA DA NUTRIÇÃO DE AVES DA VACCINAR. Técnicas para acompanhamento da qualidade da casca dos ovos. **Nutrição e Saúde Animal**, 2019. Disponível em: <https://nutricaoesaudeanimal.com.br/tecnicas-para-acompanhamento-da-qualidade-da-casca-dos-ovos/>. Acesso em: 11 ago. 2024.

ESPECHE, J. C.; VARAS, R.; MATURANA, P.; CUTRO, A. C.; MAFFÍA, P. C.; HOLLMANN, A. Membrane permeability and antimicrobial peptides: Much more than just making a hole. **Peptide Science**, v. 116, n. 1, p. 1-14, jan., 2024. DOI: 10.1002/pep2.24305. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pep2.24305>. Acesso em: 15 set. 2024.

FERREIRA, J. P.; LIMA, A. T.; MOURA, R. J. Desafios econômicos na avicultura de postura: a influência dos insumos no custo de produção. **Estudos Econômicos Agropecuários**, v. 33, n. 4, p. 110-120, 2021.

FINN, F. M.; HOFMANN, K. In: NEURATH, H.; HILL, R. L. **The Proteins**. 3. ed. v. 2, New York: Academic Press, 1976. p. 10.

FLORIANO, L. S. **Avicultura**: anatomia e fisiologia das aves domésticas. Urutaí: Ministério da Educação, 2013. Disponível em: https://proedu.rnp.br/bitstream/handle/123456789/1470/An_Fi_Av_Do_Livro_WEB.pdf?sequence=1. Acesso em: 02 ago. 2024

FREEMAN, B. M. The domestic fowl in biomedical research: physiological effects of the environment. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 44, n. 1, p. 41-60, fev., 1988. DOI: 10.1079/WPS19880004. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1079/WPS19880004>. Acesso em: 24 ago. 2024.

HARRIS, D. J. Clinical Tests. In: TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. **Avian Medicine**. 2. ed. Oxford: Saunders Elsevier, 2000. Cap. 3., p. 43- 51.

HE, S.; DEBER, C. M. Interaction of designed cationic antimicrobial peptides with the outer membrane of gram-negative bacteria. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1894, jan., 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-51716-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-51716-1>. Acesso em: 08 set. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário 2017**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 nov. 2024.

JOHNSON, A. S.; MERRITT, E. S. Heritability of albumen height and specific gravity of eggs from White Leghorns and Barred Rocks and the correlations of these traits with egg production. **Poultry Science**, v. 34, n. 3, p. 578-587, mai., 1955. DOI: 10.3382/ps.0340578. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Heritability-of-Albumen-Height-and-Specific-Gravity-Johnson-Merritt/1c108f2e8e3bc3213a4d6ec091bdea2342bb00f0>. Acesso em: 07 ago. 2024.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

KOCEVSKI, D.; NIKOLOVA, N.; KUZELOV, A. The influence of strain and age on some egg quality parameters of commercial laying hens. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 4, p. 1649-1658, 2011. DOI: 10.2298/BAH1104649K. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/274831121_The_influence_of_strain_and_age_on_some_egg_quality_parameters_of_commercial_laying_hens. Acesso em: 15 ou. 2024.

LUMELI, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Waltham: Academic Press, 2008. p. 839-872.

MA, X.; WANG, Q.; REN, K.; XU, T.; ZHANG, Z.; XU, M.; RAO, Z.; ZHANG, X. A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. **Fermentation**, v. 10, n. 11, p. 540, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10110540>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/10/11/540>. Acesso em: 04 dez. 2024.

NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviaria**. México: Universidad Nacional Autónoma, 2000.

OLIVEIRA CASTRO, J.; YANAGI JUNIOR, T.; BAHUTI, M.; FASSANI, É. J.; RIBEIRO DE LIMA, R. Thermal comfort thresholds for Japanese quails based on performance and egg quality. **International Journal of Biometeorology**, v. 67, n. 2, p. 265-274, fev., 2023. DOI: 10.1007/s00484-022-02403-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00484-022-02403-1>. Acesso em: 08 nov. 2024.

OLIVEIRA, D. L.; NASCIMENTO, J. W. B.; CAMERINI, N. L.; SILVA, R. C. FURTADO, D. A.; ARAUJO, T. G. P. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 11, p. 1186-1191, nov., 2014. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v18n11p1186-1191. Disponível em: scielo.br/j/rbeaa/a/JQZzYG3W5vC7H7svmN5L7FH/?format=pdf&lang=pt. Acesso em: 09 ago. 2024.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 01 nov. 2024.

PALERMO, E. F.; VEMPARALA, S.; KURODA, K. Polímeros antimicrobianos: design molecular como imitadores sintéticos de peptídeos de defesa do hospedeiro, 2013. In: SCHOLZ, C.; KRESSLER, J. **Arquiteturas para aplicações farmacêuticas e biomédicas**, vol. 135., American Chemical Society, p. 319-330.

PEREIRA, A. L.; SILVEIRA, F. S.; GOMES, T. Sistemas convencionais de produção de ovos: eficiência e desafios éticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 40, n. 1, p. 40-50, 2020.

PRIMO, L. M. D. G.; ROQUE-BORDA, C. A.; CANALES, C. S. C.; CARUSO, I. P.; LOURENÇO, I. O.; COLTURATO, V. M. M.; SÁBIO, R. M.; MELO, F. A.; VICENTE, E. F.; CHORILLI, M.; BARUD, H. S.; BARBUGLI, P. A.; FRANZYK, H.; HANSEN, P. R.; PAVAN, F. R. Antimicrobial peptides grafted onto the surface of N-acetylcysteine-chitosan nanoparticles can revitalize drugs against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p. 121-449, jan., 2024. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121449. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37940311/>. Acesso em: 07 set. 2024

RODRIGUES, L. M.; SANTOS, R. P.; CARVALHO, T. D. Tendências na produção de ovos: o crescimento dos sistemas alternativos e orgânicos. **Revista de Estudos de Produção Animal**, v. 56, n. 2, p. 80-95, 2022.

RODRIGUES, V. R.; DEBOLETO, S. G. C.; CENTENARO, J. R.; BRAZ, P. H. Perfil RDW de cães anêmicos comparado ao VCM e CHCM. **Medicina Veterinária (Ufrpe)**, v. 15, n. 1, p. 15-20, Medicina Veterinária (UFRPE), 2021. DOI: <http://10.26605/medvet-v15n1-2567>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/350748484_Perfil_RDW_de_caes_anemicos_comparado_ao_VCM_e_CHCM. Acesso em: 14 ago. 2024.

ROMERO, C.; YUSTUS, J. L.; SÁNCHEZ-ROMÁN, I.; LÓPEZ-TORRES, M.; CHAMORRO, S. Assessment of performance and egg quality in laying hens of Spanish indigenous breed Black Castellana as compared with a selected white egg-layer strain. **Poultry Science**, v. 103, n. 10, p. 104-196, jul., 2024. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104096. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579124006758>. Acesso em: 25 out. 2024.

ROQUE-BORDA, C. A.; PEREIRA, L. P.; GUASTALLI, E. A. L.; SOARES, N. M.; MACLEAN, P. A. B.; SALGADO, D. D.; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M.; VICENTE, E. F. HPMCP-coated microcapsules containing the Ctx(Ile²¹)-Ha antimicrobial peptide reduce the mortality rate caused by resistant *Salmonella* Enteritidis in laying hens. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 616, mai., 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10060616. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34064051/>. Acesso em: 19 set. 2024.

ROQUE-BORDA, C. A.; SARAIVA, M. M. S.; MONTE, D. F. M.; ALVES, L. B. R.; ALMEIDA, A. M.; FERREIRA, T. S.; LIMA, T. S.; BENEVIDES, V. P.; CABRERA, J. M.; CLAIRE, S.; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M.; PAVAN, F. R.; BERCHIERI JUNIOR, A.; VICENTE, E. F. HPMCAS-coated alginate microparticles loaded with Ctx(Ile²¹)-Ha as a promising antimicrobial agent against *Salmonella* Enteritidis in a chicken infection model. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 472-481, mar., 2022. DOI:

10.1021/acsinfecdis.1c00264. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.1c00264>. Acesso em: 10 nov. 2024.

SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 12. ed. Ames: Iowa State Press, 2008. p. 1231-1258. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ZVZ4whXoJa4C&oi=fnd&pg=PP2&dq=SAIF,+M.+Y.+\(Ed.\).+Diseases+of+poultry.+12.+ed.+Ames,+Iowa:+Blackwell+Publishing,+2008&ots=qLxXCBCrvm&sig=xEiLIqnQ02DjonmIC1HJDj37sn4#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ZVZ4whXoJa4C&oi=fnd&pg=PP2&dq=SAIF,+M.+Y.+(Ed.).+Diseases+of+poultry.+12.+ed.+Ames,+Iowa:+Blackwell+Publishing,+2008&ots=qLxXCBCrvm&sig=xEiLIqnQ02DjonmIC1HJDj37sn4#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 04 set. 2024.

SANJAYA, H. L.; MAHARANI, B. P.; BASKARA, A. P.; MUHLISIN; MARTIEN, R.; ZUPRIZAL. Effect of lipopolysaccharides from pathogenic bacteria on broiler chickens' productivity: a meta-analysis. **British Poultry Science**, p. 1-14, jun. 2024. DOI: 10.1080/00071668.2024.2364331. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38940295/>. Acesso em: 04 set. 2024.

SCHMIDT, E. M. S.; PAULILLO, A. C.; SANTIN, E.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; OLIVEIRA, E. G. Hematological and serum chemistry values for the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): variation with sex and age. **International Journal Poultry Science**, v. 6, n. 2, p. 137-139, 2007. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=4a44b1b68721b370d3e22e6e25d957e621040742>. Acesso em: 07 ago. 2024.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 55-70, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527369900200X>. Acesso em: 17 out. 2024.

SHARMA, M. K.; LIU, G.; WHITE, D. L.; KIM, W. K. Graded levels of *Eimeria* infection linearly reduced the growth performance, altered the intestinal health, and delayed the onset of egg production of Hy-Line W-36 laying hens when infected at the prelay stage. **Poultry Science**, v. 103, n. 1, p. 103-174, jan., 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103174>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579123006934>. Acesso em: 09 nov. 2024.

SILVA, J. P.; LIMA, M. T.; SANTOS, R. F. Avaliação da resistência e espessura da casca de ovos: um estudo experimental. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 2, p. 123-130, 2020.

SILVA, J. P. **A importância da avicultura para o desenvolvimento econômico regional**. São Paulo: Editora Universitária, 2021.

SILVEIRA, R. F.; ROQUE-BORDA, C. A.; VICENTE, E. F. Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 896-904, set., 2021. DOI: 10.1016/j.aninu.2021.01.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34632120/>. Acesso em: 29 nov. 2024.

SJOFFAN, O.; ADLI, D. N.; SHOLIKIN, M. M.; JAYANEGARA, A.; IRAWAN, A. The effects of probiotics on the performance, egg quality and blood parameters of laying hens: A meta-analysis. **Journal of Animal Feed Science**, v. 30, n. 1, p. 11-18, mar., 2021. DOI: 10.22358/jafs/133432/2021. Disponível em: <http://www.jafs.com.pl/The-effects-of-probiotics-on-the-performance-egg-quality-and-blood-parameters-of,133432,0,2.html>. Acesso em: 17 ago. 2024.

STURKIE, P. D.; GRIMINGER, P. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. In: STURKIE, P. D. **Avian physiology**. 3. ed. Berlin: Springer, 1976. p. 53-75. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-96274-5>. Acesso em: 12 set. 2024.

SWENSON, M; O'REECE, W. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TALAPKO, J.; MESTROVIC, T.; JUZBASIC, M.; TOMAS, M.; ERIC, S.; ALEKSIJEVIC, L. H.; BEKIC, S.; SCHWARZ, D.; MATIC, S.; NEUBERG, M.; SKRLEC, I. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1417, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101417>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9598582/pdf/antibiotics-11-01417.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2024.

VICENTE, E. F.; BASSO, L. G. M.; CESPEDES, G. F.; LORENZÓN, E. N.; CASTRO, M. S.; MENDES-GIANINNI, M. J. S.; COSTA-FILHO, A. J.; CILLI, E. M. Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile²¹)-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60818, abr., 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0060818. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060818>. Acesso em: 05 out. 2024.

XU, Q.; HUANG, B. Efeitos da temperatura diferencial do ar e do solo no metabolismo de carboidratos em creeping bentgrass. **Crop Science**, v. 40, n. 5, p. 1368-1374, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051368x>. Disponível em: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2135/cropsci2000.4051368x>. Acesso em: 08 nov. 2024.

YANG, S.; DONG, Y.; AWEYA, J. J.; XIE, T.; ZENG, B.; ZHANG, Y.; LIU, G. M. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação do peptídeo derivado da hemoglobina de *Tegillarca granosa* (TGH1) contra *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104302, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104302>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401020306689>. Acesso em: 27 ago. 2024.

ZHANG, Q. Y.; YAN, Z. B.; MENG, Y. M.; HONG, X. Y.; SHAO, G.; MA, J. J.; CHENG, X. R.; LIU, J.; KANG, J.; FU, C. Y. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, v. 8, n. 48, p. 1-25, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>. Disponível em: <https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-021-00343-2#citeas>. Acesso em: 04 dez. 2024.

ZHAO, X.; ZHANG, Y.; HE, W.; WEI, Y.; HAN, S.; XIA, L.; TAN, B.; YU, J.; KANG, H.; MA, M.; ZHU, Q.; YIN, H.; CUI, C. Effects of small peptide supplementation on growth performance, intestinal barrier of laying hens during the brooding and growing periods. **Frontiers in Immunology**, v. 13, jul., 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.925256. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35874672/>. Acesso em: 18 set. 2024.

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE OVOS E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE AVES POEDEIRAS SUBMETIDAS À SUPLEMENTAÇÃO COM O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Ctx(Ile²¹)-Ha

1 INTRODUÇÃO

A produção de ovos no Brasil tem crescido de forma expressiva, fazendo com que o país se torne um dos maiores produtores e exportadores globais, com destaque para os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Goiás (IBGE, 2022). Esse crescimento é impulsionado principalmente pela busca contínua por inovações tecnológicas que visam melhorar a eficiência da produção, garantindo o bem-estar das aves e a sustentabilidade do processo. Tecnologias voltadas ao monitoramento da saúde das aves, como sensores de temperatura, umidade, rastreabilidade e aplicativos especializados, desempenham um papel fundamental na melhoria do manejo sanitário, controle de vacinas e na promoção de uma produção mais sustentável (EMBRAPA, 2022).

Entretanto, um dos maiores desafios enfrentados pela avicultura moderna é o estresse por calor, que pode comprometer a saúde das aves e a produção de ovos. Estudos recentes indicam que o estresse térmico é uma preocupação crescente, pois pode afetar o bem-estar dos animais e a qualidade dos produtos (Hoffman; Berto, 2024). Nesse cenário, alternativas mais sustentáveis têm sido exploradas, como o uso de peptídeos antimicrobianos e outros aditivos alimentares, que não só ajudam a combater infecções, mas também desempenham um papel importante no fortalecimento do sistema imunológico das aves, contribuindo para minimizar os efeitos negativos do estresse térmico (Roque-Borda *et al.*, 2022; He; Deber, 2024).

O peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha tem demonstrado eficácia no combate a bactérias e fungos (Benfield e Henriques 2020; e Roque-Borda *et al.* 2021). Além disso, ele pode desempenhar um papel importante em situações de estresse térmico, modulando o sistema imune das aves. Quando as galinhas poedeiras sofrem estresse causado pelo calor, seu sistema imunológico, torna-se mais suscetível a patógenos (Costa; Almeida, 2019; Kim *et al.*, 2024). Nesse contexto, o peptídeo ajuda a proteger as aves, atuando na modulação da resposta imunológica e auxiliando no controle de infecções. Embora os resultados atuais mostram que ele é eficaz no combate a infecções, este estudo é necessário para entender melhor se o peptídeo pode fortalecer o sistema imunológico dessas aves e como ele atua (Dehsahraee *et al.*, 2024).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha na capacidade de resposta do organismo de galinhas poedeiras ao desafio de

estresse por calor, expresso no ganho de peso das aves, na produção e qualidade dos ovos e em parâmetros hematológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile²¹)-Ha

O peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha (de sequência primária GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFI) foi sintetizado no Laboratório de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências e Engenharia da Unesp (FCE)/Câmpus de Tupã, a partir da técnica de Síntese Peptídica em Fase Sólida, concebido por Merrifield (Merrifield, 1963). O polímero utilizado com suporte foi a resina *Rink Amide*. A aquisição do peptídeo foi realizada através da estratégia *Fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group* (Fmoc). Para a realização do acoplamento, os grupos carboxila dos aminoácidos foram ativados de acordo com cada método, apresentado abaixo:

- **Método 1:** diisopropilcarbodiimida (DIC)/ N-hidroxibenzotriazol (HOBT);
- **Método 2:** hexafluorofosfato de diisopropiletiamina (DIEA) e hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) em caso de reacoplamentos;
- **Método 3:** N-metilmorfolina (NMM) com hexafluorofosfato de 2-(1-H-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU), em caso de um novo acoplamento após a tentativa de uso do método 2.

O excesso de reagentes utilizado foi de três vezes. O tempo de reação para cada método de acoplamento foi de duas horas, duas horas e somente 30 minutos, respectivamente. A remoção do grupo base-lábil Fmoc foi realizada por meio de lavagem com com piperazina 10% m/v em 9:1 de DMF/etanol por 20 minutos. Para a eliminação do excesso de reagentes e subprodutos, foram realizados ciclos de lavagens com DMF e diclorometano (DCM).

A clivagem entre o peptídeo e a resina foi feita utilizando ácido trifluoracético (TFA) e uma solução de *scavengers* específicos. O filtrado obtido foi liofilizado durante 48 h em um liofilizador (Liotop, modelo K108, Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) para que fosse possível obter um material branco e floculoso, que é o peptídeo bruto. Para a purificação do peptídeo, foi utilizado o método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para separação das impurezas e análise da pureza das frações. O grau de pureza das frações foi determinado em modo analítico, com uma coluna C₁₈ analítica de fase reversa (Shimadzu, modelo Proeminence, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O teor de pureza das frações obtidas foi determinado também pelo método da CLAE analítico, utilizando os solventes A

(0,045% de TFA em água ultrapura) e B (0,036% de TFA em acetonitrila), com um programa de gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos. O peptídeo só foi utilizado nas próximas etapas quando o seu teor de pureza foi maior que 95%.

A confirmação do peptídeo foi feita por meio da caracterização por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo LCMS-8045, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), triplo quadrupolo com plataforma *ElectroSpray Injection Mass Spectrometry* (ESI) e injeção direta, equipada com um *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) marca Shimadzu, modelo Nexera (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) em modo de *scan*. Esta ferramenta permitiu a determinação da razão da massa molecular/carga (MM/z) do peptídeo e, consequentemente, garantir a sua correta obtenção e caracterização.

2.2 MICROENCAPSULAÇÃO E REVESTIMENTO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile²¹)-Ha

As microencapsulações foram realizadas no Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Faculdade de Ciências e Engenharia/Unesp Tupã por meio do método de gelificação ionotrópica descrito por Patil, Chavanke e Wagh (2012). Foram realizadas no total dois processos de microencapsulação, a primeira utilizando uma massa de 100 mg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha e a segunda utilizando 200 mg de peptídeo. Para cada etapa, utilizou-se 10 g de alginato de sódio. O método consistiu em uma mistura do peptídeo com 500 mL de água ultrapura e 10 g de alginato de sódio. Logo após, com o auxílio de um Ultraturrax (Novatecnica, modelo NT 138, Novatecnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a solução foi homogeneizada até que um caldo denso de cor marrom claro fosse formado.

Uma placa de Petri pequena foi preenchida com 50 mL de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) à 5%. Após isso, colocou-se a placa de Petri pequena dentro de uma de maior tamanho e o conjunto de placas foi colocado sob um agitador magnético para que as microcápsulas não ficassem aglomeradas e perdessem seu formato. Após isso, ainda sob agitação constante, utilizou-se uma bomba peristáltica (Tecnozon, modelo LDP-101-3, MS Tecnozon Equipamento Especiais Ltda., Piracicaba, São Paulo, Brasil) programada para gotejar em um fluxo de 1 mL/min dentro da solução de cloreto de alumínio. Para o gotejamento, utilizou-se uma ponteira de 200 µL para formação do formato esférico das microcápsulas.

Quando a placa de Petri ficou saturada de microcápsulas, esperou-se 10 minutos para sua completa formação e as mesmas foram submetidas a três lavagens com 40 mL de água ultrapura. As lavagens foram feitas colocando as microcápsulas sobre um funil de Buchner

acoplado a um *erlenmeyer*. As microcápsulas foram alocadas em uma bandeja de alumínio com papel toalha ao fundo e submetidas à secagem em estufa de fluxo contínuo durante 24 horas entre 35 – 40°C.

O revestimento das partículas microencapsuladas foi feito através da sua imersão em 10% de ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP); 25% de NH₄OH; 2,5% de trietilcitrato e 62,5% de água ultrapura, totalizando um volume de 250 mL de solução de revestimento. As microcápsulas secas foram imersas dentro dessa solução; após isso, elas foram alocadas em uma estufa de fluxo contínuo entre 35 – 40°C durante 24 horas, até a sua completa secagem. O revestimento foi necessário para o direcionamento das microcápsulas para o intestino das galinhas.

A eficiência da microencapsulação foi realizada através do uso de um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), a fim de verificar a absorbância das microcápsulas do peptídeo em uma solução 1:1 (m/v) de água e acetonitrila durante 4 horas no comprimento de onda de 280 nanômetros (nm). Para isso, a lei de Lambert Beer, representada na Equação 1 (Eq. (1)) foi utilizada para a base dos cálculos:

$$A = \varepsilon lc \quad \text{Eq. (1)}$$

onde A é a absorbância; ε representa o coeficiente de absorção molar, c é a concentração molar e l corresponde ao comprimento do caminho óptico (em cm) da cubeta utilizada.

2.3 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DO PEPTÍDEO EM SOLUÇÕES SIMULADAS DO INTESTINO E ESTÔMAGO DAS AVES

O estudo da liberação das microcápsulas *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia de Morgan *et al.* (2020). O fluído gástrico simulado (SGF) imita a solução presente nas porções do proventrículo e moela das aves, que são considerados os estômagos químico e mecânico das aves, respectivamente. O SGF foi preparado com em um volume de 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L em pH 3,5. O pH foi ajustado com HCl a 1 mol/L.

Para este ensaio, foram pesadas 50 mg de microcápsulas e colocadas em contato com a solução de SGF a uma temperatura de 42°C durante 20 minutos. Logo após, coletou-se o SGF de cada após 1, 2, 5, 10, 15 e 20 minutos e medido em um espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo UV1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

O fluido intestinal simulado (SIF) tem por objetivo simular o duodeno e o jejuno,

os quais correspondem às porções iniciais do intestino delgado das aves. Para isso, 50 mg de microcápsulas foram pesadas em uma balança analítica e colocadas em contato com uma solução de 10 ml de HCl a 0,1 mol/L em pH 6, ajustado com NaOH a 1 mol/L.

Em seguida, as amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro UV para um comprimento de onda de 280 nm, que corresponde ao comprimento de onda do aminoácido triptofano presente naturalmente na sequência do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha.

2.4 DESIGN EXPERIMENTAL

A pesquisa foi submetida à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Tupã, sob o número de protocolo 01/2024. O experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Conforto Ambiental.

O experimento foi realizado em esquema fatorial (2×3) compreendendo dois tratamentos térmicos (conforto térmico e estresse por calor) e três dosagens diferentes de peptídeo por tratamento (controle, dosagem menor “D1” e dosagem maior “D2”). Para cada dosagem, haviam três animais, perfazendo um total de 18 galinhas poedeiras da linhagem *Lohmann White* com 40 semanas de idade no início do experimento, advindas de uma granja comercial, sendo, portanto, considerado um estudo de prova de conceito. O experimento foi conduzido com esse número de animais reduzido devido ao custo e a complexidade de produzir o peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha em escala laboratorial, e por não haver nenhum outro experimento anterior que avaliou os efeitos desta molécula na saúde de galinhas poedeiras. Dessa forma, a proposta visa hipotetizar se o peptídeo antimicrobiano promove efeito protetivo no organismo de galinhas submetidas a estresse por calor, melhorando as variáveis de desempenho zootécnico e parâmetros do sangue.

As galinhas foram monitoradas durante 35 dias, sendo que os sete primeiros dias foram reservados para a adaptação. As galinhas foram divididas em dois grupos de nove aves, sendo que cada galinha foi alojada individualmente em uma gaiola de arame de 1,6 m × 1,4 m × 3,0 m de largura, profundidade e altura. Cada grupo foi alojado em uma câmara climática. Durante o período de adaptação, os dois grupos mantiveram a temperatura constante de 26°C, das 4:00 às 21:30 horas e 24°C das 21:30 às 4:00 horas. Após esse período, um dos grupos permaneceu nessa condição ambiental, denominada conforto. Na outra câmara climática a temperatura foi programada para 35°C das 4:00 às 21:30 horas e 24°C das 21:30 às 4:00 horas, denominada estresse por calor. Nos dois tratamentos ambientais, o fotoperíodo foi de 17,5 horas

de luz artificial branca, com acionamento às 4:00 horas e desligamento às 21:30 horas. Em ambos os tratamentos a umidade relativa foi controlada em torno de 60%.

Dentro de cada câmara climática, as galinhas foram divididas em três grupos de dosagem de peptídeo (D0 ou controle, D1 e D2), cada grupo com três, como representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Tipos de tratamento proporcionado às aves de acordo com dosagem do peptídeo e presença de desafio térmico.

Dosagens	Descrição	Desafio Térmico	Ctx(Ile ²¹)-Ha
D0	Controle	Não	Não
D1	2,5 mg/kg de ração	Não	Sim
D2	5,0 mg/kg de ração	Não	Sim
D0	Controle	Sim	Não
D1	2,5 mg/kg de ração	Sim	Sim
D2	5,0 mg/kg de ração	Sim	Sim

Fonte: Própria autora (2024).

As dosagens do peptídeo foram distribuídas de acordo com a quantidade de ração em quilogramas (kg). No primeiro tratamento conhecido como controle, as aves não receberam nenhuma dosagem do peptídeo. Na dosagem 1 (D1) as aves receberam (2,5 mg de peptídeo/kg de ração e na dosagem 2 (D2) os animais receberam (5,0 mg de peptídeo/ kg de ração). Visto isso, durante os 28 dias de experimento, cada galinha recebeu 0 mg do peptídeo (D0/grupo controle), 7,7 mg (D1) e 15,4 mg (D2).

A Figura 2 representa a distribuição dos animais na câmara submetida ao conforto térmico e estresse por calor de acordo com cada tratamento, respectivamente. Os quadrados branco, laranja e amarelo representam as gaiolas com tratamentos controle, D1 e D2, respectivamente. A galinha de companhia representa uma unidade experimental sobressalente, que não recebeu nenhuma dosagem do peptídeo, caso algum animal viesse a óbito durante o período experimental.

Durante os sete dias que decorreram o período de adaptação, os animais receberam 1,93 mg de peptídeo no (D1) e 3,85 mg (D2). Entretanto, o tratamento térmico não foi aplicado durante este período, visando permitir que o peptídeo tivesse tempo para atuar no organismo das aves a fim de preparar as mesmas para a etapa seguinte. Com isso, buscou-se que eventuais mudanças nos parâmetros sanguíneos e/ou na qualidade dos ovos fossem registradas.

Figura 2 - Distribuição das aves na câmara climática submetidas a A) conforto térmico (26°C) e B) estresse por calor (35°C). O tamanho das gaiolas representadas pelos retângulos na imagem não condiz com as dimensões reais utilizadas no experimento. O desenho foi feito a fim de conceder ao leitor um entendimento visual da separação das aves nas gaiolas. A gaiolas representadas pela cor branca correspondem as aves que não receberam peptídeo (D0 ou controle); as gaiolas amarelas receberam a dosagem de 2,5 mg/kg de ração (D1) e as gaiolas laranjas receberam a dosagem de 5,0 mg/kg de ração (D2). A galinha de companhia representa um animal que não é uma unidade experimental à fim de que todas as aves tivessem uma companheira ao seu lado para evitar influências comportamentais durante o experimento.

A) Conforto térmico

GAIOLA VAZIA					GALINHA DE COMPANHIA 
GAIOLA VAZIA					

B) Estresse por calor (35°C)

GAIOLA VAZIA	GALINHA DE COMPANHIA 				
GAIOLA VAZIA					

Fonte: Autora (2024).

2.5 ARRAÇOAMENTO E MONITORAMENTO DO PESO DAS GALINHAS

A ração foi fornecida diariamente, duas vezes ao dia. O cocho foi subdividido na largura das gaiolas, permitindo monitorar o consumo de cada galinha durante o experimento. Cada ave recebeu 110 g de ração por dia, dividida em duas porções de 55 g às 8:30h e 16:00h. A água foi oferecida *ad libitum* em bebedouros tipo *nipple*. Os níveis nutricionais da ração fornecida às galinhas são apresentados na Tabela 3. Os ingredientes da ração que foram fornecidas às aves estão presentes na Tabela 4.

Os animais foram pesados no primeiro dia de alojamento nas câmaras climáticas em balanças de plataforma (B-160, Líder Co. Ltda, Araçatuba, São Paulo, Brasil). Após o período de adaptação, as galinhas foram pesadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28. A sobra de ração de cada gaiola foi monitorada diariamente. Antes do fornecimento da ração no período da manhã, a sobra era retirada do cocho e pesada. Dessa forma, monitorou-se o consumo de ração diário das galinhas.

Tabela 3 - Níveis nutricionais da ração fornecida às aves.

Níveis nutricionais	Quantidade (kg/ton de ração)
EM aves cal/kg	2785,07
Proteína bruta	16,96
Lisina total	0,91
Metionina total	0,38
Triptofano total	0,21
Treonina	0,66
Cálcio	4,02
Fósforo útil	0,44
Fósforo total	0,67
Extrato etéreo	2,90
Sódio	0,18
Razão cálcio/potássio	9,10

Fonte: Própria autora (2024).

Tabela 4 - Ingrediente da ração fornecida às aves.

Ingredientes	Quantidade (kg/ton de ração)
Milho 7,50%	1227,70
Farelo de soja 46%	480,50
Farelo de trigo	50,00
Pirius Emul Dry	6,00
Calcário moído 38%	120,00
Calcário em pedrisco	90,00
Sal 38%	8,80
Calibrim Alfa	2,50
DL metionina 99%	1,00
Lisina 98%	1,00
PX1017 Postura Pig	5,00
Reforço orgânico	2,00
Enzimas	2,00
Free Phos	4,00

Fonte: Própria autora (2024).

2.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO E QUALIDADE DOS OVOS

Os ovos foram contabilizados diariamente, bem como a qualidade de cada um, durante todo o período experimental. A gravidade específica foi determinada seguindo a metodologia de Henriques, Rodrigues e Uczay (2018), na qual os ovos são submersos em baldes contendo quantidades crescentes de concentração de sal, variando de 1,060 a 1,100 g/mL de NaCl com intervalos de 0,005 g. O peso do ovo, resistência e espessura da casca, altura do albúmen e unidade Haugh foram medidos no equipamento *Digital Egg Tester* (DET-6000, Nabel Co. Ltd., Kyoto, Japan®).

2.7 ANÁLISE DA CONVERSÃO ALIMENTAR

A partir do consumo diário de ração, calculou-se a Conversão Alimentar (CA) semanal para cada dosagem de acordo com o tratamento (conforto ou estresse por calor) usando a Eq. (2). A ração consumida foi calculada diariamente e individualmente, através da subtração entre a quantidade fornecida por dia (110 g) e o peso da sobra de cada ave.

$$CA = \frac{\text{ração consumida (kg)}}{\text{dúzias de ovos}} \quad \text{Eq. (2)}$$

2.8 ANÁLISE DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E FISIOLÓGICOS

Coletou-se 3 mL de sangue de cada ave. Armazenou-se 0,5 mL em microtubo EDTA K3 como substância anticoagulante e 2,5 mL em tubo de soro com ativador de coágulo. As coletas ocorreram no primeiro dia de alojamento e, após o período de adaptação, nos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

As amostras foram submetidas a exame de hemograma para mensuração da concentração de hemácias (He), hemoglobinas (Hb), hematócritos (Ht), leucócitos totais (Leuc), heterófilos (Het), eosinófilos (Eos), basófilos (Bas) linfócitos (Linf) e monócitos (Mon). Adicionalmente, contabilizou-se a quantidade de Proteínas Plasmáticas Totais (PPT), sódio (Na), potássio (K), cloretos (Cl), nCa (cálcio normalizado), cálcio iônico (iCa), cálcio total (tCa) e pH (potencial hidrogeniônico).

Para todos os dias de coleta de sangue, aferiu-se a temperatura retal (TR), utilizando um termômetro clínico digital da marca G-Tech (modelo TH1027, Joytech Healthcare Company, República Popular, China. A glicose (Gli) foi mensurada com o auxílio do aparelho Accu-Check® Roche (modelo Guide, Roche Diabetes Care Brasil, São Paulo, Brasil) utilizando-se de 0,6 µL de sangue total fresco por método eletroquímico e a amostra captada diretamente em tiras reativas do fabricante.

O hemograma foi realizado seguindo as recomendações descritas por Almosny e Monteiro (2006). A determinação do Ht foi realizada pela técnica de microhematócrito, com centrifugação a 12.500 rpm por cinco minutos, utilizando tubos capilares, em uma centrífuga Fanem de microhematócritos modelo 100. Após a centrifugação, o volume de células vermelhas foi determinado com auxílio da tabela para leitura de microhematócritos citada em (Henry, 2008).

A determinação de Hb foi realizada por espectrofotometria óptica em 540 nm, utilizando-se de kit colorimétrico por método cianeto de hemoglobina (Drabkin) e reação de ponto final (Labtest® Ref. 43 e Padrão de Hemoglobina Ref. 47). O controle intra ensaio foi realizado com o Padrão de Hemoglobina Labtest®. Após a hemólise, as amostras foram centrifugadas em tubos cônicos para remoção dos núcleos celulares, antes da leitura.

A determinação de PPT foi realizada por refratometria manual, utilizando-se refratômetro de proteínas e urina veterinário (Ion RHC-200®) com intervalo de medição entre

0 a 12 g/dL e precisão de 0,2 g/dL. Para a contagem celular, um volume de 10 µL da amostra de sangue em EDTA previamente homogeneizada foi diluída em 2 mL da solução descrita por Natt e Herrick (1952).

A contagem das hemácias e leucócitos foi realizada na câmara de Neubauer, de acordo com a metodologia de Natt-Herrick (1952) e modificada por Almosny *et al.* (1988). As células foram diluídas em 10 µL de sangue para 2.000 µL de solução Natt-Herrick. Os resultados da contagem foram expressos em número de células pelo fator de correção descrito em Garcia-Navarro e Pachaly (1994).

Os leucócitos foram contados nos quatro quadrantes completos das extremidades da câmara. Os resultados foram expressos em mm³. A contagem diferencial foi realizada através da leitura e diferenciação de cem leucócitos sanguíneos a partir da leitura microscópica de esfregaços sanguíneos corados por corante tipo Romanowski.

Os analitos Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ e o pH foram dosados pelo método de eletrodo seletivo, utilizando-se de equipamento (IonPro®), com faixa de linearidade para Na⁺: 2,0 mmol/L, K⁺: 0,08 mmol/L, Ca²⁺: 0,04 mmol/L, Cl⁻: 2,0 mmol/L e pH <5,0%.

2.9 AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunomarcção foi avaliada de forma qualitativa com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada (dispositivo de imagem digital Olympus BX 50 acoplado a uma câmera e computador). Os resultados da imunomarcção em baço, fígado, intestino delgado e grosso foram avaliados com base na observação do corte dos tecidos em um todo, identificando a distribuição das células positivas. Foram descartadas as células imunomarcadas dentro de vasos sanguíneos.

2.10 VERIFICAÇÃO DA INGESTÃO DE MICROCÁPSULAS

As sobras de ração das galinhas que receberam microcápsulas foram submetidas a uma separação física por meio de uma análise granulométrica completa, para verificar a presença de possíveis microcápsulas que não tinham sido ingeridas pelas aves.

Com o auxílio de um conjunto de peneiras vibratórias marca (Bertel, modelo único, Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras, São Paulo, Brasil), os resíduos de ração que foram separados durante todo o período experimental foram despejados na primeira peneira e submetidos a vibração durante três minutos. Ao final do tempo de vibração, as microcápsulas que ficaram retidas nas peneiras foram separadas e pesadas em uma balança analítica marca Shimadzu (modelo ATX224, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Desse modo, foi possível

verificar se houve ingestão do peptídeo e quanto foi ingerido por cada animal.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando métodos de estatística descritiva e o software *Minitab*, ficonforme detalhado no Quadro 1. O delineamento experimental foi estruturado para assegurar uma coleta e análise de dados sistemática e apropriada, empregando ferramentas específicas de acordo com as características de cada parâmetro avaliado. Este procedimento garantiu uma interpretação confiável e precisa dos resultados obtidos.

Quadro 1 - Coleta e análise de dados.

Coleta de dados	Análise de dados
Estudo da eficiência da síntese peptídica	<i>LabSolutions</i>
Estudo da liberação da microencapsulação	Espectrofotômetro UV-vis (<i>software</i>)
Parâmetros da qualidade do ovo	<i>Minitab</i>
Parâmetros sanguíneos	<i>Minitab</i>
Imunohistoquímica e histopatologia	<i>ImageJ</i>

Fonte: Autora (2024).

Os dados foram tratados por meio de estatísticas descritivas, que permitiram identificar tendências centrais, variações e padrões significativos. As informações foram apresentadas em tabelas e gráficos, facilitando a visualização e a interpretação dos resultados.

A ferramenta *LabSolutions* foi utilizada para monitorar a eficiência da síntese peptídica, enquanto o espectrofotômetro UV-vis auxiliou na avaliação do perfil de liberação dos compostos encapsulados. Já os parâmetros relacionados à qualidade dos ovos e aos indicadores sanguíneos foram analisados com o suporte do software *Minitab*, que possibilitou identificar diferenças significativas entre os grupos estudados. Por fim, a análise das imagens obtidas em exames de imunohistoquímica e histopatologia foi realizada por meio do software *ImageJ*, permitindo uma interpretação quantitativa e qualitativa detalhada. Os resultados obtidos demonstraram:

- **Eficiência da síntese peptídica:** As análises confirmaram o sucesso do processo, evidenciado pelas medições realizadas com o *LabSolutions*;
- **Liberação de compostos na microencapsulação:** Os dados obtidos com o espectrofotômetro UV-vis revelaram perfis consistentes e alinhados com as expectativas experimentais;
- **Parâmetros de qualidade do ovo e sanguíneos:** As análises pelo *Minitab* evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, reforçando a influência das condições investigadas;

- **Imunohistoquímica e histopatologia:** As imagens analisadas no *ImageJ* apresentaram padrões bem definidos, corroborando os achados experimentais e fornecendo suporte adicional para as conclusões.

A combinação das ferramentas e métodos empregados permitiu uma avaliação abrangente e rigorosa dos dados, garantindo a robustez das conclusões e contribuindo para a confiabilidade dos resultados alcançados.

3 RESULTADOS

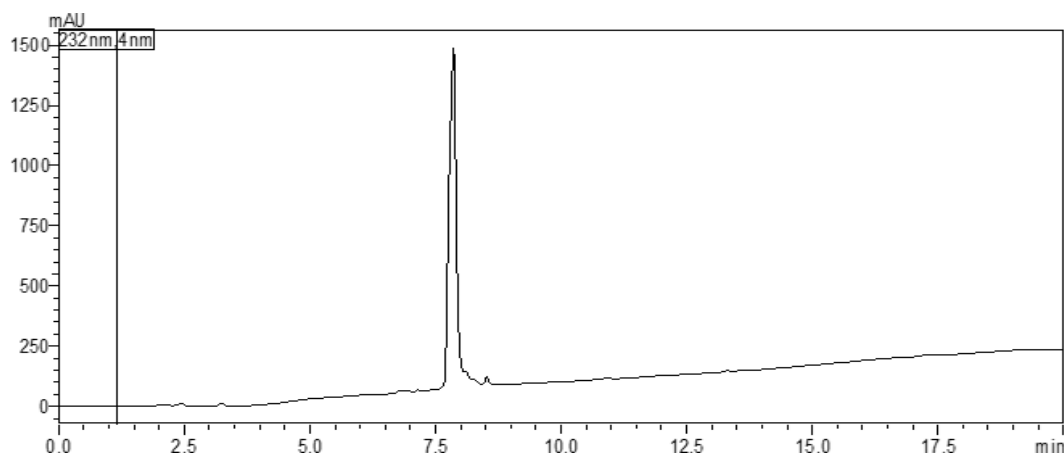
3.1 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile²¹)-Ha

A síntese do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha foi realizada com sucesso, as reações de acoplamento foram realizadas com mínima necessidade de reacoplamentos, evidenciadas pelo teste de ninidrina negativo, ou seja, sem a presença de grupamentos amino-livre. A dificuldade encontrada durante o processo ocorreu durante as lavagens, por conta da quantidade de massa de resina utilizada. Ao longo do crescimento da cadeia peptídica, ocorreram agregações dos aminoácidos à resina, o que dificultou o processo de lavagens, porém, não interferiu na eficácia dos acoplamentos.

Ao final do processo de síntese peptídica em fase sólida, obteve-se uma massa inicial de 1.368 mg e, uma massa final de peptidilresina de 3.500 mg, havendo um ganho de massa de 2.132 mg. Após a etapa de acoplamentos, a clivagem do peptídeo ocorreu sem intercorrência, e obteve-se uma massa de peptídeo bruto de 2.700 mg, totalizando 77,14% de eficiência de síntese. Isso se deve ao fato de que sempre durante o processo, parte da massa da molécula é perdida durante as extrações com solventes, por conta da volatilidade dos produtos, erros relacionados a precisão da extração do sobrenadante e temperatura do éter, que apesar de estar sempre extremamente gelado, o descongelamento ocorre muito rapidamente, dificultando o processo.

Após a purificação do peptídeo, o perfil cromatográfico foi gerado com o auxílio do *software Lab Solutions* acoplado ao HPLC. Na Figura 3 é possível observar que o peptídeo obteve teor de pureza maior que 95%, e, por isso, foi utilizado para o experimento.

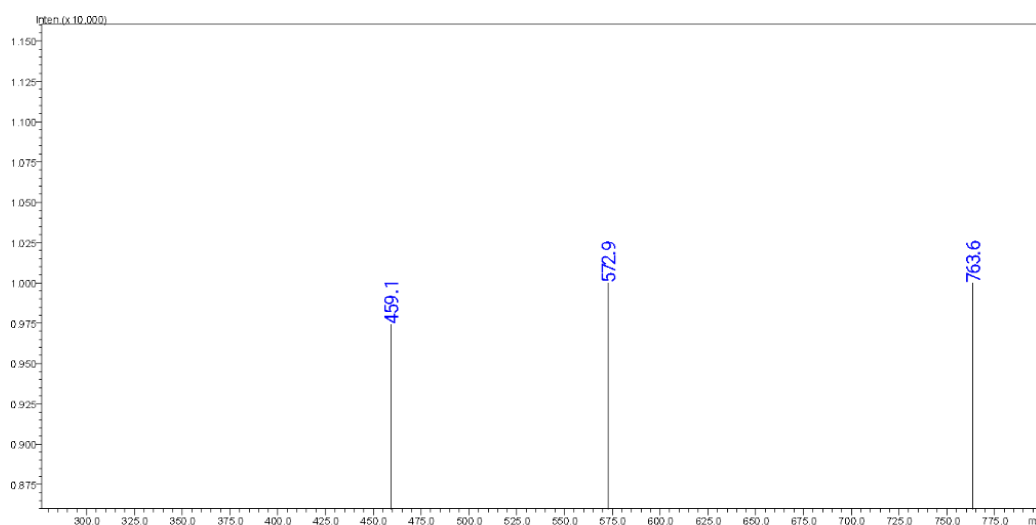
Figura 3 - Perfil cromatográfico do peptídeo antimicrobiano puro Ctx(Ile²¹)-Ha.



Fonte: Própria autora (2024).

Após o processo de purificação, foi realizada a caracterização da molécula via espectroscopia de massas, onde evidenciou-se a obtenção adequada do peptídeo, demonstrada na Figura 4. Verifica-se que o eixo x representa a relação massa/carga (m/z) obtida e o eixo y a intensidade, qual tem peso molecular teórico de 2.289,72 g/mol, onde é possível confirmar a sua identificação e caracterização. Por meio do espectro de massas, que evidencia a relação dos picos por meio da razão massa/carga (m/Z), é possível observar os picos de m/Z de 763,6 ($Z = +2$), 572,9 ($Z = +3$) e 459,1 ($Z = +4$). Com estes resultados, pode-se afirmar que a síntese peptídica em fase sólida foi eficiente para a obtenção do peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha bruto.

Figura 4 - Espectro de massa do peptídeo antimicrobiano Ctx (Ile²¹)-Ha purificado.



Fonte: Própria autora (2024).

3.2 MICROENCAPSULAÇÃO E REVESTIMENTO DO PEPTÍDEO Ctx(Ile²¹)-Ha

Após o uso do espectrofotômetro, verificou-se a absorção da luz para o comprimento de onda de 280 nm. O comprimento de onda das microcápsulas que continham somente o revestimento de HPMCP também foram medidos. Através da diferença entre estes dois valores, foi possível calcular a concentração molar do peptídeo Ctx(Ile²¹)-Ha. Após este cálculo, calculou-se a quantidade de peptídeo por mg de microcápsulas, e, portanto, foi possível determinar a quantidade de micropartículas necessárias para alcançar as dosagens 1 e 2 determinadas para o experimento.

Segundo os cálculos, pode-se evidenciar que, para as micropartículas revestidas com HPMCP utilizando inicialmente 100 mg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, obteve-se um total de incorporação nas micropartículas de 79,84 mg desta molécula, resultando num rendimento de 79,84% de encapsulamento do peptídeo pelo método de gelificação ionotrópica. Da mesma maneira, para as micropartículas revestidas com HPMCP utilizando inicialmente 200 mg de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha, obteve-se um total de incorporação de 116,94 mg desta molécula, resultando num rendimento de encapsulação de 58,47%.

Os cálculos realizados encontram-se no Roque-Borda *et al.* (2021). A baixa eficiência de incorporação ocorreu por conta da perda de material durante a diluição do peptídeo junto ao alginato durante a etapa de preparo da solução de microencapsulação; além disso, a viscosidade desta solução permitiu que o material ficasse agregado à parede do béquer de vidro, ocorrendo uma perda da solução.

Apesar das dificuldades encontradas durante o processo, a quantidade necessária para a realização do experimento foi adquirida com êxito, demonstrando que a técnica utilizada foi eficiente para a obtenção da formulação peptídica.

3.3 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS EM SOLUÇÃO ESTOMACAL E INTESTINAL

A liberação do conteúdo das microcápsulas ocorreu de acordo com os dados das Tabelas 5 e 6. A confirmação da liberação em solução intestinal ao longo do tempo evidencia que o peptídeo foi liberado no intestino das aves para sua completa ação.

Ainda que em menor quantidade, houve liberação de parte do conteúdo das microcápsulas na porção intestinal simulada. A maior liberação ocorreu para a dosagem 2 no tempo de 5 minutos, apresentando 9,74% de soltura do conteúdo peptídico.

A maior liberação ocorreu na porção intestinal simulada das aves no tempo de 5 minutos para a dosagem 2. Como já era previsto, o revestimento HPMCP possui propriedades

para degradação em pH básico, o que evidencia os valores mais altos de em comparação ao estudo *in vitro* estomacal. Pode-se perceber que o próprio revestimento também possui uma porcentagem de leitura no espectrômetro para o comprimento de 280 nm.

Tabela 5 - Perfil de liberação do peptídeo em solução estomacal simulada (SES) das microcápsulas de Ctx(Ile²¹)-Ha revestidas com HPMCP de acordo com as massas (%).

	1'	2'	5'	10'	15'	20'
100 mg	3,02	4,48	3,53	5,46	0,00	0,00
200 mg	0,82	6,62	9,74	2,46	7,19	4,76
HPMCP	0,00	8,10	8,60	1,20	2,30	2,80

Fonte: Própria autora (2024).

Tabela 6 - Perfil de liberação do peptídeo em solução intestinal simulada (SIS) das microcápsulas de Ctx(Ile²¹)-Ha revestidas com HPMCP de acordo com as massas (%).

	1'	2'	5'	10'	15'	20'	30'	45'	60'
100 mg	20,67	14,11	93,28	12,10	13,86	12,10	12,86	10,59	23,95
200 mg	7,57	17,03	97,48	95,58	10,88	10,13	11,17	96,53	12,50
HPMCP	2,60	5,20	7,00	7,90	8,80	10,20	10,40	12,40	7,60

Fonte: Própria autora (2024).

3.4 ANÁLISE DO CONSUMO DE RAÇÃO, CONVERSÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO DAS GALINHAS

A Tabela 7 mostra o total de ração consumida, o total de produção de ovos e a conversão alimentar dos grupos que receberam diferentes dosagens de peptídeo, para cada tratamento ambiental.

Tabela 7 - Total de ração consumida, total de ovos produzidos e conversão alimentar das galinhas, para cada tratamento de dosagem (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5mg/kg e dose 2: 5,0mg/kg).

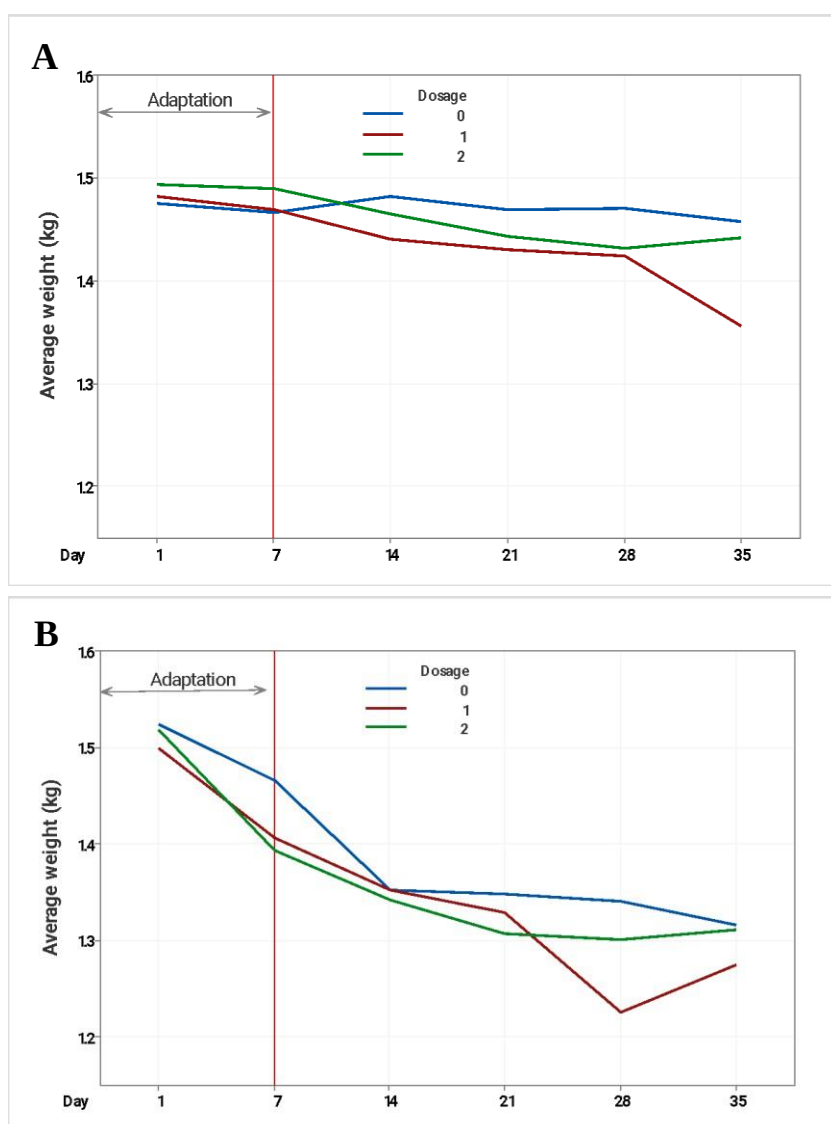
Tratamento	Dosagem	Consumo total de ração (kg)	Produção de ovos (dz.)	Conversão alimentar (kg/dz.)
Conforto	0	13,93	8,42	1,65
	1	10,16	8,42	1,21
	2	10,20	8,08	1,26
Estresse por calor	0	11,56	7,92	1,46
	1	9,34	7,42	1,26
	2	8,34	7,00	1,19

Fonte: Própria autora (2024).

Em ambas as condições ambientais, o consumo de ração para os grupos com dosagem de peptídeo foi menor que no respectivo grupo de controle (D0). Na Tabela 2, observa-se que a conversão alimentar melhorou com as dosagens de 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg de peptídeo. Contudo, isso ocorreu devido ao menor consumo de ração, que foi 27,1% e 26,8% menor, respectivamente. Na Tabela 7, o consumo de ração para as dosagens 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg foram menores, com valores de 19,2% e 27,8%, respectivamente, o que também resultou em uma melhor conversão alimentar.

A Figura 5 mostra o ganho de peso das galinhas nos grupos de dosagem dentro de cada tratamento ambiental. Observa-se que, na condição de conforto, houve uma manutenção do peso corporal para o grupo sem dosagem de peptídeo, enquanto nas dosagens de 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg houve diminuição do peso. Isso corrobora com os resultados de consumo das aves (Tabela 7), que foi significativamente menor nos grupos submetidos às duas doses de peptídeo. Em paralelo, houve diminuição do peso das aves em todos os grupos de doses de peptídeo, confirmando que os efeitos do estresse por calor afetaram o consumo de ração (Tabela 8) e, consequentemente, influenciando o ganho de peso no período.

Figura 5 - Peso médio das galinhas no período do experimento, para cada dosagem testada, no tratamento **A)** Conforto e **B)** Estresse por calor.



Fonte: Própria autora (2024).

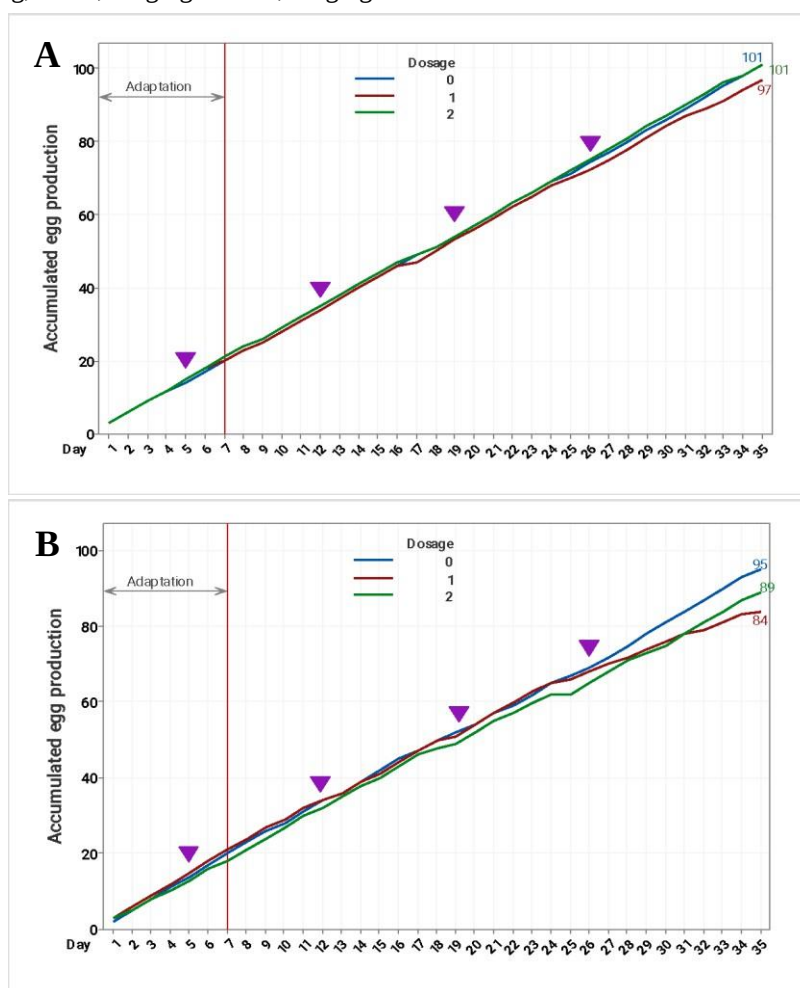
No tratamento de estresse para a dosagem 2, o peptídeo parece não ter agradado ao paladar das aves, que são mais exigentes quanto à alimentação. Alternativamente, durante a

distribuição das dosagens entre as aves, a dosagem 2 pode ter sido atribuída a galinhas mais seletivas em relação a preferências de cor, sabor e/ou cheiro.

3.4.1 Produção de ovos

A Figura 6 mostra a produção acumulada no período experimental para cada dosagem de peptídeo testada, no período experimental. No tratamento de conforto, observa-se perda de produção no grupo de dose de 5 mg/kg de peptídeo (92,4%) comparado com os grupos de dosagem 2,5 mg/kg e 0 mg/kg, ambas com viabilidade de 96,2%. Já no tratamento de estresse pelo calor, o grupo controle manteve uma viabilidade de 90,5%, enquanto os grupos com dosagem 5,0 mg/kg (D2) e 2,5 mg/kg (D1) apresentaram viabilidades de 84,8% e 80,0%, respectivamente.

Figura 6 - Produção de ovos acumulada no período do experimento, para cada dosagem testada, no tratamento A) conforto e B) estresse por calor. As marcações de cor magenta indicam os dias que se aplicaram as doses: controle: 0,0 mg/kg, D1: 2,5 mg/kg e D2: 5,0 mg/kg.



Fonte: Própria autora (2024).

3.4.2 Qualidade do ovo

As Tabelas 8 e 9 mostram as variações médias das variáveis de qualidade dos ovos observadas entre os grupos que receberam diferentes doses de peptídeo, dentro de cada tratamento ambiental.

Tabela 8 - Comparação das médias das variáveis de qualidade do ovo, para a condição de conforto, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).

Variável	0		1		2	
Peso (g)	59,30	± 0,30 ^B	60,60	± 0,40 ^A	58,70	± 0,30 ^B
Unidade Haugh	87,20	± 0,90 ^A	86,60	± 1,10 ^A	88,20	± 0,90 ^A
Ht - Altura do albúmen (mm)	7,73	± 0,13 ^A	7,62	± 0,18 ^A	7,87	± 0,14 ^A
Espessura da casca (mm)	0,43	± 0,01 ^A	0,41	± 0,01 ^B	0,44	± 0,01 ^A
Resistência da casca (kgf)	4,79	± 0,10 ^A	3,61	± 0,13 ^B	4,82	± 0,08 ^A
Gravidade específica (g/cm ³)	1081,00	± 0,50 ^A	1077,00	± 0,60 ^B	1080,80	± 0,60 ^A

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de comparação de médias de Fisher.

Fonte: Própria autora (2024).

Tabela 9 - Comparação das médias das variáveis de qualidade do ovo, para a condição de estresse por calor, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).

Variável	0		1		2	
Peso (g)	55,00	± 0,40 ^A	54,00	± 0,60 ^A	54,30	± 0,60 ^A
Unidade Haugh	89,40	± 0,80 ^A	88,40	± 1,50 ^{AB}	85,60	± 1,60 ^B
Ht - Altura do albúmen (mm)	7,85	± 0,13 ^A	7,83	± 0,24 ^A	7,46	± 0,27 ^A
Espessura da casca (mm)	0,40	± 0,01 ^A	0,40	± 0,01 ^A	0,37	± 0,01 ^B
Resistência da casca (kgf)	3,18	± 0,12 ^B	3,61	± 0,16 ^A	2,94	± 0,15 ^B
Gravidade específica (g/cm ³)	1072,70	± 0,60 ^B	1076,90	± 0,80 ^A	1070,50	± 0,80 ^C

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de comparação de médias de Fisher.

Fonte: Própria autora (2024).

Os resultados mostram que a dose de 2,5 mg/kg na condição de conforto proporcionou uma perda de qualidade na casca dos ovos, reduzindo a espessura e a resistência da casca. Na condição de estresse por calor, a dose de 5,0 mg/kg prejudicou a unidade Haugh e a espessura da casca, enquanto a dose de 2,5 mg/kg melhorou a resistência da casca.

3.5 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

As Tabelas 10 e 11 mostram as médias dos parâmetros sanguíneos dos grupos de galinhas submetidas às diferentes doses de peptídeo administradas, para os tratamentos de conforto e estresse por calor. Não foram verificadas diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos entre os grupos de galinhas que receberam diferentes doses de peptídeos.

Tabela 10 - Comparação das médias dos parâmetros sanguíneos, para a condição de conforto, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).

Variável	0	1	2
Glicose	193,20 ± 2,90	201,60 ± 4,00	193,80 ± 4,40
Hemoglobina	8,94 ± 0,21	8,28 ± 0,42	9,13 ± 0,14
Eritrócito	29,21 ± 0,73	27,28 ± 1,01	28,78 ± 0,58
Proteínas totais	8,11 ± 0,26	8,56 ± 0,30	7,92 ± 0,22
Hemácias	214,00 ± 7,00	210,40 ± 9,60	229,30 ± 7,50
Leucócitos	102,70 ± 6,90	93,60 ± 8,50	101,70 ± 5,60
K	4,54 ± 0,34	4,51 ± 0,32	4,71 ± 0,47
Na	152,80 ± 1,70	151,80 ± 1,80	153,60 ± 2,10
Cl	121,10 ± 0,40	120,30 ± 0,40	115,10 ± 6,10
Nca	7,00 ± 0,17	6,86 ± 0,20	6,98 ± 0,22
Ica	6,32 ± 0,16	6,21 ± 0,20	6,32 ± 0,22
Tca	12,30 ± 0,30	12,10 ± 0,39	12,30 ± 0,40
Ph	7,24 ± 0,02	7,26 ± 0,03	7,25 ± 0,03

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de comparação de médias de Fisher.

Fonte: Própria autora (2024).

Tabela 11 - Comparação das médias dos parâmetros sanguíneos, para a condição de estresse por calor, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 0: sem peptídeo, dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).

Variável	0	1	2
Glicose	195,70 ± 4,00	198,10 ± 3,80	193,60 ± 2,50
Hemoglobina	8,42 ± 0,18	8,69 ± 0,25	8,78 ± 0,40
Eritrócito	28,50 ± 0,60	27,61 ± 0,70	28,72 ± 0,69
Proteínas totais	7,73 ± 0,25	8,15 ± 0,39	7,51 ± 0,28
Hemácias	219,40 ± 6,00	203,70 ± 10,70	204,80 ± 10,60
Leucócitos	90,20 ± 4,80	84,10 ± 9,60	87,90 ± 7,20
K	4,22 ± 0,23	4,01 ± 0,26	4,19 ± 0,19
Na	148,80 ± 1,60	149,50 ± 1,90	149,20 ± 1,70
Cl	120,80 ± 2,50	116,70 ± 0,40	118,00 ± 1,10
Nca	6,47 ± 0,17	6,83 ± 0,17	6,56 ± 0,16
Ica	5,82 ± 0,14	6,20 ± 0,17	5,97 ± 0,14
Tca	11,40 ± 0,30	12,10 ± 0,30	11,60 ± 0,30
Ph	7,27 ± 0,02	7,27 ± 0,02	7,27 ± 0,03

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no teste de comparação de médias de Fisher.

Fonte: Própria autora (2024).

3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA E HISTOPATOLOGIA

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica laboratorial amplamente utilizada para a detecção de antígenos específicos em tecidos, por meio da ligação de anticorpos a esses alvos. Nessa técnica, um anticorpo primário altamente específico se liga ao antígeno de interesse presente nas células ou matriz extracelular. Para permitir a visualização dessa ligação, um anticorpo secundário conjugado a um sistema de detecção (como enzimas, fluorocromos ou partículas de ouro) é aplicado, formando um complexo que reage com um substrato cromogênico, gerando uma coloração visível sob microscopia.

3.6.1 Interferentes na realização da imunohistoquímica (IHQ)

- **Fixação inadequada:** a subfixação ou superfixação dos tecidos, especialmente com formalina, pode alterar os epítomos antigênicos, comprometendo a ligação dos anticorpos. É

fundamental padronizar o tempo de fixação e o tipo de fixador utilizado;

- **Ressecamento dos blocos de parafina:** o ressecamento excessivo pode dificultar o corte e prejudicar a integridade das secções, impactando a exposição adequada dos antígenos;
- **Antígenos mascarados:** o processamento do tecido, como o uso de altas temperaturas na inclusão em parafina ou a aplicação inadequada de métodos de recuperação antigênica, pode mascarar os epítomos. A recuperação de antígenos é essencial para melhorar a reatividade dos anticorpos.

3.6.2. Protocolo utilizado - FLEX Monoclonal Mouse Anti-Myogenin Clone F5D

A técnica de IHQ foi realizada seguindo o protocolo padronizado denominado FLEX Monoclonal Mouse Anti-Myogenin Clone F5D da marca DAKO, que é amplamente reconhecido por sua precisão e confiabilidade na detecção de antígenos específicos em amostras de tecido. Esse protocolo utiliza uma abordagem indireta, onde um anticorpo primário específico para o antígeno alvo é aplicado à secção tecidual. Após a incubação, o anticorpo primário é detectado por meio de um anticorpo secundário biotinilado ou conjugado a um sistema de detecção enzimático, como a peroxidase, que, em contato com o substrato cromogênico (como a diaminobenzidina - DAB), gera uma coloração marrom visualmente detectável ao microscópio.

Este protocolo garante alta especificidade e sensibilidade, sendo amplamente utilizado em análises diagnósticas, particularmente no contexto da identificação de marcadores tumorais, inflamação e outras condições patológicas. A padronização dos reagentes e o controle rigoroso de cada etapa do procedimento visam reduzir variações e garantir a reprodutividade dos resultados. Conforme Quadros 2 e 3, segue abaixo os marcadores utilizados:

- **CD3:** A marcação das células CD3⁺ foi observada com distribuição difusa pelo parênquima esplênico, na mucosa e lâmina própria de ambos os intestinos com destaque nas placas de peyer, não apresentando diferença entre os grupos (controle e tratamento). No fígado foi observado um discreto número de células marcadas nos animais do grupo tratamento (tanto em D1 como em D2), quando comparado ao grupo controle que apresentava raras células imunomarcadas.

Quadro 2 - Marcadores utilizados - Parte 1.

Produto	Clone		Lote	Validade
CD3		<i>Polyclonal Rabbit</i>	41686191	31/12/2025
CD4	4B12	<i>Monoclonal Mouse</i>	41700148	31/03/2026
CD68	PG-M1	<i>Monoclonal Mouse</i>	41680152	31/12/2025
CD8	C8/144B	<i>Monoclonal Mouse</i>	41718521	31/03/2026

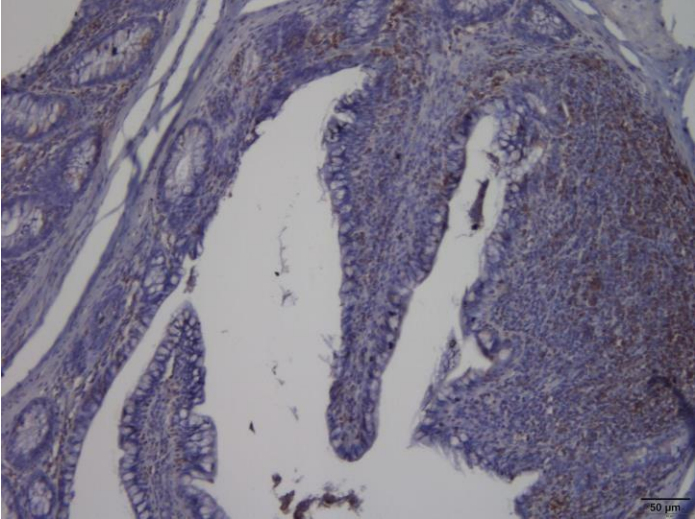
Fonte: Própria autora (2024).

Quadro 3 - Marcadores utilizados - Parte 2.

	Bloco	Marcadores
1	controle	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
2	D2	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
3	D1	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
4	controle	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
5	controle	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
6	D2	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
7	D1	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
8	D2	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
9	D1	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
10	D1	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
11	D2	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
12	controle	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
13	D1	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
14	controle	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
15	controle	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
16	D1	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
17	D2	CD3, CD4, CD8 e Macrófago
18	D2	CD3, CD4, CD8 e Macrófago

Fonte: Própria autora (2024).

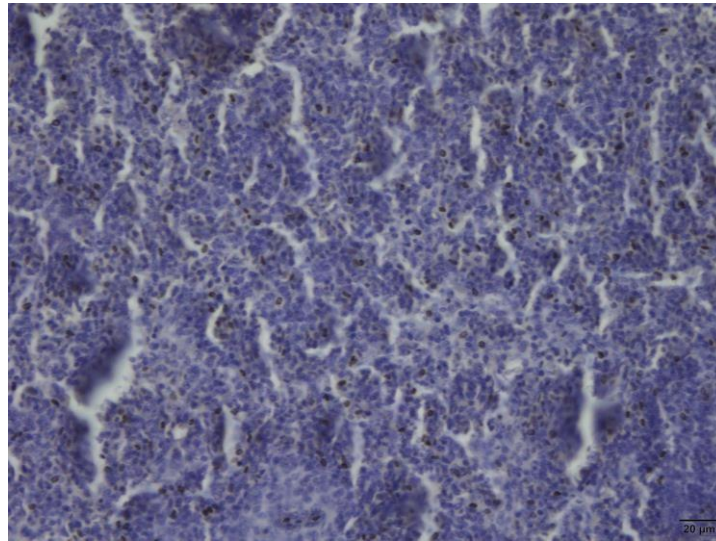
Figura 7 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 20 vezes, do intestino grosso de uma ave que não recebeu dosagem de peptídeo (controle) submetida ao estresse por calor.



Fonte: Própria autora (2024).

- **CD4:** Os linfócitos CD4⁺ foram detectados nos cortes de baço com distribuição difusa em ambos os grupos (controle e tratamento). Nos demais órgãos analisados não foram observadas marcações.

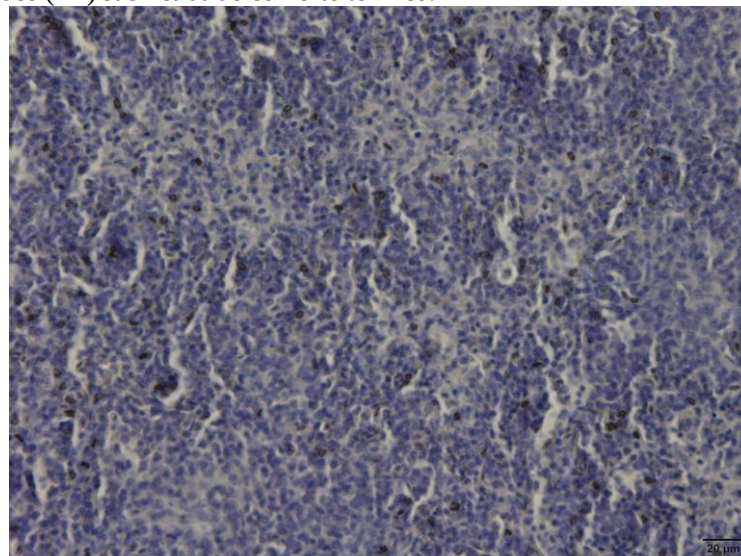
Figura 8 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 40 vezes, do baço de uma ave que recebeu a dosagem 1 de peptídeo (D1) submetida ao estresse por calor.



Fonte: Própria autora (2024).

- **CD8:** Em relação à marcação para linfócitos CD8⁺ apenas o baço apresentou distribuição aleatória de raras células imunomarcadas nos dois grupos (controle e tratamento). Demais tecidos não houve marcação.

Figura 9 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 40 vezes, do baço de uma ave que recebeu a dosagem 1 de peptídeo (D1) submetida ao conforto térmico.

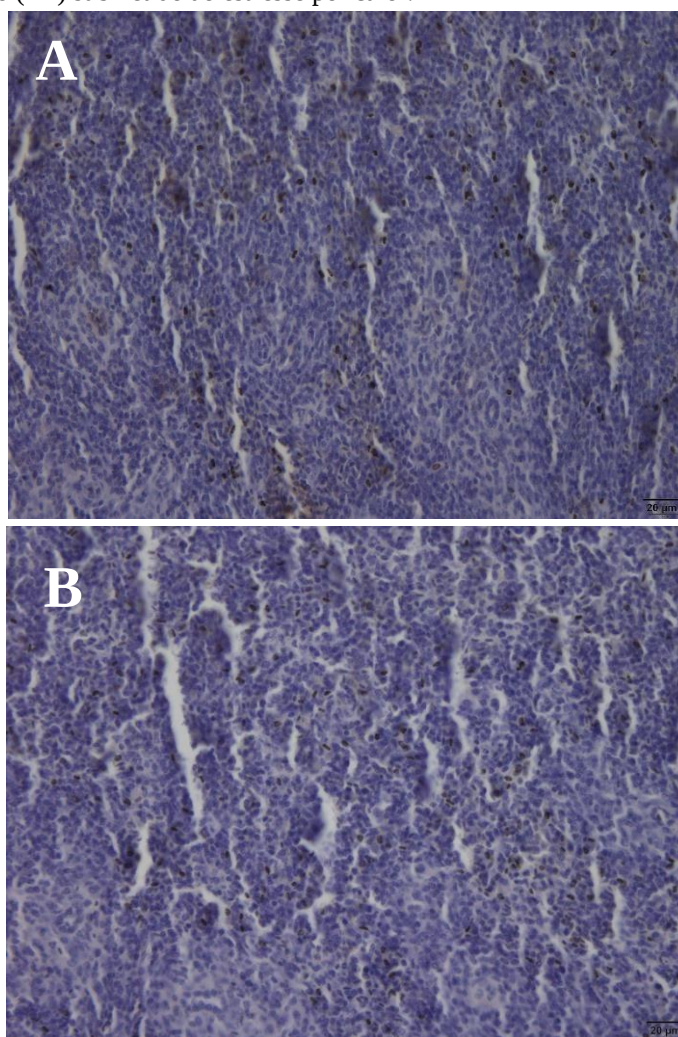


Fonte: Própria autora (2024).

- **CD68:** Os macrófagos foram identificados pelo anticorpo CD68 (clone PG-M1) nos cortes de baço, apresentando marcações com distribuição difusa, tanto no grupo controle e tratamento. No fígado foram observadas raras células positivas no espaço porta e nos sinusoides

entre os hepatócitos, porém sem diferença entre os grupos. Demais tecidos com ausência de marcação.

Figura 10 - Corte histológico aumentado em lente objetiva com fator de 40 vezes, do baço de uma ave que recebeu a dosagem 2 do peptídeo (D2) submetido ao estresse por calor.



Fonte: Própria autora (2024).

Desse modo, não foram identificadas alterações com base nas células investigadas neste estudo, indicando que o tratamento não promove um recrutamento de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD68^+$ nos tecidos analisados, principalmente nos intestinos.

3.7 CONSUMO DAS MICROCÁPSULAS

Foi oferecido para cada galinha um total de 3,080 kg de ração durante os 28 dias de experimento. Além da ração, ofertou-se 23,1 g de peptídeo antimicrobiano Ctx(Ile²¹)-Ha para D1 e para a D2, 46,2 g. A Tabela 12 apresenta a sobra de microcápsulas em cada dosagem.

Na Tabela 12, verifica-se que as galinhas do tratamento de conforto para a dosagem

2 consumiram apenas 63,2% das microcápsulas. Este baixo consumo de microcápsulas pode ter ocorrido devido a uma seletividade maior dessas aves em relação às características organolépticas das microcápsulas como cor, sabor e cheiro.

Tabela 12 - Total de microcápsulas consumidas em porcentagem para a condição de conforto e estresse por calor, entre as doses experimentais de peptídeos (dose 1: 2,5 mg/kg e dose 2: 5,0 mg/kg).

Tratamento	Dosagem	Sobra (mg)	Total fornecido (mg)	Total consumido (%)
Conforto	1	0	23.100	100,0
	2	170	46.200	63,2
Estresse por calor	1	20	23.100	91,3
	2	0	46.200	100,0

Fonte: Própria autora (2024).

A granulometria das microcápsulas de D2 e D1 não foi homogênea, sendo que D2, apresentou visualmente uma granulometria um pouco maior em relação às partículas do D1, o que pode ter influenciado na seletividade das aves.

4 DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da suplementação com peptídeos antimicrobianos (PAMs) na produção e qualidade dos ovos de galinhas poedeiras, com ênfase nas condições de estresse térmico. Os resultados indicaram que, em geral, na suplementação com PAMs não houve diferenças significativas na produção ou qualidade dos ovos. Esses resultados indicam a necessidade de aprofundar os estudos sobre o uso de PAMs na avicultura, em consonância com as discussões de Ferreira, Lima e Moura (2021) e Rodrigues, Santos e Carvalho (2022), que enfatizam a relevância de práticas inovadoras e sustentáveis sem aprimoramento dos sistemas produtivos.

Embora tenha sido registrada uma melhoria na conversão alimentar nos grupos suplementados com PAMs, essa melhoria foi associada a uma redução no consumo de ração. A diminuição da ingestão alimentar pode ter resultado em prejuízos na produção dos ovos, evidenciada pela redução significativa do peso das aves. Isso sugere que os PAMs podem induzir uma sensação de saciedade às aves, limitando o consumo alimentar. Esses resultados contrastam com os de Silva, Lima e Santos (2020), que relataram melhorias na conversão alimentar sem redução na ingestão de ração.

Não foram observadas diferenças significativas na qualidade dos ovos, como espessura da casca e resistência, mesmo em condições de conforto térmico. Esses resultados estão alinhados aos de Camargo *et al.* (2020), que também não identificaram alterações significativas na qualidade da casca sob condições nutricionais otimizadas, mas sem o uso de

PAMs.

O estresse térmico é um fator crítico que afeta o desempenho das aves, influenciando a fisiologia, o controle da temperatura corporal, o consumo alimentar e a eficiência produtiva. No contexto do presente estudo, a suplementação com PAMs não pareceu influenciar positivamente nem negativamente em relação aos impactos gerados pelo estresse por calor, reforçando a importância do manejo térmico, como planejado por Oliveira *et al.* (2023).

Os PAMs são reconhecidos por sua atividade antimicrobiana, mas este estudo não avaliou diretamente seus impactos na saúde intestinal ou na prevenção de infecções bacterianas. Assim, qualquer conclusão sobre esses aspectos seria especulativa.

A crescente busca por alternativas aos antibióticos na avicultura tem levado muitos estudos a explorar o uso de probióticos e postbióticos. Shehata *et al.* (2024) discutem a importância dos probióticos como substitutos aos antibióticos convencionais, que têm efeitos adversos sobre a saúde intestinal das aves. Os probióticos podem melhorar a integridade da mucosa intestinal e aumentar a resistência a patógenos, reduzindo os efeitos negativos do estresse térmico. Além disso, a utilização de postbióticos, substâncias produzidas por microrganismos benéficos durante o processo de fermentação, tem se mostrado uma abordagem promissora para fortalecer a saúde intestinal sem os riscos associados aos antibióticos tradicionais. El-Wahab, Visscher e Shehata (2024) reforçam que os postbióticos podem ser usados para melhorar a resposta imunológica e combater os efeitos do estresse térmico, tornando-se uma ferramenta importante no manejo de aves expostas a condições adversas.

Estudos futuros devem buscar compreender melhor os mecanismos entre o uso dos PAMs e o desempenho das aves, explorando possíveis interações com a microbiota intestinal e os processos metabólicos associados ao consumo e aproveitamento de nutrientes, conforme sugerido por He e Deber (2024). Investigações adicionais, como análises de tecidos, puderam fornecer informações sobre possíveis impactos adversos no trato digestivo ou em outros órgãos.

Os resultados deste estudo apontam para a complexidade dos efeitos do estresse térmico em galinhas poedeiras e para a importância de abordagens integradas que levem em consideração aspectos fisiológicos, ambientais e nutricionais. Nesse sentido, o uso de PAMs requer mais investigações para elucidar seus efeitos e potencial aplicação, alinhando-se às demandas de uma avicultura sustentável e eficiente, como proposto por Ferreira, Lima e Moura (2021).

O estresse térmico por calor é um fator imprescindível que impacta diretamente o desempenho reprodutivo das aves de postura e a qualidade dos ovos. O aumento das

temperaturas ambientais provoca uma série de reações fisiológicas e bioquímicas nas aves, alterando significativamente a qualidade dos ovos produzidos. Essa relação é abordada por diversos autores, como Camargo *et al.* (2020) e Oliveira *et al.* (2014), que destacam como o estresse térmico afeta a mineralização da casca do ovo e a composição de albumina e gema.

Estudos de Benfield e Henriques (2020) e Espeche *et al.* (2024) sugerem que o estresse térmico induz respostas celulares, como a produção de radicais livres e o aumento da permeabilidade celular, comprometendo a integridade das membranas e a produção de proteínas essenciais. De acordo com Berchieri Jr. (2009), esses processos podem impactar o metabolismo de cálcio e fósforo, fundamentais para a formação da casca do ovo.

Assim, o estresse térmico se configura como uma preocupação crescente na avicultura, especialmente em regiões com temperaturas elevadas, como o Brasil. Esse tipo de estresse pode afetar diretamente a saúde e o desempenho das galinhas. Estudos como o de Xu *et al.* (2024) mostram que a exposição prolongada a altas temperaturas pode provocar alterações no sistema imunológico e aumentar a inflamação, afetando principalmente órgãos vitais, como o fígado e o intestino. Essas mudanças podem reduzir a capacidade de defesa contra infecções e comprometer a absorção de nutrientes, impactando negativamente o desempenho das aves.

O estudo de Zhang *et al.* (2024) também destaca os efeitos do estresse térmico no intestino das galinhas, com danos ao microbioma intestinal. O intestino, além de ser responsável pela digestão, tem papel fundamental na imunidade. Sua função prejudicada pode reduzir a capacidade do animal de absorver nutrientes essenciais, prejudicando sua saúde geral. Esse impacto é especialmente relevante quando se considera a absorção dos PAMs, que podem ajudar na recuperação intestinal e na manutenção do equilíbrio do organismo.

Os PAMs têm sido amplamente investigados como uma alternativa eficaz na prevenção de doenças infecciosas em aves. Shanu, Choudhary e Devi (2024) exploram os diversos tipos de PAMs derivados de bactérias lácticas, que demonstraram capacidade de combater uma ampla gama de patógenos intestinais, favorecendo a saúde geral das aves. A inclusão destas moléculas na dieta das galinhas pode ajudar a prevenir infecções que prejudicam a digestão e a absorção de nutrientes, fator determinante em condições de estresse térmico.

Os PAMs têm ganhado destaque devido à sua capacidade de combater patógenos e fortalecer o sistema imunológico. Estudos como o de Liu *et al.* (2024) demonstram que esses peptídeos podem melhorar a resposta imunológica das galinhas, tornando-as mais resistentes a infecções. Além disso, como os PAMs podem ser absorvidos no intestino, eles têm o potencial de proteger esse órgão, especialmente em situações de estresse térmico, quando o intestino pode estar mais vulnerável a danos. A absorção desses peptídeos no intestino é necessária para

garantir que as aves se beneficiem de suas propriedades, ajudando a manter o equilíbrio saudável do sistema digestivo.

Wang *et al.* (2024) ressaltam os benefícios dos PAMs na proteção contra infecções virais, como a doença de Gumboro, um problema comum na avicultura. A capacidade desses peptídeos de regular o sistema imunológico e reduzir a inflamação pode ser útil para proteger as galinhas em ambientes estressantes.

O estresse térmico também é um fator importante na deterioração da saúde hepática e renal das galinhas, conforme discutido por Nanto-Hara e Ohtsu (2024). O aumento da temperatura pode provocar fibrose renal crônica em aves, o que pode ser exacerbado pela presença de compostos como o sulfato de indoxila. A intervenção com substâncias bioativas, como os postbióticos ou o uso de PAMs, pode atuar na modulação das vias inflamatórias, ajudando a prevenir ou reduzir a fibrose renal induzida pelo estresse.

O fígado desempenha um papel central no metabolismo e é altamente vulnerável ao estresse térmico. Wu *et al.* (2024) demonstraram que as altas temperaturas induzem alterações na expressão de genes codificadores de RNAs mensageiros e longos não codificantes (lncRNAs) no fígado de galinhas poedeiras. Essas mudanças estão associadas a alterações no metabolismo energético e na resposta antioxidante. O estudo também destacou que a curcumina pode ajudar a regular esses processos, reforçando sua relevância como aditivo alimentar protetor.

No intestino, o estresse térmico provoca danos significativos na barreira intestinal, aumentando a permeabilidade e favorecendo processos inflamatórios. Kang *et al.* (2024) identificaram alterações no perfil de exossomos no soro de galinhas submetidas ao calor, o que reflete possíveis disfunções intestinais e sistêmicas. Essas descobertas sugerem que o uso de suplementos, como os PAMs, pode ajudar a manter a integridade intestinal, reduzindo os efeitos do estresse térmico.

Conforme demonstrado por Xu *et al.* (2024), esse estresse pode comprometer tanto a resposta imunológica quanto a capacidade do animal de lidar com infecções. Assim, entender os mecanismos envolvidos no estresse térmico é essencial para desenvolver estratégias de manejo mais eficazes. Nesse contexto, os PAMs surgem como uma alternativa promissora, principalmente para proteger o intestino das galinhas e melhorar a absorção de nutrientes. Estudos como os de Liu *et al.* (2024) e Zhang *et al.* (2024) indicam que o uso de PAMs pode ser uma solução eficaz para mitigar os efeitos negativos do estresse térmico, promovendo a saúde intestinal e imunológica das aves.

Os achados deste estudo, juntamente com as contribuições de diversos

pesquisadores, ressaltam a necessidade de mais investigações sobre o uso de PAMs para a saúde intestinal das galinhas em ambientes de estresse por calor. A interação entre esses compostos e o impacto do estresse térmico nos órgãos vitais, como o fígado e os rins, exigem uma análise mais aprofundada para compreender plenamente seus benefícios e limitações. Os estudos de Zhang *et al.* (2024), Liu *et al.* (2024), e Kim *et al.* (2024) abrem um caminho promissor para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis na avicultura.

A imunohistoquímica tem sido uma ferramenta valiosa para estudar os efeitos do estresse térmico em aves, especialmente na avaliação de alterações celulares e teciduais provocadas por esse tipo de condição. De acordo com estudos recentes, o estresse térmico pode causar danos significativos em tecidos sensíveis, como os do trato gastrointestinal e dos sistemas respiratório e reprodutivo, prejudicando o desempenho produtivo das aves. A imunohistoquímica permite identificar e quantificar proteínas específicas associadas a respostas inflamatórias, apoptose e estresse oxidativo, proporcionando informações fundamentais sobre os mecanismos biológicos subjacentes a esses danos (Almeida; Martins, 2022; Berchieri Junior *et al.*, 2009).

Além disso, essa técnica também contribui para o desenvolvimento de estratégias de manejo e suplementação alimentar que minimizem os efeitos do estresse térmico. Por exemplo, pesquisas indicam que o uso de antioxidantes e probióticos pode reduzir a expressão de marcadores de estresse celular detectados pela imunohistoquímica, promovendo uma melhor resposta imunológica e mantendo a integridade dos tecidos (Dehsahraee *et al.*, 2024; Kim *et al.*, 2024). Assim, a integração entre o uso de métodos avançados de análise e práticas de manejo sustentáveis é essencial para melhorar o bem-estar animal e garantir maior eficiência produtiva na avicultura.

Por fim, estratégias mitigadoras do estresse térmico, como ventilação adequada e suplementação nutricional, são recomendadas por Almeida e Martins (2022) e Camargo *et al.* (2020), que enfatizam a importância do manejo térmico para garantir a qualidade dos ovos e a sustentabilidade na produção.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos da suplementação com peptídeos antimicrobianos (PAMs) em galinhas poedeiras, especialmente sob condições de estresse térmico. Os resultados demonstraram que, nas formas e concentrações testadas, os PAMs não trouxeram benefícios expressivos para a produção e a qualidade dos ovos. Em alguns casos, pode ser relacionada a efeitos como redução no desempenho produtivo, menor espessura

da cascata e possíveis desconfortos fisiológicos.

Estudos futuros são essenciais para compreender os mecanismos pelos quais os PAMs afetam o metabolismo e a fisiologia das aves, incluindo seu impacto sobre a microbiota intestinal e as vias metabólicas relacionadas ao consumo e absorção de nutrientes. Além disso, será importante investigar formas alternativas de administração e diferentes concentrações desses compostos, buscando potencializar seus benefícios.

Conclui-se que, nas condições avaliadas, não houve diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos, imuno-histológicos e de qualidade de ovos com o uso dos PAMs atrelado ao estresse por calor e conforto térmico. Contudo, os resultados deste trabalho oferecem subsídios para investigações futuras, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais robustas e alinhadas às demandas de sustentabilidade e eficiência da avicultura moderna.

6 DESAFIOS E ESTUDOS FUTUROS

Para os próximos estudos sugere-se aumentar o número de animais para que possíveis preferências dos indivíduos não afetem os resultados. O grande desafio do presente trabalho foi realizar a síntese peptídica em larga escala, pois o estudo *in vivo* exigiu uma quantidade alta de microcápsulas, e, por isso, o número de unidades experimentais teve que ser reduzido.

Sugere-se que ocorra uma padronização da granulometria das microcápsulas, além da inserção de aromas e/ou cores que atraiam as aves para que aumente o consumo das partículas.

Uma possível repetição do mesmo experimento durante um maior período com mais aves, pode retornar parâmetros interessantes de qualidade e espessura de casca. Substituições estratégicas na sequência peptídica, verificando parâmetros de cationicidade e hidrofobicidade podem auxiliar na interação peptídeo/membrana de alguns patógenos, o que pode colaborar com o aumento da imunidade das aves.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, S.; BRUNETTI, A. E.; GARAY, A. V.; SANTOS, L. C.; PEREZ, L. O.; MOREIRA, D.; CANCELARICH, N. L.; BARBOSA, E. A.; BASSO, N. G.; FREITAS, S. M.; FAIVOVICH, J.; BRAND, G.; CABRERA, G. M.; LEITE, J. R. S. A.; MARANI, M. M. Structure and function of cationic hylin bioactive peptides from the tree frog *Boana pulchella* in interaction with lipid membranes. **Peptides** (N.Y.), v. 159, p. 170-900, jan., 2023. DOI: 10.1016/j.peptides.2022.170900. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978122001668>. Acesso em: 12 ago. 2024.
- ALMEIDA, F. L.; MARTINS, G. P. Avicultura de postura e o futuro da produção sustentável. **Estudos em Economia Agrícola**, v. 37, n. 2, p. 50-60, 2022.
- ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. M. Patologia clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. S.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 939-966.
- BENFIELD, A. H.; HENRIQUES, S. T. Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs. intracellular mechanisms. **Frontiers in Medical Technology**, v. 2, p. 610997, dez., 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.610997>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/medical-technology/articles/10.3389/fmedt.2020.610997/full>. Acesso em: 04 dez. 2024.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009.
- BRASIL. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília: Ministério da Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2018. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_. Acesso em: 11 ago. 2024.
- CAMARGO, S.; OLIVEIRA, H.; CARVALHO, D.; ISMAR, M.; REZENDE, P.; SOUTO, C.; OLIVEIRA, S. Fatores intrínsecos à poedeiras comerciais que afetam a qualidade físico-química dos ovos. **Pubvet**, v. 14, n. 03, p. 1-11, abr., 2020. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n3a529.1-11>. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/631/631>. Acesso em: 03 ago. 2024.
- COSTA, M. F.; ALMEIDA, C. R. Avicultura e sustentabilidade: Desafios na produção de ovos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, n. 3, p. 220-240, 2019.
- DEHSAHRAEE, R. R.; MAHDAVI, A. H.; SEDGHI, M.; SALEH, H. Effect of different levels of single cell protein and probiotic microorganisms on performance, immunological responses, and intestinal histology in laying hens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)**, n. 108, p.1177–1188, abr., 2024. DOI: 10.1111/jpn.13963. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jpn.13963>. Acesso em: 30 nov. 2024.

EL-WAHAB, A. A.; VISSCHER, C.; SHEHATA, A. A. Use of Postbiotics in the Poultry Industry: Current Knowledge and Future Prospects. In: SHEHATA, A.A., TELLEZ-ISAIAS, G., EISENREICH, W. **Alternatives to Antibiotics against Pathogens in Poultry**. Springer, Cham. 2024. p. 101-120. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-031-70480-2_6. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-70480-2_6. Acesso em: 10 dez. 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologia e inovação na cadeia produtiva de ovos**. 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.com.br>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ESPECHE, J. C.; VARAS, R.; MATURANA, P.; CUTRO, A. C.; MAFFÍA, P. C.; HOLLMANN, A. Membrane permeability and antimicrobial peptides: Much more than just making a hole. **Peptide Science**, v. 116, n. 1, p. 1-14, jan., 2024. DOI: 10.1002/pep2.24305. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pep2.24305>. Acesso em: 15 set. 2024.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. **Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa**. 1ª ed. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2019.

FERREIRA, J. P.; LIMA, A. T.; MOURA, R. J. Desafios econômicos na avicultura de postura: a influência dos insumos no custo de produção. **Estudos Econômicos Agropecuários**, v. 33, n. 4, p. 110-120, 2021.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1994.

HE, S.; DEBER, C. M. Interaction of designed cationic antimicrobial peptides with the outer membrane of gram-negative bacteria. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1894, jan., 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-51716-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-51716-1>. Acesso em: 08 set. 2024.

HENRIQUES, J. K. S.; RODRIGUES, R. B.; UCZAY, M. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 12, n. 2, p. 179-189, 2018.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20ª ed. São Paulo: Manole, 2008. Cap. 24.

HOFFMAN, C. S.; BERTO, V. Mecanismos de Contaminação de Ovos por Salmonella: uma comparação entre as vias vertical e horizontal. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 10, n. 11, p. 1952-1959, 2024. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v10i11.16645>. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/16645>. Acesso em: 02 nov. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola do Brasil**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 01 nov. 2024.

KANG, K.; GAO, W.; CUI, Y.; XIAO, M.; AN, L.; WU, J. Curcumin Changed the Number, Particle Size, and miRNA Profile of Serum Exosomes in Roman Laying Hens under Heat

Stress. **Genes**, v. 15, n. 2, p. 217, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes15020217>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/15/2/217>. Acesso em: 10 dez. 2024.

KIM, D. H.; KIM, Y. B.; LEE, S. H.; LEE, K. W. Effects of relative humidity on physiology and behavior of laying hens exposed to high ambient temperatures. **Tropical Animal Health and Production**, v. 56, n. 8, p. 275, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-024-04117-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-024-04117-5>. Acesso em: 10 dez. 2024.

LIU, M.; KANG, Z.; CAO, X.; JIAO, H.; WANG, X.; ZHAO, J.; LIN, H. Prevotella and succinate treatments altered gut microbiota, increased laying performance, and suppressed hepatic lipid accumulation in laying hens. **J Animal Sci Biotechnol**, v. 15, n. 1, p. 26, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00975-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40104-023-00975-5>. Acesso em: 10 dez. 2024.

LIU, X.; WANG, X.; SHI, X.; WANG, S.; SHAO, K. The immune enhancing effect of antimicrobial peptide LLv on broilers chickens. **Poultry Science**, v. 103, n. 2, p. 103235, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103235>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257912300754X>. Acesso em: 10 dez. 2024.

MAHBOUB, H. H.; YOUSEFI, M.; ABDELGAWAD, H. A.; ABDELWARITH, A. A.; YOUNIS, E. M.; SAKR, E.; KHAMIS, T.; ISMAIL, S. H.; RAHMAN, A. N. A. Expression profiling of antimicrobial peptides and immune-related genes in Nile tilapia following *Pseudomonas putida* infection and nano-titanium dioxide gel exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, p. 110037, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.110037>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S105046482400682X>. Acesso em: 10 dez. 2024.

MORGAN, N. K.; WALLACE, A.; BEDFORD, M. R.; HAWKING, K. L.; RODRIGUES, I.; HILLIAR, M.; CHOCT, M. In vitro versus in situ evaluation of xylan hydrolysis into xylo oligosaccharides in broiler chicken gastrointestinal tract. **Carbohydrate Polymers**, 230, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115645>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486171931313X?via%3Dihub>. Acesso em: 18 dez. 2024.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00897a025>. Acesso em: 12 nov. 2024.

NANTO-HARA, F.; OHTSU, H. In laying hens, chronic heat stress-induced renal fibrosis is potentially promoted by indoxyl sulfate. **Sci Rep**, v. 14, n. 23213, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75066-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1038/s41598-024-75066-0>. Acesso em: 10 dez. 2024.

NATT, M. P.; HENRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952. DOI: [10.3382/ps.0310735](https://doi.org/10.3382/ps.0310735). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257911951447X>. Acesso em: 02 set. 2024.

OLIVEIRA CASTRO, J.; YANAGI JUNIOR, T.; BAHUTI, M.; FASSANI, É. J.; RIBEIRO DE LIMA, R. Thermal comfort thresholds for Japanese quails based on performance and egg quality. **International Journal of Biometeorology**, v. 67, n. 2, p. 265-274, fev., 2023. DOI: 10.1007/s00484-022-02403-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00484-022-02403-1>. Acesso em: 08 nov. 2024.

OLIVEIRA, D. L.; NASCIMENTO, J. W. B.; CAMERINI, N. L.; SILVA, R. C. FURTADO, D. A.; ARAUJO, T. G. P. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 11, p. 1186-1191, nov., 2014. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v18n11p1186-1191. Disponível em: scielo.br/j/rbeaa/a/JQZzYG3W5vC7H7svmN5L7FH/?format=pdf&lang=pt. Acesso em: 09 ago. 2024.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. **Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 01 nov. 2024.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 27-32, 2012. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34038473/4488-libre.pdf?1403726584=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DA_REVIEW_ON_IONOTROPIC_GELATION_METHOD_N.pdf&Expires=1733245408&Signature=eS4gde57kUpCA1gXxM2QjdO3mVBgYIIWw51QPkF-93gCjERebA1W~BiVx8afMqPbggujZ~RuykUYoywOY6UaSw6S75WiMjcy2TjFkjtZ7uFcdTCUBVrUHt5cgWbYJUeuyobD-gq~sR6Ra9A~a~iFD~8KEhk~jtnrS6KfhfJDHx613K2vLrcgoKczD6c7Aa4o6bMBw4A9n~MYbQ3Tq-F-boC4n6t9VTtDg-SsKdKrfFq4QBnIJhUc69HuyHzk--uLnoasBXS4O2VOUOM4E3JHGQg7XgOvtooSTtqLJ2pfWrVVHkQ~61ZHNiyPMqhFR-Ww8--kFdYkbpXeOlk9zUalaA_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 18 set. 2024.

RODRIGUES, L. M.; SANTOS, R. P.; CARVALHO, T. D. Tendências na produção de ovos: o crescimento dos sistemas alternativos e orgânicos. **Revista de Estudos de Produção Animal**, v. 56, n. 2, p. 80-95, 2022.

ROQUE-BORDA, C. A.; PEREIRA, L. P.; GUASTALLI, E. A. L.; SOARES, N. M.; MACLEAN, P. A. B.; SALGADO, D. D.; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M.; VICENTE, E. F. HPMCP-coated microcapsules containing the Ctx(Ile²¹)-Ha antimicrobial peptide reduce the mortality rate caused by resistant *Salmonella* Enteritidis in laying hens. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 616, mai., 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10060616. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34064051/>. Acesso em: 19 set. 2024.

ROQUE-BORDA, C. A.; SARAIVA, M. M. S.; MONTE, D. F. M.; ALVES, L. B. R.; ALMEIDA, A. M.; FERREIRA, T. S.; LIMA, T. S.; BENEVIDES, V. P.; CABRERA, J. M.; CLAIRE, S.; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M.; PAVAN, F. R.; BERCHIERI JUNIOR, A.; VICENTE, E. F. HPMCAS-coated alginate microparticles loaded with Ctx(Ile²¹)-Ha as a

promising antimicrobial agent against *Salmonella* Enteritidis in a chicken infection model. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 472-481, mar., 2022. DOI: 10.1021/acsinfecdis.1c00264. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.1c00264>. Acesso em: 10 nov. 2024.

SHANU, K.; CHOUDHARY, S.; DEVI, S. Antimicrobial Peptides and Their Applications. In: RAY, S., KUMAR, P., MANDAL, M. **Antimicrobial Peptides from Lactic Acid Bacteria**: Diversity, Biosynthesis and Applications. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 209-246. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-97-3413-9_9. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-97-3413-9_9. Acesso em: 10 dez. 2024.

SHEHATA, A. A.; BASIOUNI, S.; TELLEZ-ISAIAS, G.; EISENREICH, W.; HAFEZ, H. M. Probiotics as Alternative to Antibiotics. In: SHEHATA, A.A., TELLEZ-ISAIAS, G., EISENREICH, W. **Alternatives to Antibiotics against Pathogens in Poultry**. Springer, Cham, 2024. p. 59-78. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-031-70480-2_4. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-70480-2_4. Acesso em: 10 dez. 2024.

SILVA, J. P.; LIMA, M. T.; SANTOS, R. F. Avaliação da resistência e espessura da casca de ovos: um estudo experimental. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 2, p. 123-130, 2020.

TRENTO, G. S.; HASSUMI, J. S.; BUZO FRIGÉRIO, P. B.; BASSI, A. P. F.; OKAMOTO, R.; GABRIELLI, M. A. C.; PEREIRA-FILHO, V. A. Gene expression, immunohistochemical and microarchitectural evaluation of bone formation around two implant surfaces placed in bone defects filled or not with bone substitute material. **International Journal of Implant Dentistry**, v. 6, n. 80, p. 1-14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40729-020-00279-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40729-020-00279-7>. Acesso em 27 nov. 2024.

WANG, D.; YU, P.; SHE, R.; WANG, K. Protective effects of rabbit sacculus-derived antimicrobial peptides on SPF chicken against infection with very virulent infectious bursal disease virus. **Poultry Science**, v. 103, n. 7, p. 103797, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103797>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579124003766>. Acesso em: 10 dez. 2024.

WU, X.; DU, X.; PIAN, H.; YU, D. Effect of Curcumin on Hepatic mRNA and lncRNA Co-Expression in Heat-Stressed Laying Hens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 10, p. 5393, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25105393>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/10/5393>. Acesso em: 10 dez. 2024.

XU, L. N.; GAO, J.; YAO, J. W.; JIAO, H. C.; WANG, X. J.; LIN, H.; ZHAO, J. P. Dynamic responses of systemic immunity and splenic inflammation to long-term cyclic high-temperature exposure in growing pullets and laying hens. **Poultry Science**, v. 103, n. 9, p. 104014, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579124005935>. Acesso em: 10 dez. 2024.

ZHANG, H.; PERTIWI, H.; HOU, Y.; MAJDEDDIN, M.; MICHIELS, J. Protective effects of *Lactobacillus* on heat stress-induced intestinal injury in finisher broilers by regulating gut

microbiota and stimulating epithelial development. **Science of the Total Environment**, v. 918, p. 170410, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170410>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896972400545X>. Acesso em: 10 dez. 2024.