

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA GENTAMICINA APLICADA EM OVOS  
DE AVES REPRODUTORAS PESADAS E SEU EFEITO  
RESIDUAL NOS TECIDOS**

**Giovana Bongioiolo Magenis  
Médica Veterinária**

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA GENTAMICINA APLICADA EM OVOS  
DE AVES REPRODUTORAS PESADAS E SEU EFEITO  
RESIDUAL NOS TECIDOS**

**Giovana Bongioio Magenis, M.V.**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Rita Pacheco**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni**

Dissertação apresentada á Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

**2015**

Magenis, Giovana Bongioio  
M192a Avaliação da gentamicina aplicada em ovos de aves reprodutoras  
pesadas e seu efeito residual nos tecidos / Giovana Bongioio  
Magenis. -- Jaboticabal, 2015  
vii, 110 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientadora: Maria Rita Pacheco  
Coorientadora: Silvana Martinez Baraldi Artoni  
Banca examinadora: Daniela Oliveira, Otto Mack Junqueira  
Bibliografia

1. Frangos de corte. 2. Gentamicina. 3. Ovos. 4. Segurança clínica.  
5. Resíduo tecido. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.33:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DA GENTAMICINA APLICADA EM OVOS DE AVES REPRODUTORAS PESADAS E SEU EFEITO RESIDUAL NOS TECIDOS

**AUTORA:** GIOVANA BONGIOLO MAGENIS

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA RITA PACHECO

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. DANIELA OLIVEIRA

Universidade Federal Rural de Pernambuco / Garanhuns/PE

Prof. Dr. OTTO MACK JUNQUEIRA

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 24 de abril de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**GIOVANA BONGIOLO MAGENIS** – Nascida em 14 de maio do ano de 1984, na cidade de Criciúma, estado de Santa Catarina, filha de Agenor Magenis e Cladir Maria Bongioolo Magenis. Graduiu-se em medicina veterinária em dezembro de 2009 no Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Realizou estágio curricular na Perdigão Agroindustrial S.A. (atualmente BRF) na cidade de Videira - SC, no período de julho a dezembro de 2009, atuando na área de sanidade e extensão na integração de frangos de corte da referida empresa. Em março do ano seguinte, ingressou na empresa fabricante de produtos para uso veterinário Ourofino Saúde Animal Ltda, localizada na cidade de Cravinhos, estado de São Paulo, onde atuou no Departamento Técnico de Aves e Suínos por um ano e cinco meses, e no Departamento de Estudos Pré-clínicos e Clínicos por aproximadamente um ano e sete meses, e desde março de 2014 desenvolve suas atividades na Fazenda Experimental Ourofino. Em março de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV – Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob orientação da Profa. Dra. Maria Rita Pacheco e co-orientação da Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni.

## **AGRADECIMENTOS**

A orientadora, Profa. Dra. Maria Rita Pacheco, por ter me recebido prontamente para a orientação na pós-graduação. E a minha co-orientadora, Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, por sempre me incentivar e dedicar o seu tempo com os ensinamentos que tanto me ajudaram nessa caminhada.

Para aqueles que apesar da distância estão sempre próximos em pensamento e também no coração, Pai, Mãe, Mano e Mana, obrigado pelo carinho e apoio sempre dispensado durante toda a minha vida. A minha cunhada Deise e as minhas sobrinhas, Maria Luiza e Ana, por me proporcionar momentos inesquecíveis e ainda mais alegres.

Ao meu companheiro e eterno amigo, Ruiney, que há vários anos vem fazendo os meus dias mais prazerosos e sempre me apoiando em todos os momentos. Sabes que és muito importante da minha vida! Agradeço pelas longas conversas, muitas vezes decisivas para concluir essa caminhada, pela dedicação, carinho e paciência. As palavras de José de Alencar resumem: “Tentei lhe dizer muitas coisas, mas acabei descobrindo que amar é muito mais sentir do que dizer”.

Aos professores Otto Mack Junqueira, Lizandra Amoroso e Daniela Oliveira pelas sugestões concedidas na banca. A Tiekko, funcionária da biblioteca, pelo auxílio com as referências bibliográficas.

A empresa Ourofino e aos colegas do Departamento de Estudos Pré-Clínicos e Clínicos, do Centro de Pesquisa Veterinária e do Registro Veterinário, que em momentos diferentes da minha jornada souberam compreender, ajudar e tornar realidade esse grande sonho.

A FCAV-UNESP e ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado nesta instituição.

E a todos que fizeram parte dessa caminhada, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO 1 – Considerações gerais</b> .....	<b>1</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Revisão de literatura</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 2 – Avaliação da gentamicina aplicada em ovos de aves reprodutoras pesadas e seu efeito até os 21 dias de idade</b> .....	<b>30</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
2.1. Animais experimentais .....	<b>33</b>
2.2. Ambiente e manejo .....	<b>33</b>
2.3. Procedimento experimental .....	<b>34</b>
2.3.1. Preparo da solução vacinal e formulação testada .....	<b>34</b>
2.3.2. Grupos experimentais .....	<b>35</b>
2.3.3. Peso corporal .....	<b>36</b>
2.3.4. Exame físico dos animais .....	<b>36</b>
2.3.5. Exames laboratoriais .....	<b>36</b>
2.3.6. Mortalidade .....	<b>38</b>
2.4. Análise estatística .....	<b>38</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
3.1. Peso corporal médio .....	<b>38</b>
3.2. Exame físico .....	<b>39</b>
3.3. Hemograma .....	<b>39</b>
3.3.1. Eritrograma .....	<b>39</b>
3.3.2. Leucograma .....	<b>45</b>
3.4. Bioquímica Sérica .....	<b>51</b>
3.5. Mortalidade .....	<b>57</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
4.1. Peso corporal médio e exame físico .....	<b>57</b>
4.2. Eritrograma .....	<b>57</b>
4.3. Leucograma .....	<b>60</b>
4.4. Bioquímico .....	<b>63</b>
4.5. Mortalidade .....	<b>68</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

<b>CAPÍTULO 3 - Efeito residual da gentamicina em tecidos de frangos de corte .....</b>	<b>78</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
2.1. Animais experimentais.....	81
2.2. Ambiente e manejo.....	81
2.3. Procedimento experimental .....	<b>82</b>
2.3.1. Preparo da solução vacinal e formulação testada .....	82
2.3.2. Grupos experimentais.....	83
2.3.3. Colheitas de amostras .....	<b>84</b>
2.3.4. Metodologia de quantificação da gentamicina nos tecidos.....	<b>84</b>
2.4. Estatística .....	<b>85</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>86</b>
3.1. Análise das concentrações residuais da gentamicina nos tecidos.....	<b>86</b>
3.1.1. Tecido muscular .....	86
3.1.2. Tecido adiposo .....	<b>86</b>
3.1.3. Tecido renal.....	<b>87</b>
3.1.4. Tecido hepático .....	<b>88</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO II.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO III.....</b>	<b>110</b>

**Estes estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de  
Animais (CEUA) do CPABR (Protocolos nº 129 e 130)**

## AVALIAÇÃO DA GENTAMICINA APLICADA EM OVOS DE AVES REPRODUTORAS PESADAS E SEU EFEITO RESIDUAL NOS TECIDOS

**RESUMO** – A preocupação da indústria avícola em manter altos índices de produtividade e de segurança dos alimentos fez com que surgissem ações preventivas a fim de evitar a introdução de patógenos no sistema avícola. O uso de gentamicina associada à vacinação *in ovo* tem sido amplamente utilizada com essa finalidade. Neste particular, são escassas as informações disponíveis na literatura acerca da segurança clínica e alimentar da gentamicina quando aplicada *in ovo*. Diante disto, dois experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito da administração da gentamicina em ovos de reprodutoras pesadas nos parâmetros físicos, hematológicos e bioquímicos, e também a permanência desse antimicrobiano nos tecidos de frangos de corte. No primeiro estudo, foram utilizados 200 ovos de matrizes da linhagem Cobb e, aos 18 dias de incubação, 100 ovos receberam apenas a vacina contra a doença de *Marek* (GC) e os outros 100 receberam a vacina juntamente com 0,22mg/ovo de sulfato de gentamicina (GT). Após o nascimento (D0), foram realizados exames físicos nos momentos D+3, D+6, D+10, D+14 e D+21 (3, 6, 10, 14 e 21 dias após o nascimento, respectivamente), assim como exames complementares em D+6, D+10, D+14 e D+21. Os parâmetros físicos compreenderam pesagem, avaliação da condição corpórea, comportamento, postura/marcha, respiração, apetite, excretas, penas e pele, bem como sinais de intoxicação. Quanto aos parâmetros laboratoriais, foram determinados o hemograma completo e as provas bioquímicas séricas [ureia, ácido úrico, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), creatina quinase, albumina e proteínas plasmáticas totais]. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do procedimento general Linear Models (GLM) do SAS com pós-teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%. Em ambos os grupos, todas as aves se apresentaram saudáveis ao longo do estudo e o peso corporal médio não diferiu estatisticamente entre GC e GT. No hemograma, apesar das variações dentro do mesmo tratamento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. No D+10, o grupo controle apresentou níveis de GGT acima dos encontrados pelo grupo tratado ( $p \leq 0,05$ ), entretanto, as concentrações médias de GC ( $23,67 \pm 8,97$  UI/L) e GT ( $12,50 \pm 6,64$  UI/L) permaneceram dentro dos limites fisiológicos para a espécie (9-30 UI/L). Os valores de ALT diferiram significativamente em D+14, com valores em GC ( $138,75 \pm 142,66$  UI/L) superiores aos do GT ( $26,00 \pm 20,42$  UI/L), no entanto, o segundo permaneceu dentro da faixa de normalidade (19-50UI/L). Para os demais parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Já no segundo experimento, foram incubados 200 ovos, oriundos de matrizes da linhagem Cobb. Aos 18 dias de incubação, todos os ovos receberam a vacina juntamente com 0,22mg/ovo de gentamicina. Após o nascimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em repetições de seis animais cada, compondo cinco grupos de abate (grupos A, B, C, D e E). Cada grupo teve suas aves abatidas nos momentos D+14, D+21, D+28, D+35 e D+42 (14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, respectivamente). Realizou-se o abate dos animais via deslocamento cervical e foram colhidas amostras de músculo, pele/gordura, fígado e rim. A

quantificação de gentamicina e seus metabólitos (C1, C1a, C2 e C2a) nos tecidos foi realizada via técnica de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas, metodologia esta previamente validada. As quantificações observadas foram submetidas a método estatístico recomendado pela European Medicines Agency para determinação do período de carência. Para o músculo e para pele/gordura, todas as amostras avaliadas durante o estudo apresentaram quantificação de gentamicina abaixo do limite máximo permitido. Verificou-se que, nas matrizes fígado e rim, a gentamicina apresentou maior tendência ao acúmulo, com maior permanência no tecido renal. O período de carência foi de 16,8 dias para as matrizes músculo e pele/gordura. Já para as matrizes rim e fígado, o período de retirada foi de 25,2 dias (26 dias), período este inferior ao tempo de abate para frangos de corte no Brasil (35 a 42 dias). Concluiu-se que a administração de 0,22mg/ovo de gentamicina associada à vacina de *Marek* não causou alterações físicas e clínicas significantes quando administrada em ovos de aves reprodutoras pesadas e que sua utilização não gera resíduos em carne de frangos.

**Palavras-chave:** frangos de corte, gentamicina, ovos, segurança clínica, resíduo tecido

## EVALUATION OF GENTAMICIN APPLIED IN EGGS OF BROILER BREEDERS HENS AND ITS RESIDUAL EFFECT IN TISSUE

**ABSTRACT** – The concern of the poultry industry to maintain high levels of productivity and food security has spurred preventive actions in order to prevent the introduction of pathogens in the poultry system. The use of gentamicin associated with *in ovo* vaccination has been widely used for this purpose. In particular, there is little information available in the literature about the clinical and food safety of gentamicin when applied *in ovo*. Given this, two experiments were conducted to evaluate the effect of the administration of gentamicin in eggs of breeders in physical, hematological and biochemical parameters, as well as the permanence of this antimicrobial in broiler tissues. In the first study, 200 eggs of Cobb arrays were used and, in the 18th day of incubation, 100 eggs received only vaccination against *Marek's* disease (CG) and the other 100 received the vaccine with 0.22mg/egg of gentamicin sulfate (GT). After the birth (D0), physical examinations were performed at times D+3, D+6, D+10, D+14 and D+21 (3, 6, 10, 14 and 21 days after birth, respectively), as well as additional tests on D+6, D+10, D+14 to D+21. The physical parameters covered weighing, evaluation of body condition, behavior, posture/gait, breathing, appetite, feces, feathers and skin, as well as signs of intoxication. As for the laboratory parameters, the complete blood count and serum biochemical tests [urea, uric acid, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), creatine kinase, albumin and total plasma proteins] were determined. The results were statistically analyzed using the General Linear Models Procedure (GLM) of SAS with Tukey's test, with a significance level of 5%. In both groups, all birds showed healthy throughout the study and the average body weight was not significantly different between GC and GT. In the complete blood count, despite variations within the same treatment, no significant differences between groups were observed. At D+10, the control group had levels of GGT above the ones found in the treated group ( $p \leq 0.05$ ). However, the average concentrations of GC ( $23.67 \pm 8.97$  UI/L) and GT ( $12.50 \pm 6.64$  UI/L) remained within the physiological limits for the species (9-30 UI/L). ALT levels were significantly different in D+14, with values in GC ( $138.75 \pm 142.66$  UI/L) greater than the ones in GT ( $26.00 \pm 20.42$  UI/L), but remained within the second normal range (19-50 UI/L). For other biochemical parameters, no significant differences between groups were observed. In the second experiment, 200 eggs from Cobb lineage were incubated. After 18 days of incubation, all eggs received vaccine coupled with 0.22mg/egg of gentamicin. After birth, the animals were randomly distributed in equal groups of six animals each, composing five slaughter groups (Groups A, B, C, D and E). Each group had their birds slaughtered in times D+14, D+21, D+28, D+35 and D+42 (14, 21, 28, 35 and 42 days respectively). We carried out the slaughter of animals via

cervical dislocation and muscle, skin/fat, liver and kidney samples were collected. The quantification of gentamicin and its metabolites (C1, C1a, C2 and C2a) in the tissue was conducted by means of the technique of liquid chromatography with detection by mass spectrometry, methodology which was previously validated. The measurements observed were submitted to statistical method recommended by the European Medicines Agency for the determination of the grace period. For muscle and skin/fat, all samples evaluated during the study presented quantification of gentamicin below the maximum allowed limit. It was found that in the liver and kidney matrices gentamicin showed a greater tendency to accumulate with greater permanence in the renal tissue. The grace period was 16.8 days for matrices of muscle and skin/fat. As for the kidney and liver matrices, the withdrawal period was of 25.2 days (26 days), inferior to the slaughter time for broilers in Brazil (35-42 days). Thus, one concludes that the use of 0,22mg/egg of gentamicin coupled with Marek's vaccine did not cause significant physical and clinical alterations when administered in eggs of breeding heavy birds and that its use does not spawn residues in broiler meat.

**Keywords:** broiler, gentamicin, eggs, clinical safety, tissue residue

## **CAPITULO 1 – Considerações gerais**

### **Introdução**

No ano de 2013 o Brasil produziu aproximadamente 12.308 mil toneladas de carne de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos (16.958 mil toneladas) e da China (13.500 mil toneladas). Entretanto, 3.918 mil toneladas destinadas à exportação proporcionaram ao Brasil a manutenção do *status* de maior exportador mundial desta proteína (UBABEF, 2014). Em termos de competitividade e qualidade, o país produz o frango de melhor qualidade e mais barato do mundo (MENDES; SALDANHA, 2004), cuja produção emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (UBABEF, 2014). Segundo Caldeira (2012), a indústria avícola se caracteriza pela agregação contínua de novas tecnologias, o que proporciona elevados índices de produtividade entre os diversos segmentos do agronegócio. A fim de manter ou superar esses dados mercadológicos, a avicultura se desenvolveu ao longo dos anos em diversas áreas e aperfeiçoou a produção de alimentos, visando o bem estar dos animais, porém sem esquecer do fornecimento de alimentos mais seguros e saudáveis para o consumo humano.

Dentre os novos desafios que norteiam o aumento dos índices de produtividade está a manutenção da sanidade animal. Neste particular, o desenvolvimento de técnicas (nutrição, genética, ambiência, etc.) que visam o maior rendimento em um curto espaço de tempo também pode favorecer a ocorrência de diversas enfermidades, para as quais se torna necessário o emprego de princípios ativos capazes de combater os micro-organismos potencialmente patogênicos.

Assim, destacam-se o uso de antimicrobianos com a finalidade preventiva ou terapêutica, que contribuem de forma marcante para o sucesso da avicultura brasileira e para a obtenção dos níveis de excelência atuais desta atividade. Da mesma forma, Spinosa et al. (2002) citam que o uso de antimicrobianos é essencial à avicultura moderna.

As terapias antimicrobianas são amplamente difundidas na atualidade dentre os sistemas produtivos, concentrando-se grande parte das prescrições destas moléculas durante as fases de criação dos frangos de corte. Em contrapartida, sabe-se que durante a incubação dos ovos e nos primeiros dias de vida dos pintinhos a exposição à patógenos é bastante elevada. Diante disso, para promover proteção dos pintinhos a estas infecções, tem-se recorrido ao uso preventivo de antimicrobianos administrados *in ovo* juntamente com a vacina contra a doença de *Marek* (McCAPES et al., 1975; McCAPES et al., 1977; EDENS et al., 1997; BAILEY; LINE, 2001; ITO et al., 2005; HOFACRE, 2010).

Dentre os muitos antimicrobianos utilizados na avicultura industrial, destaca-se a gentamicina, utilizada na injeção *in ovo* no momento da transferência dos ovos das incubadoras para os nascedouros, na tentativa de evitar a infecção do pintinho no momento do alojamento (BIFFI, 2012), além de indiretamente, diminuir a mortalidade por bactérias contaminantes (PHELPS et al., 1989).

Apesar do uso rotineiro desses antimicrobianos, atualmente, diante das novas diretrizes regulatórias, torna-se necessário a condução de pesquisas complementares para a averiguação dos reais efeitos dos produtos nas diferentes espécies animais. Em consonância, o uso de produtos veterinários se consolida a partir de estudos que comprovem a eficácia, segurança clínica e do alimento nos animais de produção.

São escassas as informações disponíveis em literatura acerca da segurança clínica e alimentar da gentamicina quando aplicada *in ovo* de aves reprodutoras pesadas. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a segurança clínica da gentamicina quando administrada *in ovo* juntamente com a vacina de *Marek* e seus efeitos residuais nos tecidos de frangos de corte.

## Revisão de literatura

### Desafios da avicultura moderna

A avicultura é a atividade que possui o maior e mais avançado acervo tecnológico dentre o setor agropecuário brasileiro. Nas últimas décadas a avicultura de corte tem investido constantemente em inovações tecnológicas, permitindo a inclusão de novos conceitos aos sistemas de criação de frangos de corte. Na decisão de implementação destes sistemas existe a procura pela maior eficiência na produção, que tem como pilares a viabilidade técnica e econômica, com ênfase nos aspectos produtivos, sanitários e bem estar das aves (TINÔCO, 2001; ABREU; ABREU, 2011).

A cada dia verificamos as quebras de paradigmas nas questões de desempenho zootécnico, porém isto deve sempre estar associado ao desenvolvimento de produtos de alta qualidade, e um dos pontos importantes desta cadeia é a manutenção da qualidade sanitária dos pintinhos. No entanto, nem sempre esta evolução é acompanhada por condições ideais de ambiência, bem estar animal e instalações, e por isso, métodos de controle são de extrema importância para a manutenção sanitária (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011). Segundo Andreatti Filho e Patrício (2004), a prevenção e o controle das enfermidades é indispensável para a manutenção do *status* sanitário dos plantéis, evitando o impacto negativo sobre a produção avícola e conseqüentemente à saúde humana; o que torna o emprego de antimicrobianos relevante na avicultura moderna (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011).

A indústria de aves comerciais, totalmente integrada ou não, geralmente é composta por um sistema de criação bastante intensivo. Neste sistema, um aviário de frangos de corte pode conter milhares de aves confinadas, fazendo com que a prevenção de doenças seja o foco principal neste tipo de criação, minimizando perdas econômicas e sofrimento dos animais (HOFACRE, 2010). Nesse ambiente, os animais ficam expostos a vários micro-organismos prejudiciais e os principais patógenos responsáveis por prejuízos diretos ou indiretos à produtividade do frango de corte são subdivididos em quatro

categorias: vírus, bactérias, fungos e protozoários. Dentre os vírus, encontramos os micro-organismos causadores da doença de *Marek*, doença infecciosa da bolsa cloacal, anemia infecciosa, bronquite infecciosa, Influenza aviária, laringotraqueíte infecciosa, reovirose e reticuloendoteliose. Já para as causas bacterianas, os principais são as *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Para fungos, o *Aspergillus* spp. é o principal agente e já para os protozoários destacam-se o *Cryptosporidium baileyi* e a *Eimeria* spp. (ANDREATTI FILHO; PATRÍCIO, 2004). Habitualmente essas infecções são provindas de práticas de manejo intensivistas, tais como, o aumento da reutilização da mesma cama, redução nos intervalos de vazio sanitário, contaminações da ração e água, falhas no programa de biossegurança, dentre outros (ANDREATTI FILHO; PATRÍCIO, 2004).

A exposição precoce aos micro-organismos leva à estimulação dos mecanismos de defesa inata e também aos processos de proliferação e diferenciação das células imunitárias (TAZAWA; WHITTOW, 1999), porém, depender apenas do sistema imunitário dos pintinhos, pode em alguns casos levar à queda na produtividade. Ademais, Nitsan (1995) também cita que o peso na primeira semana de vida das aves apresenta alta correlação com o peso ao abate e que corresponde a aproximadamente 17% do período total de criação do frango de corte (GONZALES; SALDANHA, 2001). De modo que todos os esforços são importantes para evitar infecções no decorrer do processo de incubação e nos primeiros sete dias após o nascimento, pois o desenvolvimento do sistema imune ocorre de forma gradual durante as primeiras semanas de vida.

A preocupação da indústria avícola em manter altos índices de produtividade e de segurança dos alimentos fez com que surgissem ações preventivas para evitar a introdução de doenças no sistema avícola. Neste quesito, uma técnica bastante explorada é a vacinação dos pintinhos ainda durante o processo de incubação (vacinação *in ovo*). Além disso, a associação destas vacinas com compostos bactericidas vem trazendo bons frutos à avicultura mundial, tais como a redução na mortalidade dos lotes, redução no tempo de abate, melhor qualidade sanitária dos pintinhos, incremento na

eclosão dos ovos, dentre outros (TAVAKKOLI; DERAKHSHANFAR; GOOSHKI, 2014).

O conceito de vacinação *in ovo* foi iniciado por Sharma e Burmester em 1982 e se difundiu rapidamente por diversos continentes. Segundo os pesquisadores, os embriões de galinhas poderiam ser vacinados contra a doença de *Marek*, uma vez que a aplicação *in ovo* de vacina contra Herpesvírus de perus (HVT) sorotipo três fornecia maior proteção do que a vacinação após o nascimento. Desde então, outras pesquisas constataram a viabilidade da vacinação *in ovo* (SHARMA; WITTER, 1983; SHARMA, 1985; SHARMA, 1987; RICKS et al., 1999) e o emprego dessa tecnologia vem crescendo (COMTE, 2013).

Nos EUA, a Embrex, Inc. introduziu em 1992, o primeiro sistema automatizado de inoculação *in ovo*. O sistema utilizado, denominado Inovoject, permitia a administração de vacinas contra a doença de *Marek* (RICKS, 1999), no qual anteriormente as aves eram medicadas de forma individual no primeiro dia de vida. Hoje, as vacinações *in ovo* foram reforçadas por novas possibilidades de vacinas aptas a administração automática, citando como exemplo as vacinas para as doenças de *Gumboro*, *Newcastle* e Laringotraqueíte infecciosa (COMTE, 2013).

A introdução de sistema automático de vacinação *in ovo* resultou em desenvolvimento significativo para a avicultura industrial mundial, onde as incubadoras passaram a processar milhões de ovos por semana. Segundo Williams (2007), é possível inocular antígenos e outros compostos simultaneamente em mais de 50.000 ovos por hora. Atualmente, mais de 90% da produção avícola dos EUA utiliza a vacinação *in ovo* (WILLIAMS; ZEDEK, 2010), e grande parte da avicultura brasileira e argentina também lançam mão desta tecnologia (VILLALOBOS, 2015). De acordo com Comte (2013), no ano de 2012 o percentual global de vacinações automatizadas ficou em torno de 65% e, destes, destacam-se a América do Norte com 100% do emprego desta tecnologia seguido pela América do Sul com 97%.

A vacinação *in ovo* é amplamente vantajosa quando comparada com a vacinação pós-eclosão pela via subcutânea (SC) no primeiro dia de vida do pintinho, pois promove exposição precoce ao agente e, com isso, o desenvolvimento do sistema imune antecipado. Além disso, padroniza a

vacinação, pois permite administrar volumes e concentrações iguais para todas as aves; reduz o estresse pela manipulação após o nascimento; reduz os custos de trabalho além de permitir a administração de outros medicamentos juntamente com as vacinas (WILLIAMS, 2007) e também diminui as chances de contaminação cruzada.

Durante o processo de vacinação *in ovo* a agulha do equipamento pode penetrar em diferentes compartimentos: a câmara de ar, o saco alantoide, o fluido amniótico, o embrião e o saco vitelínico (WILLIAMS, 2007). Dependendo do compartimento que a agulha atingir a resposta imune será distinta. Wakenell et al. (2002) realizaram um estudo avaliando as diferentes respostas imunes dependendo do compartimento em que a vacina de *Marek* HVT/SB1 era administrada. Verificaram que os locais de injeção que apresentaram melhores resultados foram o fluido amniótico e o embrião com mais de 90% de proteção, já o saco alantóide e a câmara de ar apresentaram menos de 50% de proteção. Neste estudo as vacinas foram inoculadas em ovos com tempo de incubação entre 17 e 18 dias.

Segundo Williams (2001), existe uma tendência de ovos vacinados durante as fases finais de incubação (18° - 19° dia) apresentarem melhor taxa de eclosão que os ovos vacinados anteriormente a esse período. Dessa maneira, o tempo ideal de vacinação encontra-se entre 17° dia e 12 - 14 ao 19° dia e 2 - 4 horas de incubação. Nesse intervalo o embrião deve estar com a cabeça sob a asa direita e a base do saco vitelínico já retraído para a cavidade abdominal, em posição de eclosão. As vacinações após esse período podem atingir o embrião e reduzir a taxa de eclodibilidade. Em condições normais e dentro de período recomendado, a vacina é depositada no líquido amniótico.

Além das vacinas rotineiramente aplicadas *in ovo*, existem moléculas usualmente utilizadas simultaneamente ao procedimento de vacinação automatizado, onde os benefícios são ainda superiores. Diversos autores citam a combinação com carboidratos, proteínas, vitaminas, substâncias antimicrobianas, hormônios, probióticos e minerais (GORE; QURESHI, 1997; HENRY; BURKE, 1999; UNI; FERKET, 2004; UNI et al., 2005; LEANDRO et al., 2010; LEITÃO et al., 2010; TAVAKKOLI; DERAKHSHANFAR; GOOSHKI, 2014). Estas moléculas tem o propósito de melhorar a vida do embrião, a qualidade do pintinho recém-nascido, sua sobrevivência nos primeiros dias de vida,

e, conseqüentemente, estimular o crescimento e promover maior ganho de peso dos frangos de corte (UNI; FERKET, 2004; UNI, et al., 2005; LEANDRO, et al., 2010; LEITÃO, et al., 2010). Tendo em vista tais benefícios, atualmente as empresas avícolas brasileiras vem utilizando em grande escala a medicação *in ovo* juntamente com a vacina contra a de *Marek* e, dentre as substâncias mais empregadas, destaca-se a gentamicina (BIFFI, 2012).

### **A gentamicina e a avicultura industrial**

A gentamicina é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos, formado pela combinação de componentes produzidos por *Micromonospora purpurea* (RIVIERE; SPOO, 2003; DOWLING, 2010). Este antimicrobiano é indicado para uma variedade de bactérias causadoras de infecção em suínos, bovinos, equinos e aves (EMEA, 2015a), e é empregado principalmente no tratamento de infecções bacterianas respiratórias e entéricas (HOUDESHHELL et al., 1982).

A classe dos aminoglicosídeos pertence aos antimicrobianos mais antigos, onde a primeira molécula descoberta desta classe foi a estreptomicina, em 1944. Em seguida, várias substâncias similares foram lançadas, tais como a neomicina, paromomicina, canamicina, gentamicina e tobramicina (CHAMBERS; SANDE, 1996).

A partir de 1970, outros antimicrobianos semi-sintéticos (amicacina, dibecacina, sisomicina e netilmicina) foram disponibilizados a fim de contornar os problemas de desenvolvimento de resistência bacteriana (CHAMBERS; SANDE, 1996).

A ação dos aminoglicosídeos consiste em interferir na síntese protéica bacteriana, promovendo a formação de proteínas defeituosas. Liga-se irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo, provocando a leitura incorreta do código genético e, conseqüentemente, permite a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica que é formada no ribossomo, levando a morte celular (SPINOSA, 2002; ITO et al., 2005; PATRICK, 2005). Essa ligação irreversível pode explicar o efeito bactericida dos aminoglicosídeos em comparação a outros inibidores da síntese de proteínas (SPINOSA, 2002; GEHRING et al., 2005; ITO et al., 2005; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; KHARDORI, 2006).

Os aminoglicosídeos apresentam atividade melhorada em pH levemente alcalino, em torno de 7,4, onde estão positivamente carregados, facilitando a penetração em bactérias gram-negativas aeróbicas (PATRICK, 2005), principalmente *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. e a família *Enterobacteriaceae*. Tem ação limitada e variável contra bactérias gram-positivas e *Mycoplasma* spp. (ITO et al., 2005).

A farmacocinética de todos os aminoglicosídeos é bastante semelhante, devido à sua natureza polar, são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo que menos de 1% da dose é absorvida após administração oral ou retal (EMEA, 2015b; ITO et al., 2005; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). Já outros autores citam que a biodisponibilidade oral do aminoglicosídeo gentamicina é considerada igual a zero (BROWN; RIVIERE, 1991; ABU-BASHA; AL-SHUNNAQ; GEHRING, 2013). A principal via de administração é, portanto, parenteral, com a droga atingindo concentração plasmática máxima depois de 30 - 90 minutos da aplicação intramuscular (IM) ou SC (EMEA, 2015b; ITO et al., 2005; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; ABO-EL-SOUD, 2012; ABU-BASHA; AL-SHUNNAQ; GEHRING, 2013), e 30 minutos após sua injeção intravenosa (IV) (ITO et al., 2005; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Em avicultura, os principais aminoglicosídeos utilizados são a neomicina, canamicina, gentamicina, apramicina (LÓPEZ; OLVERA, 2008) e estreptomicina (HOFACRE, 2010). De acordo com Dowling (2010), a gentamicina é efetiva contra a maior parte dos bastonetes aeróbicos gram-negativos, inclusive várias cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente contra a família *Enterobacteriaceae*, contra algumas bactérias gram-positivas e contra *Mycoplasma* spp.

No dia a dia, a gentamicina injetável é utilizada em pintos e perus recém-nascidos por via SC na dose de cinco mg/kg de peso vivo para prevenção ou controle da transmissão horizontal de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* (ITO et al., 2005), *Proteus* sp. e *Pasteurella* sp. (LÓPEZ; OLVERA, 2008). Tortora, Funke e Case (2012) também comprovam a efetividade deste princípio ativo para tratamentos de casos envolvendo *Pseudomonas aeruginosa* e Dowling (2010) relata que a administração pela via

SC de gentamicina em pintinhos de um dia age na prevenção e tratamento de infecções causadas por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arizona paracolon* e *Salmonella* spp. Além disso, Saleemi et al. (2009) e Willians (2001) relataram que a gentamicina é empregada em diversas regiões do mundo com a finalidade de prevenir a mortalidade em pintinhos de um dia.

Na avicultura moderna esse princípio ativo é frequentemente aplicado junto com a vacina contra a doença de *Marek* (EIDSON; PAGE; KLEVEN, 1978; BAILEY; LINE, 2001; ITO et al., 2005), sendo utilizada principalmente via injeção *in ovo* ou via SC em pintinhos ou perus com um dia de vida (McCAPES et al., 1975; VERNIMB, 1976; HOFACRE, 2010; AGUNOS; LÉGER; CARSON, 2012). Estes dados corroboram com Houghton (2011), onde mais de 90% das incubadoras nos EUA utilizam o método de vacinação *in ovo*, sempre em associação com uma dose profilática de antimicrobianos. Já no Reino Unido e grande parte da Europa, essa combinação não se aplica, apenas a vacinação é aplicada.

Estudos farmacocinéticos comprovam que, quando o antimicrobiano é injetado *in ovo*, no líquido amniótico ou no embrião, o mesmo atinge níveis sanguíneos em 4 horas após a aplicação, o que pode ser fundamental para evitar infecções dos pintinhos no momento da eclosão e nos primeiros dias de vida (WILLIANS, 2001).

Além de auxiliar na prevenção de infecções dos pintinhos, o uso de gentamicina também auxilia na manutenção da esterilidade da solução vacinal e em outros casos tem a finalidade de controlar os gêneros *Mycoplasma* e *Salmonella* de um plantel de aves através da imersão de ovos férteis em suspensão aquosa contendo gentamicina (BICKFORD, LOY; BARNES, 1973; SAIF; SHELLY, 1973; ITO et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2005).

Entretanto, um dos pontos negativos desta administração está relacionado com seu potencial hidrogeniônico (pH) altamente alcalino que pode prejudicar o efeito da vacina contra a doença de *Marek*, quando utilizada em doses muito elevadas (acima de 0,2 mg de gentamicina/pintinho) ou se inadequadamente misturada à vacina (KINNEY; ROBLES, 1994). Em contrapartida, Catelli et al. (2014), citaram que o uso de gentamicina quando associado às principais vacinas contra a doença de *Marek* presentes no

mercado brasileiro não interferiram de forma relevante nas titulações vacinais e tão pouco no pH da solução.

Em aspectos práticos, diversos autores relataram a eficácia da gentamicina contra diversos micro-organismos patogênicos aos plantéis avícolas. Dentre os principais destacam-se a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp. (McCAPES et al., 1975; VERNIMB et al., 1976; McCAPES et al., 1977; FIORENTIN et al., 1992; ASHRAF; ARIF; BAILEY; LINE, 2001; KHAN, 2002; NASCIMENTO et al., 2005).

Com relação aos prejuízos causados pelas doenças bacterianas, Barnes, Gross e Vallancourt (2003), citam que a *Escherichia coli* é o agente responsável pela colibacilose aviária, a qual é uma das principais causas de perdas econômicas na avicultura industrial. Estes prejuízos decorrem do aumento da mortalidade, custos com tratamento e condenação de carcaças no abatedouro. Em busca de comprovar a eficácia da gentamicina quando administrada em aves com onfalite, Ashraf, Arif e Khan (2002) isolaram *E. coli* de aves doentes e posteriormente inocularam esse micro-organismo no saco da gema de pintinhos de três dias de idade. Neste estudo foi possível observar que animais inoculados e não medicados atingiram mortalidade bastante superior aos inoculados e tratados com gentamicina (50 e 7,14% respectivamente).

As salmoneloses são igualmente importantes no cenário avícola, de forma que são responsáveis por significativas perdas econômicas e por sérios danos à saúde pública, por sua correlação com a maioria dos casos de infecções alimentares. Estudos destes surtos em humanos indicam que produtos de origem animal, especialmente avícola, participam de forma significativa como fontes de contaminação (BIFFI, 2012). Para reduzir essas perdas, um estudo realizado por Bailey e Line (2001) com a administração de gentamicina *in ovo* demonstrou efeito benéfico na redução da infecção de pintinhos por *Salmonella typhimurium* no dia do nascimento.

Há também as infecções por micoplasmas, que se constituem em problemas de grande relevância na avicultura industrial. Entre as espécies com importância econômica destaca-se o *Mycoplasma gallisepticum*, o *Mycoplasma synoviae* e o *Mycoplasma meleagridis* (YODER JUNIOR, 1991). As infecções por micoplasmas são endêmicas em granjas produtoras de ovos ou frangos,

onde são transmitidas verticalmente pelo ovo, ou horizontalmente entre as aves de um mesmo lote. Uma das técnicas para controlar a transmissão desses micro-organismos é o emprego da administração de antimicrobianos *in ovo*, neste caso a gentamicina juntamente com a tilosina (FIORENTIN et al., 1992; NASCIMENTO et al., 2005) foram comprovadamente eficazes contra estes patógenos. Dados estes corroboram com McCapes et al. (1975) e McCapes et al. (1977), que verificaram que a inclusão de várias doses de gentamicina (0,1; 0,5; 2,5 e 5 mg/ovo) *in ovo* demonstraram eficácia no controle de *Mycoplasma meleagridis* em perus naturalmente infectados.

De modo geral, Vernimb et al. (1976), citam o uso de gentamicina na dose de 0,2 mg, via SC, como eficaz na redução da mortalidade por causas bacterianas em frangos de corte e galinhas poedeiras.

Alguns autores citam que a administração *in ovo* de gentamicina e outros antimicrobianos podem afetar a eficácia de produtos atuantes em microbiota gastrointestinal, baseados no princípio de exclusão competitiva (McREYNOLDS et al., 2000). Porém, Bailey e Line em 2001 desmistificaram essa premissa e comprovaram que a gentamicina quando aplicada *in ovo*, aos 18 dias de incubação, na dose de 0,4 mg/ovo, não apresentou qualquer efeito adverso ao produto testado (MSC<sup>®</sup> - Mucosal Starter Culture). Já Edens et al. (1997) relataram que quando a gentamicina é aplicada simultaneamente em compartimentos distintos com micro-organismos de exclusão competitiva o resultado torna-se benéfico, porém na administração no mesmo compartimento os efeitos não são vantajosos.

### **Segurança clínica da gentamicina quando administrada em aves**

A gentamicina é um medicamento eficaz e econômico utilizado para controlar doenças infecciosas em aves (ISLAM et al., 2011). Apesar do seu uso consagrado, Saleemi et al. (2009) expõem que o uso não oficial em pintos de um dia, visando a prevenção da mortalidade precoce nessa espécie, ainda é amplamente empregado em diversas regiões do mundo. Inclusive no Canadá, segundo Agunos, Leger e Carson (2012) o uso *in ovo* ainda não é oficial.

Seu uso indiscriminado preocupa, pois como característica do grupo dos aminoglicosídeos as disfunções renais e otológicas graves podem ocorrer

(GRINGAUZ, 1997; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; LÓPEZ; OLVERA, 2008; ITO et al., 2005; ISLAM et al., 2011), apesar da gentamicina ser considerada menos tóxica que os antimicrobianos neomicina e estreptomicina (LÓPEZ; OLVERA, 2008).

A nefrotoxicidade da gentamicina em mamíferos é bem documentada, no entanto, são esparsas as informações sobre a sua toxicidade em aves. Este problema está diretamente relacionado à via de eliminação dos resíduos do metabolismo, pois cerca de 80 - 85% da gentamicina é excretada via urina e o restante se acumula sobre as células corticais renais (MARTÍNEZ-SALGADO, HERÁNDEZ-LÓPEZ; NOVOA-LÓPEZ, 2007; LÓPEZ; OLVERA, 2008), onde praticamente não ocorre biotransformação. Isto causa uma desregulação nos mecanismos fisiológicos das filtrações glomerular e tubular (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006), o que resulta em possível disfunção renal. Apesar disto, nenhuma alteração patológica em diferentes órgãos de aves foi relatada associada à gentamicina (JAVED et al., 2008; LÓPEZ; OLVERA, 2008).

Esse acúmulo se deve à alta concentração de fosfatidil inositol nos tecidos renais, onde os aminoglicosídeos catiônicos se ligam aos fosfolípidios da parede celular. Estes podem sofrer pinocitose e ser armazenados em lisossomos e mitocôndrias, e até mesmo exercer seus efeitos tóxicos (ITO et al., 2005).

Apesar disto, a aplicação de 0,2 mg de gentamicina por ovo fértil não apresentou efeitos sobre a mortalidade das aves e pesos dos rins direito e esquerdo quando comparados os grupos tratado e controle. Por outro lado, algumas alterações histopatológicas foram observadas após a administração do ativo em ovos com quatro dias de incubação, tais como: congestão glomerular, dilatação cística dos túbulos contorcidos proximais, infiltração por células inflamatórias e congestão sanguínea (SINGROHA; SRIVASTAVA; CHHIKARA, 2012; SINGROHA; SRIVASTAVA; CHHIKARA, 2013).

No que diz respeito à ototoxicidade Fikes et al. (1994) descreveram que os antimicrobianos aminoglicosídeos são ototóxicos para mamíferos e aves, incluindo filhotes recém-nascidos, entretanto, os embriões de galinhas são insensíveis à gentamicina, canamicina e estreptomicina.

Segundo Islam et al. (2011), a gentamicina pode ser altamente tóxica para aves quando administrada em doses repetidas ou em overdose. Apesar disso, a dose letal (DL<sub>50</sub>) da gentamicina para roedores, quando administrada pela via oral, varia de 8.000 - 10.000 mg/kg. Porém, o efeito mais tóxico é verificado após aplicação IV (DL<sub>50</sub> 37 - 67 mg/kg) para ratos, camundongos, porquinho da Índia e cães. Quando administrada por via IM, SC e intraperitoneal, a dose letal varia de 200 - 890 mg/kg (WHO, 2014a; EMEA, 2015b). Segundo Yoshioka et al. (1972), Kauffman et al. (1975) e Gilstrap et al. (1988) a gentamicina atravessa rapidamente a placenta para a circulação fetal, apesar disto, testes *in vitro* e *in vivo* realizados em células de mamíferos concluíram que a gentamicina não apresenta potencial genotóxico e carcinogênico (WHO, 2014b).

Já no âmbito da avicultura industrial, Saleemi et al. (2009) avaliaram os efeitos tóxicos da gentamicina em doses crescentes, quando administrada via IM em pintos de um dia durante cinco semanas. Pode-se verificar que pintos tratados com doses de 10 a 20 mg/kg de gentamicina não apresentaram sinais clínicos ou alteração comportamental compatível com intoxicação. Alguns pintos tratados com doses de 30, 50 e 60 mg/kg apresentaram depressão moderada imediatamente após a administração, porém o efeito tóxico severo foi verificado em grande parte dos pintinhos tratados com doses de 60 mg/kg ou maiores (70, 80, 90, 100, 120, 140, 160 e 180 mg/kg), onde a dose letal calculada neste estudo foi de 77,56 mg/kg de peso vivo. Apesar disto, considerou-se que a partir da dose de 20 mg/kg os efeitos patogênicos iniciaram lentamente e afetaram grande parte dos parâmetros avaliados (sinais físicos e comportamentais, consumo de ração, consumo de água, ganho de peso, mortalidade, proteínas totais, creatinina, alanina aminotransferase e alterações histopatológicas), podendo verificar que apenas a dose de 10 mg/kg foi inócua aos pintos de um dia.

Estes dados confirmam com os encontrados por Javed et al. (2008), onde os efeitos tóxicos da gentamicina em pintinhos de um dia apareceram a partir da inclusão de 30 mg/kg até a dose máxima testada (70 mg/kg) pela via IM, sendo as principais alterações observadas foram depressão, anorexia, alto consumo de água, diarreia e mortalidade. Já no exame histopatológico,

observou-se a congestão dos rins e fígado, presença de hemorragias em diferentes órgãos do corpo, incluindo coração e músculos.

Não somente a administração de gentamicina em pintinhos recém-nascidos pode promover toxicidade, mas segundo Javed et al. (2013) a inclusão de gentamicina em vários níveis (0 - 120 mg/kg) pela via IM em frangos de corte de quatro semanas acarretou em efeitos tóxicos como: anorexia, aumento do consumo de água, diarreia, mortalidade (33% nas doses de 50 e 60 mg/kg; e 100% doses acima 70 mg/kg), nefrite, hepatomegalia, hemorragias no coração e músculos esqueléticos. Além dessas, acarretou também em alterações histopatológicas proeminentes nos rins e fígado, diminuição nos níveis de proteínas totais e albumina, e aumento da ALT e creatinina.

Em estudo similar realizado com galos com seis semanas de idade, foram visualizadas alterações macroscópicas nos rins e fígado (edemaciados, friáveis e hemorrágicos), necrose tubular aguda nos rins, deposição de gordura no fígado, aumento significativo nas concentrações de ureia e creatinina nas doses de 50 e 100 mg/kg. A mortalidade foi de 0%, 26% e 100% para as doses de 10, 50, e 100 mg/kg, respectivamente (KHAN et al., 2008). Dados similares foram obtidos em galinhas por Saleemi et al. (2012) para os parâmetros clínicos e histopatológicos, apesar de observar mortalidade de 82% após administração de quatro doses de 25 mg/kg de gentamicina em um período de duas semanas. Já na administração de sete doses de 10 mg/kg em um período de 9 a 15 semanas, os autores observaram que a taxa de mortalidade variou em torno de 9% e na dose de 22,5 mg/kg a mortalidade chegou a 72%, após a administração de três doses em aves com 20 semanas de idade.

McCapes et al. (1975) avaliaram o uso de gentamicina, tilosina, eritromicina e cloranfenicol na eliminação de *Mycoplasma meleagridis* após administração em ovos de perus. A gentamicina e o cloranfenicol destacaram-se como compostos atóxicos nas doses de 0,1 e 0,5 mg/ovo, porém reduziram a eclodibilidade nas doses de 2,5 e 5 mg/ovo. Testes complementares comprovaram que os embriões toleram até um mg/ovo de gentamicina e as lesões causadas pelo *Mycoplasma meleagridis* nos sacos aéreos foram eliminadas com o uso de gentamicina com doses mínimas de 0,1 mg/ovo, diferentemente dos demais tratamentos. Além disto, a gentamicina reduziu

marcadamente o isolamento de *Mycoplasma meleagridis* em perus recém-nascidos, evitando a disseminação desse agente.

Por meio de revisão bibliográfica e dados de estudos prévios, Islam et al. (2011), constataram que o efeito tóxico da gentamicina depende do tipo de ave, idade, dose e frequência do tratamento. Segundo os autores, os sinais de intoxicação normalmente iniciam após a administração do antimicrobiano por 2 a 3 semanas. Neste caso, foi possível observar que doses de gentamicina de no máximo 10 mg/kg são inócuas as aves (SALEEMI et al., 2009; ISLAM et al., 2011; JAVED et al., 2013).

Os princípios ativos comumente utilizados na avicultura brasileira associados à vacina contra a doença de *Marek* são a gentamicina e o ceftiofur, este pertencente à classe das cefalosporinas (BIFFI, 2012). Segundo o Compêndio de Produtos Veterinário do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (CPVS) no mercado brasileiro existem cinco produtos registrados destinados a este fim, três a base de gentamicina (Gentrin<sup>®</sup> Injetável – Ourofino Saúde Animal Ltda; Gentasil<sup>®</sup> – Vansil Indústria Comércio e Representações Ltda e Gentaflex<sup>®</sup> – Eurofarma Laboratórios Ltda) e dois com o ativo ceftiofur (Accent<sup>®</sup> – Fatec Indústria de Nutrição Animal e Saúde Animal Ltda e Cefhal<sup>®</sup> – Pharmalogic Indústria e Comércio Ltda) (SINDAN, 2014). Além de outros não cadastrados no Compêndio, como o Minoxel<sup>®</sup> (Elanco Saúde Animal) e o Excenel<sup>®</sup> (Zoetis Saúde Animal), ambos a base de ceftiofur.

### **Segurança dos alimentos e análise de resíduos de antimicrobianos em tecidos**

O bem-estar e a saúde dos seres humanos são direitos universalizados, sendo, portanto, dever de todos os governos, preservar e manter a saúde das pessoas, dos rebanhos, das culturas e dos ecossistemas (BRASIL, 2014c). A produção de alimentos com qualidade visa à obtenção de produtos inócuos, ou seja, alimentos que não se constituam como fonte de perigos, sejam eles biológicos, físicos e/ou químicos e que, quando presentes, podem causar danos à saúde (ABNT, 2006). Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos de medicamentos veterinários que podem representar risco

caso não sejam empregadas as boas práticas veterinárias, seja em função do uso exagerado e/ou indevido, e também do não cumprimento dos períodos de carência pré-estabelecidos (FAO, 1993). De acordo com o *Codex Alimentarius*, resíduo de uma droga veterinária corresponde à fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados (BRASIL, 2014c).

Na avicultura, a utilização de antimicrobianos em programas sanitários preventivos e/ou terapêuticos pode ocasionar o aparecimento de resíduos em carne e miúdos de frango, e a quantidade deste resíduo permitida depende de estudos complexos. Na prática, são estabelecidos os limites de tolerância, limite de segurança ou limite máximo de resíduo (LMR) para determinada substância em uma determinada matriz biológica, e estes são harmonizados internacionalmente ou criados pelo próprio país através de estudos de depleção do fármaco a fim de garantir a segurança do alimento. O LMR de um princípio ativo equivale a concentração máxima de resíduos decorrente da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou µg/kg de peso fresco) que pode ser aceito no alimento sem representar risco à saúde humana (CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

Dentre os órgãos internacionais que regulamentam sobre resíduos de medicamentos veterinários destacam, nos EUA à *Food and Drug Administration* (FDA), na União Européia à *European Medicines Agency* (EMA) e o *The Japan Food Research Foundation*, no Japão. Em âmbito nacional, cabe ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) a autorização e normatização do uso de medicamentos veterinários, assim como a fixação do LMR e o monitoramento de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes ambientais. A inspeção e fiscalização das cadeias produtivas de alimentos de origem animal são realizadas através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC - Animal). O plano foi instituído pela Portaria Ministerial n° 51, de 06 de maio de 1986 (BRASIL, 2014a) e alterado pela Instrução Normativa SDA N° 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 2014c).

Um dos objetivos do PNCR é realizar ações que visam à melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal disponibilizado a população, e proporcionar ao Brasil condições de se adequar as regras do

comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares: Organização das Nações Unidas para Agricultura e a Alimentação (FAO), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2014c).

Além disso, cabe ressaltar que os EUA, a União Européia, o Japão e o Brasil são membros do *Codex Alimentarius*, que é um programa das Nações Unidas sobre a harmonização de normas alimentares. A comissão do *Codex Alimentarius* foi estabelecida pela FAO e pela OMS em 1963 e tem como premissas, elaborar normas, diretrizes e códigos de práticas alimentares internacionais destinadas a proteger a saúde dos consumidores e assegurar a prática equitativa de mercado. Também promove a coordenação de todos os trabalhos sobre as normas alimentares realizados pelas organizações governamentais ou não (CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

Para a consecução de seus objetivos, a comissão do *Codex Alimentarius* se agrupa em algumas áreas e empregam diversos comitês, um para cada uma das suas funções, como é o caso dos Comitês de contaminantes de alimentos, resíduos de pesticidas, metodologias de análise e amostragem, dentre outros (CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

O comitê que trata especificamente dos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é conhecido como *Codex Committee on Veterinary Drug Residues* (CCVDR), o qual é assessorado pela *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA). O JECFA é composto por um grupo de especialistas que tem a atribuição de analisar a documentação científica existente a respeito dos medicamentos de uso veterinário e sugerir o LMR para os resíduos desses medicamentos e/ou metabólitos. Essa sugestão é analisada pelos membros de CCVDR, porém cabe a Comissão do *Codex Alimentarius* a fixação ou não do LMR proposto como padrão de referência internacional (PALERMO-NETO, 2005; CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

Segundo Palermo-Neto (2005), o LMR é determinado após análise toxicológica e farmacocinética da substância em questão, visando conhecer o possível risco que ela pode representar para a saúde humana. Os estudos toxicológicos de resíduos de medicamentos tem como base a determinação da ingesta diária aceitável (IDA), que se resume como a quantidade máxima aceitável que a espécie animal pode receber sem causar nenhum tipo de

manifestação toxicológica. Esta se obtém através de testes com animais de laboratório, onde se administra o medicamento com alimento por longos períodos e a partir daí determina o nível de dose sem efeito (NOEL) e a IDA. Esses dados são extrapolados (fator de segurança) para o homem e normalmente utiliza-se um valor 100 vezes superior, porém às vezes pode ser menor ou chegar até 1000 vezes do encontrado para os animais de laboratório, determinando dessa forma a IDA para os seres humanos. A partir disso, o LMR é considerado o nível máximo de resíduo que se pode ter em um determinado alimento para que o homem possa consumir de forma normal e abundante, sem superar a IDA para a droga em questão (ERRECALDE, 2015).

É importante destacar que nem todos os compostos químicos aos quais os animais ficam expostos deixam resíduos maléficos à saúde humana e animal. Mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição quando ultrapassam o valor de LMR que o alimento pode conter sem prejuízo a integridade de seres humanos e animais (BRASIL, 2014c). Visando a disponibilidade de alimentos mais seguros e de qualidade, busca-se determinar o período de carência/período de retirada dos medicamentos veterinários. Este corresponde ao intervalo de tempo, em horas ou dias, necessário para que as quantidades de resíduos e metabólitos de uma substância sejam inferiores ao LMR fixado para este princípio ativo no alimento (PALERMO-NETO, 2005).

Um fator determinante para a participação de indústrias produtoras de carne de frango no mercado internacional é a produção de alimentos seguros, destacando os aspectos relacionados à presença de resíduos de medicamentos e também à presença de patógenos no produto final. Dessa forma, o desenvolvimento de formas de controle e prevenção de contaminação no decorrer da cadeia produtiva é fundamental, tanto no âmbito nacional quanto nas exportações. Esse elevado controle sanitário é crucial para o futuro da avicultura brasileira (FRANÇA, 2007).

Em particular, os valores de LMR para a gentamicina em aves não foram determinados pelo *Codex Alimentarius* e pela EMA, porém de acordo com o FDA e com o The Japan Food Research Foundation os valores de LMR da gentamicina em frangos de corte são de 100 µg/kg para as matrizes rim,

músculo, fígado e gordura/pele (FDA, 2013; THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2013).

Segundo os resultados do Programa Nacional de Resíduos dos serviços de inspeção da segurança alimentar do USDA para o ano 2000, a classe dos aminoglicosídeos foi a mais detectada em alimentos de origem animal (GEHRING et al., 2005). Já no Brasil, o PNCR analisou no ano de 2013 cerca de 490 amostras de carne de aves, e destas, nenhuma foi considerada não conforme quanto à detecção de antimicrobianos, sendo um deles a gentamicina (BRASIL, 2014b).

A gentamicina é um complexo aminoglicosídeo composto de quatro componentes principais designados C1, C1a, C2 e C2a (EMEA, 2015b; RIVIERE; SPOO, 2003). É um agente pobremente absorvido no trato gastrointestinal, geralmente excretado via sistema renal (GEHRING et al., 2005) e por isto grandes concentrações deste composto depositam-se nos rins, levando ao aumento na carência nos tecidos. Gehring et al. (2005) observaram que os aminoglicosídeos persistem nos rins, apesar de desaparecerem relativamente rápido do plasma e outros tecidos comestíveis. Segundo os mesmos autores, estudos farmacocinéticos e de resíduos indicam a presença de resíduos em altas concentrações nos rins, principalmente no córtex renal.

Estudos relataram que o período de carência da gentamicina injetável nos tecidos varia em torno de cinco semanas para frangos (FDA, 2014; GEHRING et al., 2005; LÓPEZ; OLVERA, 2008; AGUNOS; LEGER; CARSON, 2012) e nove semanas para perus (FDA, 2014; GEHRING et al., 2005; LÓPEZ; OLVERA, 2008; SHEM TOV et al., 2003). Já Abo-EL-Sooud et al. (2012), verificaram que a gentamicina quando administrada pela via IM na dose de cinco mg/kg, em frangos, a mesma foi eliminada muito rapidamente e dentro de 48 horas apenas o rim apresentava presença de resíduo deste antimicrobiano, porém as quantidades eram inferiores ao LMR. Neste mesmo estudo, as maiores concentrações foram encontradas nas matrizes rim e fígado ao longo do estudo. WHO (2014a) verificou concentrações teciduais de gentamicina aos sete dias após a administração de 0,2 mg via SC em pintinhos. As maiores concentrações foram quantificadas no rim, fígado e pele/gordura, com 3,3 mg/kg, 1,1 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente, após sete dias do tratamento.

Já com relação ao músculo as concentrações ficaram abaixo do limite de quantificação de 0,16 mg/kg.

Apesar disso, Palermo-Neto (2005) afirma que a farmacocinética de um medicamento varia na dependência do veículo, forma farmacêutica, dose, via de administração, assim como da espécie animal indicada. De outro modo, é preciso compreender que embora os LMRs de um mesmo princípio ativo sejam sempre iguais, o período de carência para eles pode mudar. Levando isto em conta, dados de depleção de resíduos em animais tratados com gentamicina *in ovo* ainda são muito incipientes, quando comparados com as informações de carência deste mesmo princípio ativo administrado pelas vias parenterais nos primeiros dias de vida dos pintinhos.

A grande preocupação com a segurança dos alimentos, associada com a necessidade de disponibilização de produtos de uso veterinário seguros para os animais e para o consumidor de alimentos de origem animal tornam imprescindíveis as avaliações quanto à segurança da administração destes nos animais e seu impacto na geração dos alimentos, por meio da permanência de resíduos destes medicamentos nos animais. Em congruência, este estudo tem a finalidade de avaliar a segurança clínica da gentamicina, quando administrada *in ovo* juntamente com a vacina contra a doença de *Marek* e seus efeitos residuais nos tecidos.

## REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 22000: sistemas de gestão da segurança de alimentos – requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos**. Rio de Janeiro, 2006.

ABO-EL-SOUD, K.; SWIELIM, G. A. KHALIFA, E. F.; EL-GAMMAL, S. M. Effect of different sites of intramuscular injection on elimination, bioavailability and tissue residues profile of gentamicin in broiler chickens. **Insight Poultry Research**, v. 2, p. 1-7, 2012.

ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, supl., p. 1-14, 2011.

ABU-BASHA, E. A.; AL-SHUNNAQ, A. F.; GEHRING, R. Pharmacokinetics of gentamicin C1, C1a, C2 and C2a in broiler chickens after IV, IM, SC and oral administration. **Journal Bioequivalence Bioavailability**, Auckland, v. 5, n. 3, p. 129-135; 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/jbb.1000147>>.

AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 53, p. 1289–1300, 2012.

ANDREATTI FILHO, R. L.; PATRÍCIO, I. S. Biosseguridade da granja de frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. cap. 11, p. 169-177.

ASHARAF, M.; ARIF, Q.; KHAN, K. A. Efficacy of gentamicin after intrayolk administration in experimentally induced omphalitis in broiler chicks. **The Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 22, n. 4, p. 197-198, 2002.

BAILEY, J. S.; LINE, E. *In ovo* gentamicin and mucosal starter culture to control *Salmonella* in broiler production. **The Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, v. 10, p. 376–379, 2001.

BARNES, H. J.; GROSS, W. B.; VALLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11<sup>th</sup>. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 270-278.

BICKFORD, S. M.; LOY, J. I.; BARNES, L. E. Gentamicin concentrations in turkey eggs and in tissues of progeny following egg dipping. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 17, n. 2, p. 301-307, 1973.

BIFFI, C. P. **Perfil fenotípico e genotípico de isolados de Salmonella Enteritidis e Salmonella Typhimurium de origem avícola frente aos antimicrobianos ceftiofur, gentamicina e enrofloxacina**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986**: Plano Nacional de Controle de Resíduos em produto de origem animal – PNCR. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 04 ago. 2014a.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria SDA Nº 60, de 07 de maio de 2014**: publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em carnes (bovina, suína, de aves, de avestruz e equina), em leite, ovos, mel e pescado. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2014b.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 42, de 20 de julho de 1999**: Alterar o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2014c.

BROWN, S. A.; RIVIERE, J. E. Comparative pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 1-35, 199. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.1991.tb00801.x>>.

CALDEIRA, L. G. M. **Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial**. 2012. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

CATELLI, L.; SILVA, A.; REZENDE, M. L. G.; COUTINHO, A. P. B.; CASSOL, D. M. S. Avaliação *in vitro* da associação de gentamicina injetável ao diluente da vacina de *Marek*. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2014, Atibaia. **Anais...** Atibaia, 2014. 1 CD-ROM.

CHAMBERS, H. F.; SANDE M. A.; Fármacos antimicrobianos: os aminoglicosídeos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. cap. 46, p. 812-825.

CODEX ALIMENTARIUS. **Procedure manual**. Rome, 2014. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual\\_22e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_22e.pdf)>. Acesso em: 09 ago. 2014.

COMTE, S. The global evolution of new technology vaccines usage at hatchery. In: NEW TECHNOLOGY VACCINE SYMPOSIUM, 2013, Miami. Disponível em: <<http://www.vectormune.com/Educational-Symposia/New-Technology-Vaccine-Symposium-2013-Miami>>. Acesso em: 25 maio 2013.

DOWLING, P. M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2010. cap. 13, p. 213-237.

EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R.; CASAS, I. A.; DOBROGOSZ, W. J. Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 179-196, 1997.

EIDSON, C. S.; PAGE, R. K.; KLEVEN, S. H. *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of gentamicin sulfate on the efficacy of turkey herpes virus vaccine. **Poultry Science**, Champaign, v. 57, n. 6, 1519-1525, 1978.

EMA. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products. **MRL/003/95 – gentamicin**. 1995. (Summary Report, 1). Disponível em:

<[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014342.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014342.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2015a.

EMA. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products. **MRL/803/01-FINAL – gentamicin**. 2001. (Summary Report, 3). Disponível em:

<[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014350.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014350.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2015b.

ERRECALDE, J. O. **Uso de antimicrobianos em animais de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública**. Roma: FAO, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Codex Alimentarius Commission. **Recommended international code of practice for control of the use of veterinary drugs [CAC/RCP 38, 1993]**. Geneva, 1993.

FDA. Food and Drug Administration. 2012. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**– food and drugs. chap. 1 – Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=556&showFR=1&subpartNode=21:6.0.1.1.17.2>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

FDA. Food and Drug Administration. **ANADA 200 147: gentamicin sulfate injection - original approval**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm118319.htm>>. Acesso em: 16 set. 2014.

FIKES, J. D.; RENDER, A.; REED, W. M.; BURSIA, S.; POPPENG, R. H.; SLEIGHT, S. D.; YOSHIOKA, T. Distribution of gentamicin to the cochlea of the chicken embryo. **Toxicology Pathology**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 15-22, 1994.

FIORENTIN, L.; NASCIMENTO, E. R. do; BALEN, L.; NASCIMENTO, M. G. F. do; AVILA, V. S. de; SCHMIDT, G. S. **Erradicação de micoplasmas: a experiência da EMBRAPA**. Concórdia: EMBRAPA CNPSA, 1992. 18 p. (Circular Técnica, 15).

FRANÇA, J. M. A competitividade da avicultura de corte e a certificação de qualidade para o mercado externo. **Avicultura Industrial**, Porto Feliz, v. 1152, n.1, p. 20-25, 2007.

GEHRING, R.; HASKELL, S. R.; PAYNE, M. A.; CRAIGMILL, A. L.; WEBB, A. I.; RIVIERE, J. E. Aminoglycoside residues in food of animal origin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 227, n. 1, p. 63-66, 2005.

GILSTRAP, L. C.; BAWDON, R. E.; BURRIS, J. Antibiotic concentration in maternal blood, cord blood and placental membranes in chorio amnionitis. **Obstetrics & Gynecology**, New York, v. 72, n. 1, p. 124-125, 1988.

GONZALES, E.; SALDANHA, E. S. P. B. Os primeiros dias de vida do frango e a produtividade futura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2001, Goiânia. **Anais...Goiânia: ASEG/ABZ**, 2001. p. 1259-1265.

GORE, A. B.; QURESHI, M. A. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 984-991, 1997.

GRINGAUZ, A. Antimicrobial drugs. In: \_\_\_\_\_. **Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why**. While-VCH, 1997. cap. 6, p. 247-255.

HENRY, M. H.; BURKE, W. H. The effects of *in ovo* administration of testosterone or an anti androgen on growth of chicks embryos and embryonic muscle characteristics. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 7, p. 1006-1013, 1999.

HOFACRE, C. L. Uso de antimicrobianos em aves domésticas. In: GIGUÉRE, S. PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2010. cap. 35, p. 591-602.

HOUESHELL, J. W.; LAMENDOLA, J. F.; Mc-CRACKEN, J. S. Clinical pharmacology of aminoglycosides. **Modern Veterinary Practice**, Santa Bárbara, v. 63, p. 619-621, 1982.

HOUGHTON, H. **Disease prevention in the chick embryo and young chick**. Nuffield farming scholarships Trust Report sponsored by the BEMB (R & E) Trust. 2011. Disponível em: <<http://www.thepoultrysite.com/articles/2214/disease-prevention-crucial-for-embryos-and-young-chicks>>. Acesso em: 15 set. 2014.

ISLAM, N. U.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; KHAN, A.; BHATTI, S. A.; YOUSAF, M.; UL-HASSAN, Z. Clinicopathological studies on gentamicin toxicity in White Leghorn commercial layers. **The Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 31, n. 4, p. 305-308, 2011.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos na avicultura. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Editora Roca, 2005. cap. 8, p. 115-147.

JAVED, U.; SALEEMI, M. K.; KHAN, A.; JAVED, I. Pathological effects of gentamicin in growing broilers. In: CONGRESS OF FAVA, 15., 2008, Bangkok, Thailand. **Proceedings...**

JAVED, U.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; KHAN, A.; JAVED, I. RAFIQUE, S. Toxicopathological effects of parenteral administration of gentamicin in growing broilers. **Journal of Agricultural and Biological Science**, Islamabad, v. 15, n. 3, 2013.

KAUFFMAN, R. E; MORRIS, J. A; AZARNOFF, D. L. Placental transfer and fetal urinary excretion of gentamicin during constant rate maternal infusion. **Pediatric Research**, v. 9, p. 104-107, 1975.

KHAN, K. A.; KHAN, M. Z.; HAMID, S.; ASLAM, A.; RABBANI, M. A study on the pathogenesis of yolk retention in broiler chicks. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 22, n. 4, 175-180, 2002.

KHAN, I.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; JAVED, I.; KHAN, A. Pathological and biochemical effects of intramuscular gentamicin administration in chickens. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 32, n. 5, p. 345-351, 2008.

KHARDORI, N. Antibiotics: past, present, and future. **The Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 90, n. 6, p. 1049-1076, 2006.

KINNEY, N.; ROBLES, A. The effect of mixing antibiotics with *Marek's* disease vaccine. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 43., 1994, Sacramento. **Proceedings...** p. 96-97.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S. C. de; GONZALES, E.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H.; ANDRADDE, M. A. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados: desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella enteritidis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 7, p. 1509-1516, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000700017>>.

LEITÃO, A. R.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; ANDRADE, M. A. Inoculação de maltose, sacarose ou glicose em ovos embrionados de baixo peso. **Acta Scientiarum: animal sciences**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 93-100, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i1.5910>>.

LÓPEZ, H. S.; OLVERA, L. G. Aminoglicósidos. In.: SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L. **Farmacología clínica em aves**. 3. ed. México: Avimex Salud Animal, 2008. p. 134-139.

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; HENÁNDEZ-LÓPEZ, F. J.; NOVOA-LÓPEZ J. M. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 223, n. 1, p. 86-98, 2007.

McCAPES, R. H.; YAMAMOTO, R.; ORTMAYER, H. B.; SCOTT, W. F. Injecting antibiotics into turkey hatching eggs to eliminate *Mycoplasma meleagridis* infection. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 19, n. 3, p. 506-514, 1975.

McCAPES, R. H.; YAMAMOTO, R.; GHAZIKHANIAN, G.; DUNGAN, W. M.; ORTMAYER, H. B. Antibiotic egg injection to eliminate disease I. Effect of injection methods on turkey hatchability and mycoplasma meleagridis infection. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 21, n. 1, p. 57-68, 1977.

McREYNOLDS, J. L.; CADWELL, D. Y.; BARNHART, E. T.; DELOACH, J. R.; McELROY, A. P.; MOORE, R. W.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J. The effect of in ovo or day-of-hatch subcutaneous antibiotic administration on competitive exclusion culture (PREEMPT®) establishment in neonatal chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 1524–1530, 2000.

MENDES, A. A.; SALDANHA, R. S. P. B. S. A cadeia produtiva da carne de aves do Brasil. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. de A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004, cap. 1, p. 1-22.

NASCIMENTO, E. R.; do NASCIMENTO, M. da G. F.; dos SANTOS, M. W.; DIAS, P. G. de O.; RESENDE, O. de O.; SILVA, R. de C. F. Eradication of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* from a chicken flock by antimicrobial injections in eggs and chicks. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 33 n. 2, p. 119-124, 2005.

NITSAN, Z. The development of digestive tract in post hatched chicks. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 10., 1995, Antalya, Turkey. **Proceedings...** p. 21-28.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidades dos aminoglicosídeos. **The Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

PALERMO-NETO, J. Resíduos de Medicamentos Veterinários em Carne de Frango e Ovos. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**: boas práticas no manejo de medicamentos. São Paulo: Roca, 2005. p. 287-301.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.

PATRICK, G. L. Antibacterial agents which impair protein synth. In: PATRICK, G. L. **Introduction to medicinal chemistry**. New York: Oxford University Press, 2005. cap. 10.

PHELPS, P. V.; EDENS, F. W.; FREDERICKSEN, T. L.; GILDERSLEEVE, R. P.; THAXTON, J. P. Effects of *in ovo* antibiotic administration on hatchability and performance of turkey poults. **Poultry Science**, Champaign, v. 68, suppl., p. 198, 1989.

RICKS, C. A. *In ovo* vaccination technology. **Advances in Veterinary Medicine**, San Diego, v. 41, p. 495–515, 1999.

RIVIERE, J. E.; SPOO, J. W. Antimicrobianos aminoglicosídeos. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 43, p. 703-725.

SAIF, Y. M.; SHELLY, S. M. S. Effect of gentamicin sulfate dip on salmonella organisms in experimentally infected turkey eggs. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 17, n. 3, p. 574-581, 1973.

SALEEMI, M. K.; KHAN, M. Z.; JAVED, I.; KHAN, A. Pathological effects of gentamicin administered intramuscularly to day-old broiler chicks. **Experimental and Toxicologic Pathology**, London, v. 61, n. 5, p. 425-432, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2008.10.006>>.

SALEEMI, M. K.; KHAN, M. Z.; KHAN, A.; ISLAM, N. U.; HASSAN, Z. U.; ABBASS, R. Z. Pathological investigations of gentamicin toxicity in commercial layers. In: MEDITERRANEAN POULTRY SUMMIT, 3.; INTERNATIONAL POULTRY CONFERENCE, 6., 2012, Alexandria.

SHARMA, J. M. Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with *Marek's* disease vaccine. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 29, p. 1155-1169, 1985.

SHARMA, J. M. Delayed replication of *Marek's* disease virus following in ovo inoculation during late stages of emryo development. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 31, p. 570-576, 1987.

SHARMA, J. M., BURMESTER, B. R. Resistance to *Marek's* disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Diseases**, v. 26, p. 134-149, 1982.

SHARMA, J. M., WITTER, R.L. Embryo vaccination against *Marek's* disease with serotypes 1, 2 and 3 vaccines administered singly or in combination. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 27, p. 453-463, 1983.

SHEM-TOV, M.; GABOR, N.; SUTH, M.; KORMOCZY, P. Depletion of gentamicin and its major components from various tissues of turkeys. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 6, p. 1234-36, 2003.

SIDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Compêndio de produtos veterinários**. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>>. Acesso em: 13 set. 2014.

SINGROHA, R.; SRIVASTAVA, S. K.; CHHIKARA, P. Effect of gentamicin on kidney in developing chicks. **European Journal of Anatomy**, Salamanca, v. 16, n. 2, p. 119-126, 2012.

SINGROHA, R.; SRIVASTAVA, S. K.; CHHIKARA, P. Effect of gentamicin on proximal convoluted tubules of kidney indeveloping chicks. **Journal of the Anatomical Society of India**, Chandigarh, v. 62, p. 17-22, 2013.

SPINOSA, H. S. Antimicrobianos: aminoglicosídeos, polimixinas, bacitracina e vancomicina. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 38, p. 416-419.

TAVAKKOLI, H.; DERAKHSHANFAR, A.; GOOSHKI, S. N. The effect of florfenicol egg-injection on embryonated chicken egg. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, Iran, v. 2, n. 2, p. 496-503, 2014.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G. C.; Incubation Physiology. In.: WHITTOW, G. C. **Sturkie's avian physiology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 24; p. 617-634.

THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Maximum Residue Limits (MRLs) of Agricultural Chemicals in Foods**. Disponível em: <[http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a\\_inq=23800](http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=23800)>. Acesso em: 10 mar. 2013.

TINÔCO, I. F. F. Avicultura industrial: novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 1, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2001000100001>>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2014**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: 24 maio 2014.

UNI, Z.; FERKET, R. P. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, Wallingford, v. 60, p. 103-113, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/WPS20038>>.

UNI, Z.; FERKET, P. R.; TAKO, E.; KEDAR, O. *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 764-770, 2005.

VERNIMB, G. D.; BACHMANN, H; PANIT. E. Effect of gentamicin on early mortality and later performance of broiler and leghorn chickens. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 20, n. 4, p. 706-713, 1973.

VILLALOBOS, T. Tecnologia "in ovo" impulsionando a modernização dos centros de incubação. **World Poultry**, Doetinchen, v. 28, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/revista/pdfs/Sup.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

WAKENELL, P. S.; BRYAN, T.; AVAKIAN, A.; WILLIAMS, C.; WHITFILL, C. Effect of *In Ovo* Vaccine Delivery Route on Herpes Virus of Turkey/SB-1 Efficacy and Viraemia. **Avian Disease**, St. Paul, v. 46, n. 2, p. 274-280, 2002.

WHO. World Health Organization. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. In: REPORT OF THE JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 43., 1995, Geneva. (WHO Technical Report Series, 855). Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41725/1/WHO\\_TRS\\_855.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41725/1/WHO_TRS_855.pdf?ua=1)>. Acesso em: 09 ago. 2014a.

WHO. World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: gentamicin (addendum)**. In: THE MEETING OF THE JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 50., 1998, Geneva. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je05.htm>>. Acesso em: 09 ago. 2014b.

WILLIAMS, C. J. Fisiologia embrionária. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, 3., 2001, Chapecó, SC. **Anais...** p. 13-22.

WILLIAMS, C. J. *In ovo* vaccination for disease prevention. **International Poultry Production**, Driffild, v. 15, p. 7–9, 2007.

WILLIAMS, C. J., ZEDEK, A. S. Comparative field evaluations of *in ovo* applied technology. **Poultry Science**, Champaign, v.89, n. 1, p. 189–193, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2009-00093>>.

YODER JUNIOR, E. W. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B. W. **Diseases of poultry**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 197-198.

YOSHIOKA, H.; MONMA, T.; MATSUDA, S. Placental transfer of gentamicin. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 80, n. 1, p. 121-123, 1972. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(72\)80470-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(72)80470-0)>.

## **CAPÍTULO 2 – Avaliação da gentamicina aplicada em ovos de aves reprodutoras pesadas e seu efeito até os 21 dias de idade**

**RESUMO** – A preocupação da indústria avícola em manter os altos índices de produtividade fez com que surgissem ações preventivas, tais como à vacinação *in ovo* associada aos antimicrobianos. Este trabalho objetivou avaliar a inocuidade da gentamicina quando aplicada em ovos de aves reprodutoras pesadas. Foram utilizados 200 ovos oriundos de matrizes da linhagem comercial Cobb, onde aos 18 dias de incubação 100 ovos receberam apenas a vacina contra a doença de *Marek* (Grupo Controle - GC) e os outros 100 receberam a vacina juntamente com 0,22 mg/ovo de sulfato de gentamicina (Grupo Tratado - GT). Após o nascimento, os pintinhos foram alojados em galpão de alvenaria e receberam durante todo o estudo ração isenta de quimioterápicos e água *ad libitum*. De acordo com a data de nascimento (D0), foram realizados exames físicos nos momentos D0, D+3, D+6, D+10, D+14 e D+21 dias após nascimento, assim como exames complementares em D+6, D+10, D+14 e D+21. Os parâmetros físicos compreenderam pesagem, avaliação da condição corpórea, comportamento, postura/marcha, respiração, apetite, excretas, penas e pele, presença e/ou ausência de ataxia, depressão, excitação, convulsões, dispnéias, tremores de cabeça e hiperestesia. Quanto aos parâmetros laboratoriais, determinou-se contagem total de hemácias, concentração de hemoglobina, porcentagem de hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração hemoglobina corpuscular média, contagem total leucócitos, diferencial de leucócitos (heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos), e as provas bioquímicas séricas, como: ureia, ácido úrico, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), creatina quinase, albumina e proteínas plasmáticas totais. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do procedimento general Linear Models (GLM) do SAS, e teste de Tukey considerando o nível de significância de 5%. Em ambos os grupos, todas as aves se apresentaram saudáveis ao longo do estudo e nenhuma alteração condizente com intoxicação foi visualizada. O peso corporal médio aumentou ao longo dos momentos em ambos os grupos ( $p \leq 0,05$ ), entretanto, não diferiu estatisticamente entre estes. Para os parâmetros de eritrograma e leucograma, apesar das variações dentro do mesmo tratamento, não foram observadas diferenças significativas entre GC e GT. Em D+10, o grupo controle apresentou níveis de GGT acima dos encontrados pelo grupo tratado ( $p \leq 0,05$ ), entretanto, as concentrações médias encontradas em ambos os grupos permaneceram dentro dos limites fisiológicos para a espécie. Os valores de ALT diferiram significativamente em D+14, com valores em GC superiores aos do GT, no entanto o segundo permaneceu dentro da faixa de normalidade. Para os demais parâmetros bioquímicos, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Conclui-se que a administração de 0,22 mg/ovo de sulfato de gentamicina associada à vacina de *Marek*, não causou alterações físicas e clínicas significantes quando administrada em ovos de aves reprodutoras pesadas.

**Palavras-chave:** frangos de corte, gentamicina, ovos, segurança clínica

## Evaluation of gentamicin applied in eggs of broiler breeder hens and its effect up to 21 days of age

**ABSTRACT** – The concern of the poultry industry in maintaining high productivity has spurred preventive measures such as vaccination in egg associated antimicrobial drugs. This study evaluated the safety of gentamicin when applied *in ovo* of broiler breeder hens. 200 eggs from commercial Cobb strain were used, and after 18 days of incubation only 100 eggs received the vaccine against Marek's disease (Control Group - CG) and the other 100 received the vaccine together with 0.22 mg/egg gentamicin sulfate (Treated Group - GT). After birth, the chicks were housed in concrete shed concrete and throughout the study they were fed with no antimicrobials and water *ad libitum*. According to date of birth (D0), physical examinations were performed in moments D0, D+3, D+6, D+10, D+14 and D+21 days after birth, as well as laboratory tests on D+6, D+10, D+14 and D+21. Physical parameters included weighing, assessment of body condition, behavior, posture/gait, breathing, appetite, droppings, feathers and skin, presence and/or absence of ataxia, depression, excitement, convulsions, dyspnea, head tremor and hyperesthesia. As laboratory parameters, total count of red blood cells, hemoglobin, hematocrit percentage, average corpuscular volume, average corpuscular hemoglobin, average corpuscular hemoglobin concentration, the total leukocyte count, differential leukocyte (heterophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes and basophils), and serum biochemical tests, such as: urea, uric acid, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (GGT), creatine kinase, albumin and total plasma proteins. The results were statistically analyzed using the General Linear Models procedure (GLM) of SAS, and Tukey test considering the significance level of 5%. In both groups, all poultry showed to be healthy throughout the study and no consistent change with intoxication was seen. Average body weight increased over the time in both groups ( $p \leq 0.05$ ), however, it did not differ statistically between them. For the parameters of erythrocyte and leukocyte counts, despite variations within the same treatment, no significant differences between CG and TG were observed. On D+10, the control group had levels of GGT found above the treated group ( $p \leq 0.05$ ), however, the average concentrations found in both groups remained within physiological limits for the species. Values of ALT differed significantly in D+14, with values in GC higher than the GT, however the second remained within the normal range. For other biochemical parameters, no significant difference between groups was observed. It is concluded that administration of 0.22 mg / egg gentamicin sulfate associated with Marek's vaccine did not cause physical changes and clinical significant when given in broiler breeder hens eggs.

**Keywords:** broiler, gentamicin, eggs, clinical safety

## 1. INTRODUÇÃO

A comprovação dos benefícios do uso de antimicrobianos profiláticos na avicultura datam a década de 1940, e daí em diante, representam uma importante ferramenta farmacológica disponível para o crescimento deste segmento do agronegócio (LINZMEIER et al., 2009). Dentre eles, a gentamicina é amplamente utilizada na prevenção ou tratamento de infecções bacterianas tanto na medicina veterinária quanto na humana. Além disso, no âmbito veterinário, esse princípio ativo possui amplo espectro de atividade e inclui a maioria das bactérias isoladas de animais (PAPICH, 2009).

No Brasil, a gentamicina é autorizada para o uso terapêutico em medicina veterinária para as espécies bovinos, suínos, aves, cães, caprinos, ovinos, gatos e equinos (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011). Dentre as vias de administração mais frequentes são a intramuscular, subcutânea, intravenosa e via oral, apesar desta possuir baixa absorção (PAPICH, 2009; SPINOSA, 2002). Na avicultura industrial outra via bastante consolidada é a administração *in ovo* (McCAPES et al., 1975; McCAPES et al., 1977; EDENS et al., 1997; BAILEY; LINE, 2001; ITO et al., 2005; HOFACRE, 2010).

Os antibióticos injetados em ovos férteis durante o processo de incubação tem como objetivo eliminar patógenos e evitar a infecção do pintinho no momento do alojamento (BIFFI, 2012), todavia, os eventos adversos das drogas sempre foram uma grande preocupação para o uso por esta via de administração. Neste caso, apesar do uso já consagrado, ainda são escassas as informações disponíveis sobre a segurança clínica da gentamicina quando administrada *in ovo*.

Ademais, segundo a Instrução normativa 26 de 2009 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2014), todos produtos antimicrobianos de uso veterinário devem comprovar por meio de estudos a segurança clínica tanto nas espécies em que o produto é indicado quanto nas vias de administração.

Assim sendo, esse estudo tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos da gentamicina aos frangos de corte, por intermédio de exames físicos e laboratoriais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais experimentais**

O experimento foi conduzido em duas fases: A primeira caracterizada pelo tratamento *in ovo*, realizada no incubatório da granja São José, (Amparo/SP) e a segunda relacionada ao estudo de campo, etapa esta conduzida nas instalações do setor de criação de frangos do centro de pesquisas em animais do Brasil (CPABR - Amparo/SP). Todas as práticas realizadas com o uso de animais foram devidamente aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CPABR, sob protocolo n° 130.

Foram incubados 200 ovos, com peso médio de 54g, oriundos de aves reprodutoras pesadas da linhagem comercial Cobb, com idade entre 30 e 50 semanas.

Todos os animais incluídos no estudo foram identificados com anilhas plásticas numeradas. Estas foram trocadas periodicamente, conforme o crescimento das aves, mantendo-se sempre a mesma numeração.

### **2.2. Ambiente e manejo**

Os ovos férteis provenientes das granjas de aves reprodutoras pesadas foram transferidos ao incubatório da granja São José e passaram pelo processo de incubação, vacinação/tratamento, conforme fluxo padrão do estabelecimento, para posterior transferência aos nascedouros.

Os ovos provenientes das granjas de matrizes de frango de corte foram encaminhados a uma sala de pré-aquecimento da Granja São José com temperatura controlada na faixa 24 a 27 °C e umidade relativa 40-50%, de modo que todos os ovos atingissem a temperatura desejada para transferência à incubadora evitando o choque térmico.

Após passagem pelo aquecimento inicial os ovos foram transferidos para as incubadoras (CASP CM-120), com temperatura na faixa 35,5 a 37,8 °C e umidade de 50 a 60%, com o número de viragens padronizadas para 1 viragem/hora em ângulo de 45° e capacidade de ventilação de 13,5

m<sup>3</sup>/hora/1000 ovos, onde permaneceram até a transferência para os nascedouros.

Na transferência da incubadora para o nascedouro, os ovos passaram pelo processo de vacinação com a máquina automática Intelliject<sup>®</sup>. A bandeja contendo os ovos seguiu sobre a esteira e parou sob as agulhas da vacinadora automática. Ocorreu a perfuração da casca do ovo e em seguida a administração da solução vacinal. O orifício foi vedado e as bandejas com ovos vacinados seguiram pela esteira, onde foram sugados por ventosas e transferidos para as caixas de eclosão, para posterior transferência ao nascedouro.

Todos os animais permaneceram em bandejas distintas identificadas no mesmo nascedouro até o nascimento. Após o nascimento, os pintinhos foram sexados, através da observação das inserções das penas primárias e secundárias, e posteriormente encaminhados ao aviário experimental. Este aviário se trata de um galpão de alvenaria, telado e coberto com telhas de amianto, subdividido em boxes (3 m<sup>2</sup>) forrados com cama de maravalha (5 cm de altura).

As aves foram distribuídas nos boxes de acordo com o grupo experimental e balanceados por sexo, onde permaneceram durante todo o período de estudo. Neste período, receberam ração isenta de quimioterápicos específica para fase, formulada para atender às exigências nutricionais, segundo Rostagno et al. (2011) e água *ad libitum*. O conforto térmico das aves foi regulado com o auxílio de ventiladores/exaustores e campânulas a gás, além de toda a estrutura de forração presente no aviário.

## **2.3. Procedimento experimental**

### **2.3.1. Preparo da solução vacinal e formulação testada**

Adicionaram-se 100 mL da formulação contendo sulfato de gentamicina a 44 mg/mL (equivalente a formulação F069) a 900 mL do diluente da vacina de *Marek*. Transcorridos 20 minutos, tempo este necessário para estabilização da solução, fez-se a reconstituição de 04 ampolas da vacina de

*Marek* (Cryomarex<sup>®</sup> HVT) em 1.000 mL do diluente específico contendo o sulfato de gentamicina.

### 2.3.2. Grupos experimentais

Aos 18 dias de incubação, 100 ovos receberam apenas a vacina contra a doença de *Marek* (Grupo Controle - GC) e outros 100 ovos receberam a mesma vacina contendo também o sulfato de gentamicina (Grupo Tratado - GT).

Em ambos os grupos, administrou-se os respectivos tratamentos no líquido amniótico por meio de agulhas, na dosagem de 0,05 mL da solução/ovo fértil, com auxílio de sistema próprio para injeção *in ovo* (máquina vacinadora automática Intelliject<sup>®</sup>).

Desta forma, os animais do GC receberam apenas a vacina de *Marek* na dose de 0,05 mL/ovo e os pintinhos do GT receberam a vacina na mesma dosagem, associada ao sulfato de gentamicina na dose de 0,22 mg/ovo fértil. Dos 200 ovos vacinados, apenas 48 pintinhos foram incluídos por grupo de estudo, conforme descrito na Tabela 1. O tratamento de um número maior de ovos férteis levou em consideração a mortalidade de embriões ao longo do processo de incubação e o percentual de ovos claros incubados, bem como possível mortalidade das aves na fase de crescimento e o balanceamento dos grupos em função do sexo.

**Tabela 1.** Definição dos grupos experimentais do estudo para determinação da inocuidade da gentamicina quando aplicada *in ovo*.

Grupos	Tratamento	Dose	Nº de Animais Alojados
Controle (GC)	Vacina contra a doença de <i>Marek</i>	0,05 mL-	48
Tratado (GT)	Vacina contra a doença de <i>Marek</i> + Sulfato de gentamicina	0,05 mL + 0,22 mg/ovo	48

No aviário experimental, os animais foram alojados em boxes de forma que cada grupo de tratamento foi subdividido em 4 boxes, contendo 12 aves cada (VICH, 2008).

### **2.3.3. Peso corporal**

Todos os animais foram pesados individualmente (expresso em g) nos momentos D0 (dia do nascimento), D+3 (três dias após o nascimento), D+6 (seis dias após o nascimento), D+10 (10 dias após o nascimento), D+14 (14 dias após o nascimento) e D+21 (21 dias após o nascimento), para acompanhamento do crescimento das aves.

### **2.3.4. Exame físico dos animais**

O exame físico dos animais foi realizado através da inspeção geral de todas as aves nos momentos D0, D+3, D+6, D+10, D+14 e D+21 após o nascimento. Os parâmetros avaliados foram:

#### **Inspeção geral**

- Condição corpórea (1=bom; 2=regular; 3=ruim), comportamento (1=normal; 2=apático; 3=inquieto), postura/marcha (1=normal; 2=alterada), respiração (1=normal; 2=ofegante; 3=dispnéico), apetite (1=normal; 2=diminuído; 3=aumentado), excretas (as excretas foram avaliadas por boxe, uma vez que os animais ficaram no mesmo ambiente; 1=normal; 2=alterada), penas e pele [1=normal; 2=alterada (perda de penas, desidratação, penas eriçadas)].

#### **Sinais físicos de intoxicação**

- Ataxia, depressão, excitação, convulsões, dispnéia, tremores de cabeça e hiperestesia.

### **2.3.5. Exames laboratoriais**

Exames complementares tais como o hematológico e bioquímica sérica, foram realizados nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21 dias após o nascimento. A seleção das aves para colheita de sangue em cada um dos

momentos de avaliação foi realizada de forma aleatória, retirando-se 3 animais de cada boxe para compor um total de 12 aves por grupo de estudo (GT e GC).

Nos dias de colheitas previamente determinados, os animais foram contidos e realizada a colheita por punção cardíaca de uma amostra de sangue. Cada amostra foi dividida igualmente em dois tubos identificados, um contendo anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético - EDTA) para a realização do hemograma (eritrograma, leucograma e avaliação da morfologia celular) e o outro sem anticoagulante para a realização da bioquímica sérica.

As análises de eritrograma foram compostas por contagem total de hemácias (He,  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), porcentagem de hematócrito (Ht, %), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM, g/dL). E além disto, foram avaliadas as alterações quantitativas e/ou morfológicas da série leucocitária, que compreendeu a contagem total (LEU, células/ $\mu\text{L}$ ) e diferencial de leucócitos [heterófilos (HET, células/ $\mu\text{L}$ ), linfócitos (LINF, células/ $\mu\text{L}$ ), eosinófilos (EOS, células/ $\mu\text{L}$ ), monócitos (MONO, células/ $\mu\text{L}$ ) e basófilos (BAS, células/ $\mu\text{L}$ )].

As técnicas empregadas para determinação do hemograma seguiram as recomendações de Campbell (1995). Para determinação do hematócrito utilizou-se o método do micro-hematócrito. As contagens de hemácias e de leucócitos totais foram realizadas em hemocitômetro de *Neubauer*. Para determinar o teor de hemoglobina foi utilizado o método da cianometahemoglobina e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo através de leitura microscópica.

Além disso, as análises de bioquímica sérica foram compostas por ácido úrico (AcUr, mg/dL), ureia (UR, mg/dL), aspartato aminotransferase (AST, UI/L), gama glutamiltransferase (GGT, UI/L), alanina aminotransferase (ALT, UI/L), creatina quinase (CK, UI/L), proteínas plasmáticas totais (PPT, g/dL) e albumina (ALB, g/dL).

O teor de PPT foi determinado pelo método de refratometria descrito por Kaneko e Smith (1967) e as determinações séricas (AcUr, UR, AST, GGT, ALT, CK e ALB) foram realizadas utilizando Kit Labtest<sup>®</sup> e analisador bioquímico automático SBA-200<sup>®</sup> (Celm<sup>®</sup>).

### 2.3.6. Mortalidade

Foi registrada a mortalidade dos animais dos grupos controle e tratado durante todo o período experimental.

### 2.4. Análise estatística

Para a análise das variáveis hematológicas, bioquímicas e peso médio, o delineamento utilizado foi de parcelas subdivididas, testando o fator grupo (2 níveis) nas parcelas e o fator tempo (4 níveis) nas subparcelas, com 12 repetições por grupo. Os dados que não atenderam as premissas foram submetidos à transformação logarítmica [ $\text{Log}(X-1)$ ] e havendo diferença significativa entre médias, estas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Para tanto, foi utilizando o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Peso corporal médio

O peso corporal médio das aves aumentou ao longo do tempo em ambos os grupos, entretanto não diferiu estatisticamente no mesmo momento, quando comparados os resultados dos GC e GT (Tabela 2).

**Tabela 2.** Peso corporal médio (g) dos frangos nos momentos D0, D+3, D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

Grupo		Momentos (dias)					
		D0	D+3	D+6	D+10	D+14	D+21
Tratado (GT)	Média	34	57	73	146	248	502
	Desvio padrão	2,10	10,35	13,20	104,91	71,72	130,02
Controle (GC)	Média	33	60	76	143	237	434
	Desvio padrão	2,29	8,90	12,06	26,18	57,46	122,46

### 3.2. Exame físico

Durante o estudo, todas as aves foram examinadas e permaneceram fisicamente saudáveis. Desta forma foram classificadas com escore 1 (normal) para os dois tratamentos.

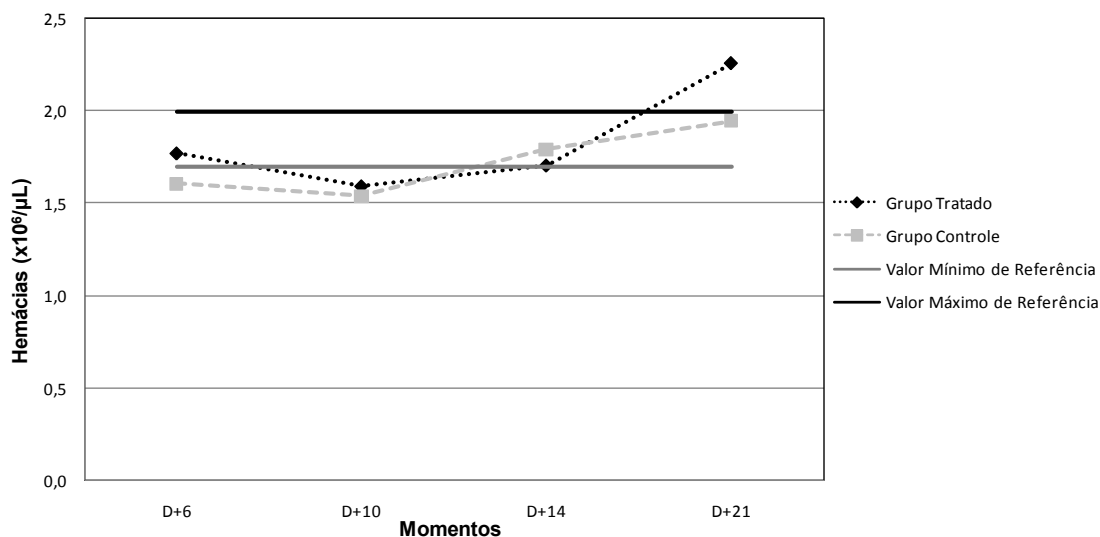
### 3.3. Hemograma

#### 3.3.1. Eritrograma

Em relação ao eritrograma, não houve efeito dos tratamentos em todos os parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ). Todavia, em algumas variáveis pode-se observar diferença significativa entre os momentos no mesmo grupo.

#### a. Contagem de hemácias

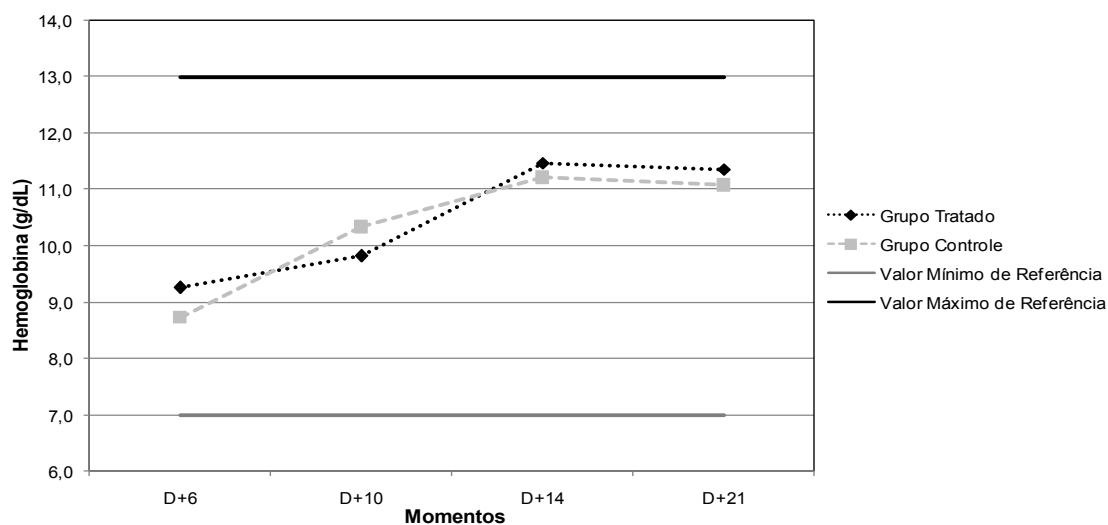
Para a contagem de hemácias, houve efeito significativo entre o último momento avaliado (D+21) em relação as demais avaliações do GT (D+6, D+10 e D+14). Já no GC, não houve efeito principal entre momentos (Tabela 3 e Figura 1).



**Figura 1.** Valores médios e intervalo de referência (BORSA, 2009) da contagem de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

## b. Hemoglobina

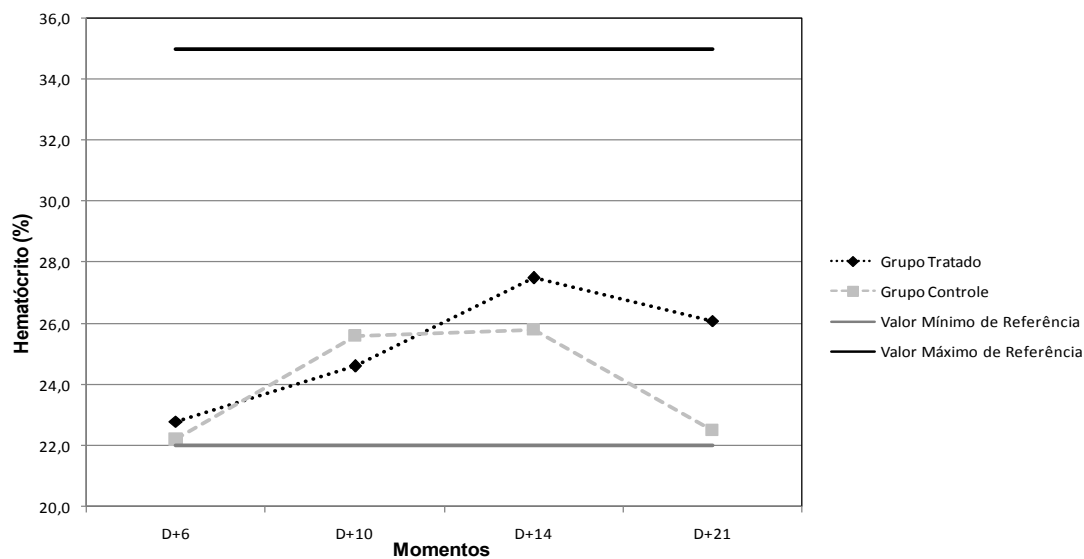
No parâmetro Hb, verificou-se um acréscimo nas quantificações ao longo dos momentos em ambos os grupos. No grupo controle, a diferença ( $p \leq 0,05$ ) foi entre os momentos D+6, quando comparado com D+14 e D+21. Já para o grupo tratado esta diferença ocorreu entre os momentos D+14 em relação aos dias de colheita D+6 e D+10, e também entre D+6 e D+21 (Tabela 3 e Figura 2).



**Figura 2.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) da hemoglobina (g/dL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

## c. Hematócrito

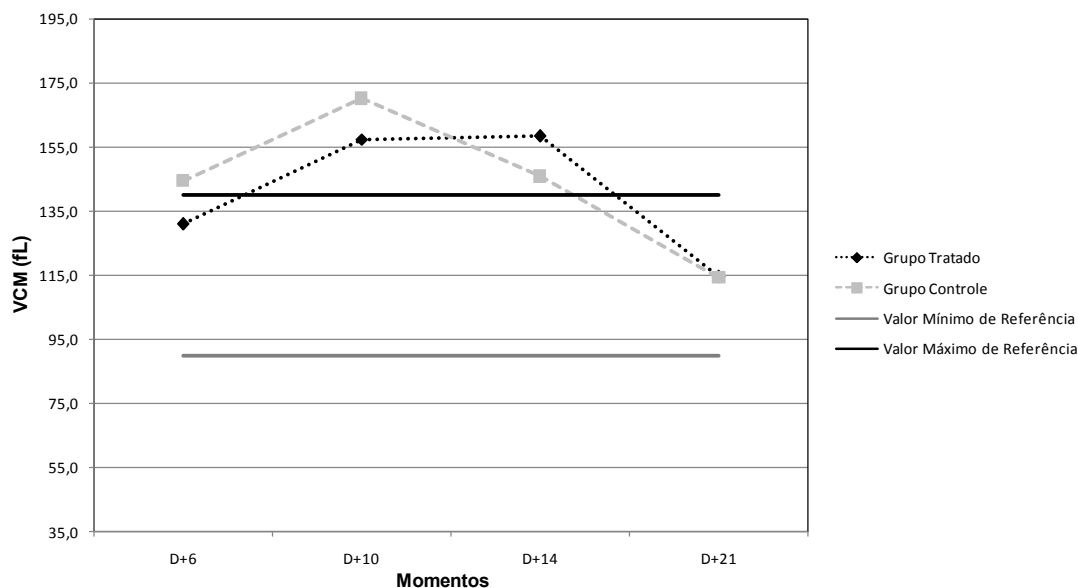
Os valores médios de hematócrito não diferiram estatisticamente entre tratamentos, assim como entre momentos do mesmo grupo (Tabela 3 e Figura 3).



**Figura 3.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) do hematócrito (%) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### d. Volume corpuscular médio

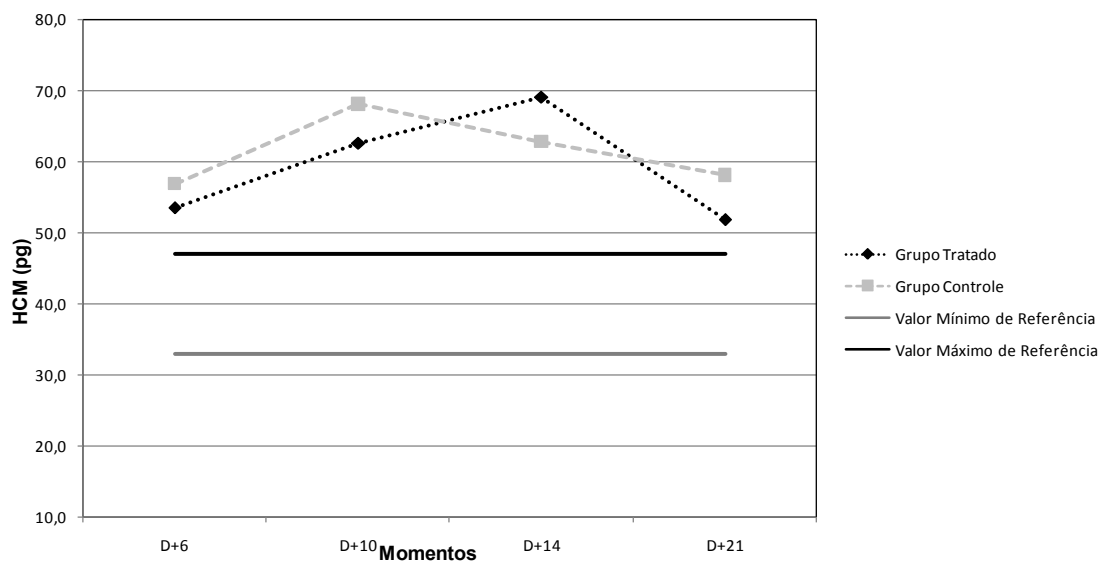
Para o parâmetro VCM, ao longo dos momentos do GC foi possível observar diminuição significativa entre o último dia de avaliação em relação aos demais momentos do estudo (D+6, D+10 e D+14). Entretanto, houve também aumento significativo em D+10 quando comparado ao D+6. Já para o grupo tratado, ocorreu uma elevação ( $p \leq 0,05$ ) entre os momentos D+10 e D+14, em relação aos momentos D+6 e D+21 (Tabela 3 e Figura 4).



**Figura 4.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) do volume corpuscular médio (fL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### e. Hemoglobina corpuscular média

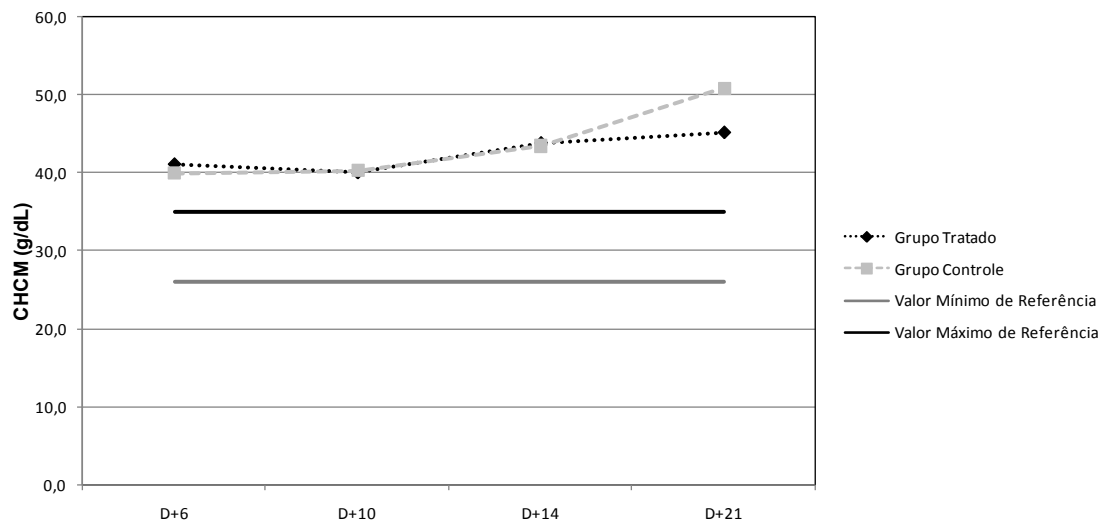
Quanto aos valores de hemoglobina corpuscular média, houve aumento significativo do valor médio de D+14 em relação aos momentos D+6 e D+21 no grupo tratado. Entre os momentos do grupo controle, não houve alteração significativa (Tabela 3 e Figura 5).



**Figura 5.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) da hemoglobina corpuscular média (pg) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

## f. Concentração da hemoglobina corpuscular média

Verificou-se aumento ( $p \leq 0,05$ ) no GC entre o momento D+21 quando comparado com D+6 e D+10. Já no GT, não houve efeito significativo entre os momentos do estudo (Tabela 3 e Figura 6).



**Figura 6.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) da concentração da hemoglobina corpuscular média (g/dL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

**Tabela 3.** Valores médios  $\pm$  desvios-padrão da contagem total de hemácias (He), concentração de hemoglobina (Hb), porcentagem de hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM), em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada a gentamicina (grupo tratado).

Parâmetro (unidade)	Intervalo de referência	Grupo	Momentos (dias)			
			D+6	D+10	D+14	D+21
He ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	1,69 – 2,03 (BORSA, 2009)	GC	1,61 $\pm$ 0,35	1,54 $\pm$ 0,24	1,80 $\pm$ 0,23	1,95 $\pm$ 0,47
		GT	1,77 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	1,60 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	1,71 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	2,26 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
Hb (g/dL)	7 – 13 (WAKENNELL, 2010)	GC	8,73 $\pm$ 1,38 <sup>b</sup>	10,33 $\pm$ 0,97 <sup>ab</sup>	11,21 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	11,08 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>
		GT	9,25 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	9,82 $\pm$ 1,45 <sup>bc</sup>	11,46 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	11,35 $\pm$ 0,84 <sup>ac</sup>
Ht (%)	22 – 35 (WAKENNELL, 2010)	GC	22,20 $\pm$ 3,18	25,60 $\pm$ 3,94	25,80 $\pm$ 3,55	22,50 $\pm$ 5,34
		GT	22,80 $\pm$ 2,86	24,60 $\pm$ 2,27	27,50 $\pm$ 4,20	26,10 $\pm$ 3,94
VCM (fL)	90 – 140 (WAKENNELL, 2010)	GC	144,51 $\pm$ 28,94 <sup>b</sup>	170,06 $\pm$ 24,90 <sup>a</sup>	145,78 $\pm$ 14,28 <sup>ab</sup>	114,29 $\pm$ 8,71 <sup>c</sup>
		GT	130,84 $\pm$ 17,78 <sup>b</sup>	157,28 $\pm$ 24,70 <sup>a</sup>	158,33 $\pm$ 20,72 <sup>a</sup>	114,38 $\pm$ 9,90 <sup>b</sup>
HCM (pg)	33 – 47 (WAKENNELL, 2010)	GC	56,85 $\pm$ 14,17	68,13 $\pm$ 9,43	62,86 $\pm$ 8,99	58,12 $\pm$ 9,73
		GT	53,60 $\pm$ 9,40 <sup>b</sup>	62,61 $\pm$ 12,11 <sup>ab</sup>	69,08 $\pm$ 13,17 <sup>a</sup>	51,88 $\pm$ 10,55 <sup>b</sup>
CHCM (g/dL)	26 – 35 (WAKENNELL, 2010)	GC	39,95 $\pm$ 10,96 <sup>b</sup>	40,33 $\pm$ 4,35 <sup>b</sup>	43,43 $\pm$ 7,42 <sup>ab</sup>	50,84 $\pm$ 7,29 <sup>a</sup>
		GT	41,13 $\pm$ 5,93	40,07 $\pm$ 6,88	43,79 $\pm$ 7,47	45,13 $\pm$ 6,29

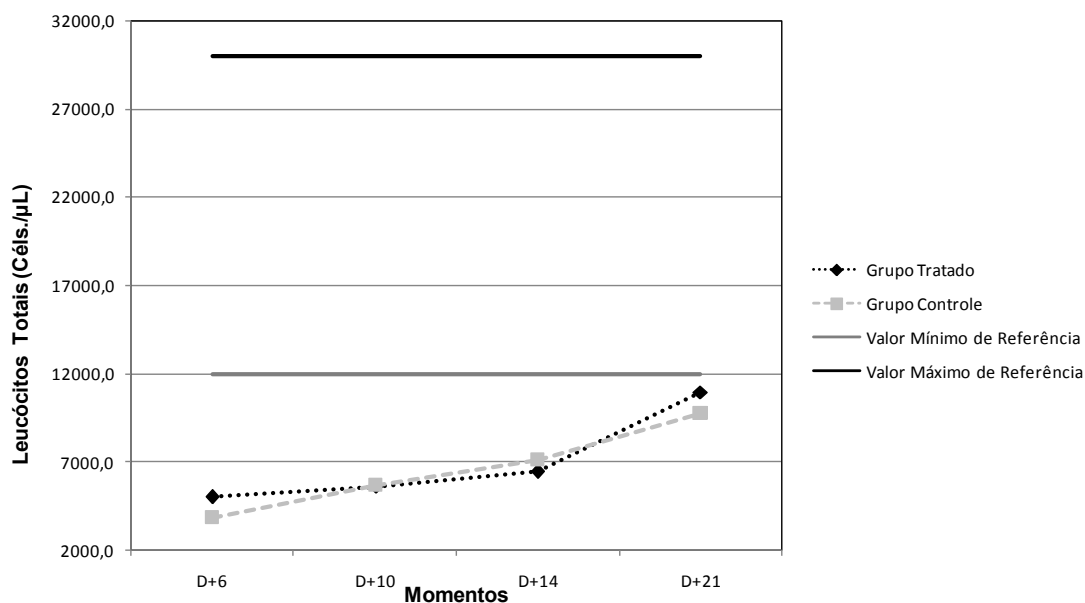
Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3.2. Leucograma

Em relação ao leucograma, os dados do presente estudo não demonstraram efeito dos tratamentos sobre a contagem total e diferencial de leucócitos.

#### a. Leucócitos totais

Para a contagem total de leucócitos ao longo dos momentos no grupo controle, houve acréscimo significativo no momento D+21 em relação aos momentos D+6 e D+10. Observou-se ainda valores maiores ( $p \leq 0,05$ ) de D+14 quando comparado com D+6 (Tabela 4 e Figura 7). Já para o grupo tratado, os valores médios do momento D+21 permaneceram superiores ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados aos momentos antecedentes (D+6, D+10 e D+14).

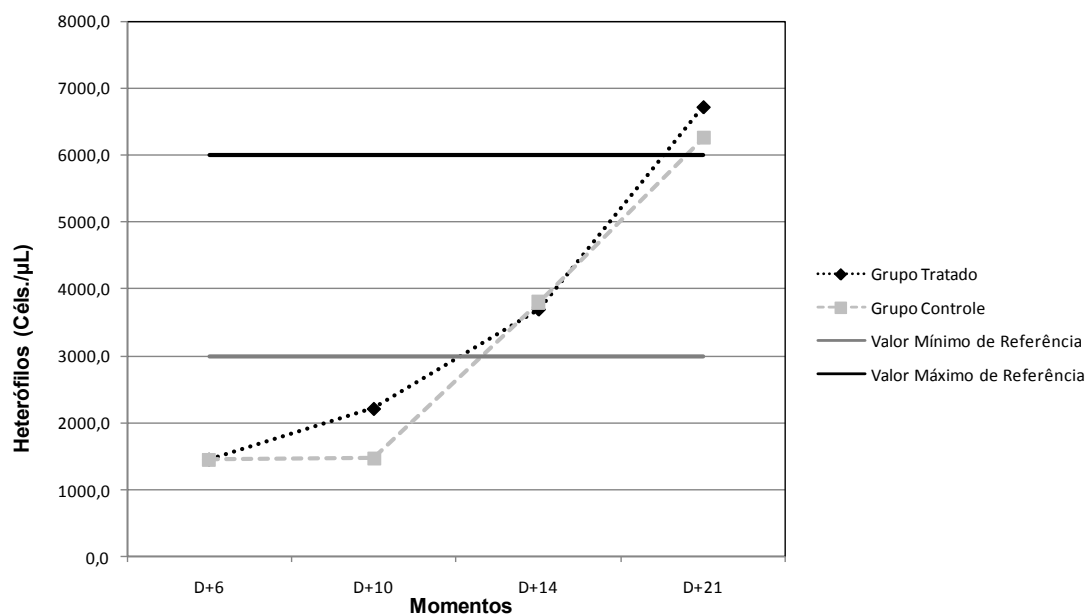


**Figura 7.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) dos leucócitos totais (células/ $\mu\text{L}$ ) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### b. Heterófilos

Já com relação aos resultados de heterófilos do GC, no momento D+6 os níveis médios apresentaram-se diminuídos ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos

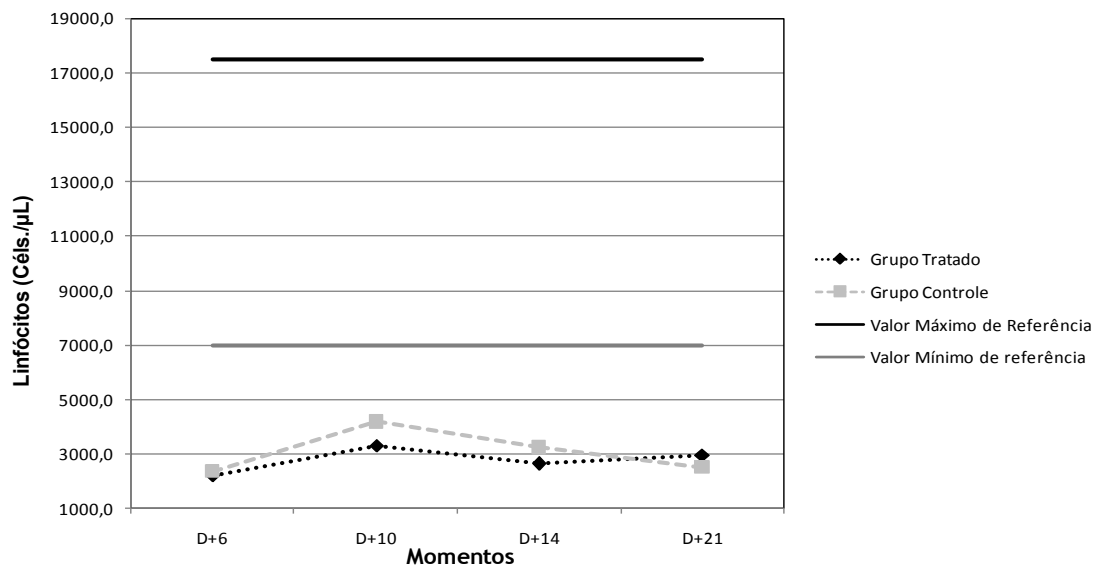
momentos D+14 e D+21. No mesmo grupo, o D+10 se manteve abaixo ( $p \leq 0,05$ ) dos dois últimos momentos avaliados. No GT, observou-se aumento significativo entre D+21 e os momentos D+6 e D+10 (Tabela 4 e Figura 8).



**Figura 8.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) dos heterófilos (células/ $\mu\text{L}$ ) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

### c. Linfócitos

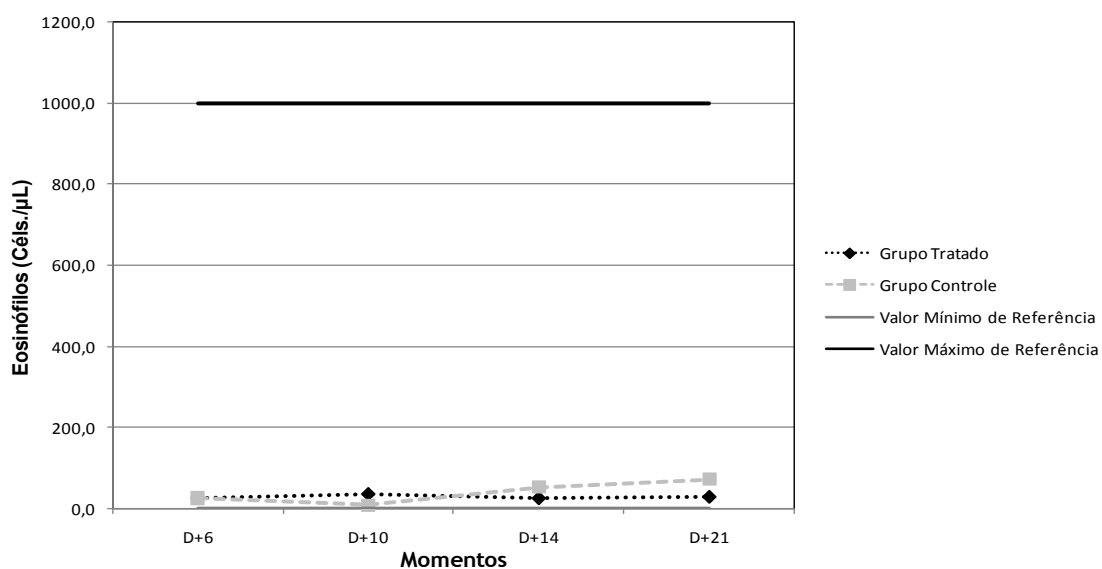
As médias de contagem de linfócitos foram semelhantes entre momentos do GT, e no GC houve aumento significativo de D+21 em relação ao D+6 e diminuição quando comparado com o D+10 (Tabela 4 e Figura 9). E D+6 e D+10, houve aumento significativo do segundo em relação ao primeiro.



**Figura 9.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) dos linfócitos (células/μL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### d. Eosinófilos

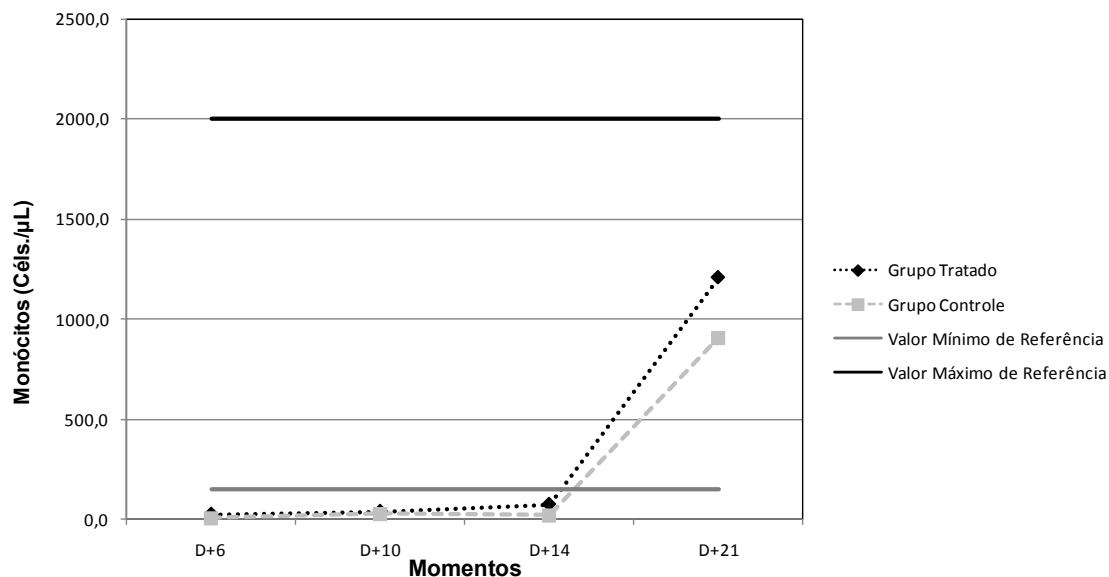
No estudo em questão, a contagem de eosinófilos não apresentou diferenças relevantes entre os valores médios dos grupos e momentos (Tabela 4 e Figura 10).



**Figura 10.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) dos eosinófilos (células/μL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

### e. Monócitos

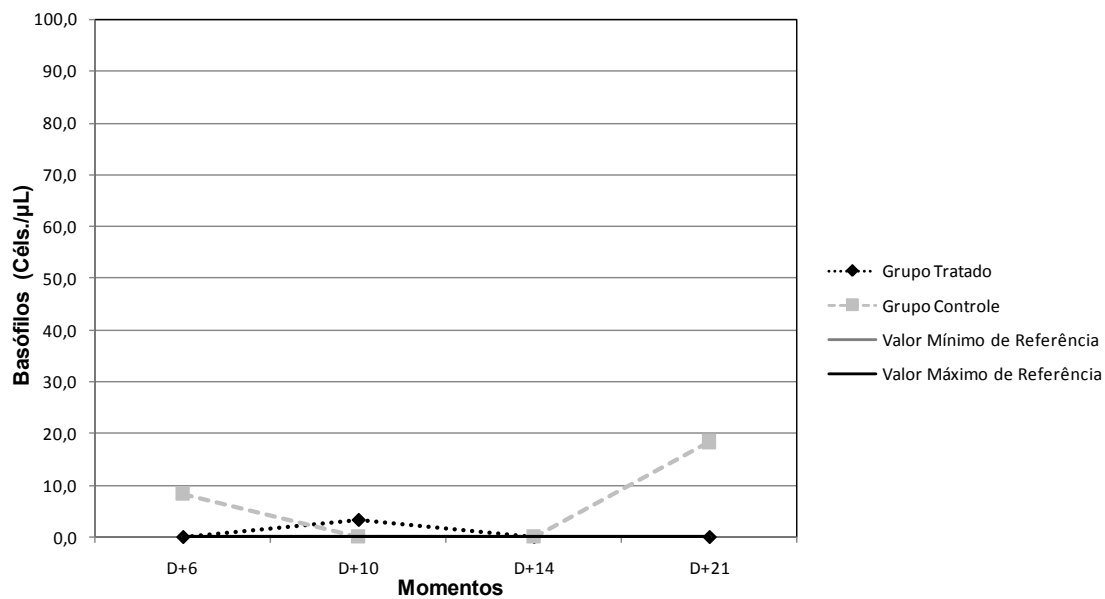
As contagens de monócitos permaneceram elevadas ( $p \leq 0,05$ ) no último momento avaliado (D+21) em relação aos demais momentos do estudo, em ambos os grupos (Tabela 4 e Figura 11).



**Figura 11.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) dos monócitos (células/ $\mu$ L) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

### f. Basófilos

Não houve diferença na contagem média de basófilos entre os grupos experimentais e entre momentos de cada grupo (Tabela 4 e Figura 12).



**Figura 12.** Valores médios e intervalo de referência (WAKENNELL, 2010) dos basófilos (células/ $\mu$ L) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

**Tabela 4.** Valores médios  $\pm$  desvios-padrão da contagem total (LEU) e diferencial de leucócitos [heterófilos (HET), linfócitos (LINF), eosinófilos (EOS), monócitos (MONO) e basófilos (BAS)], em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada a gentamicina (grupo tratado).

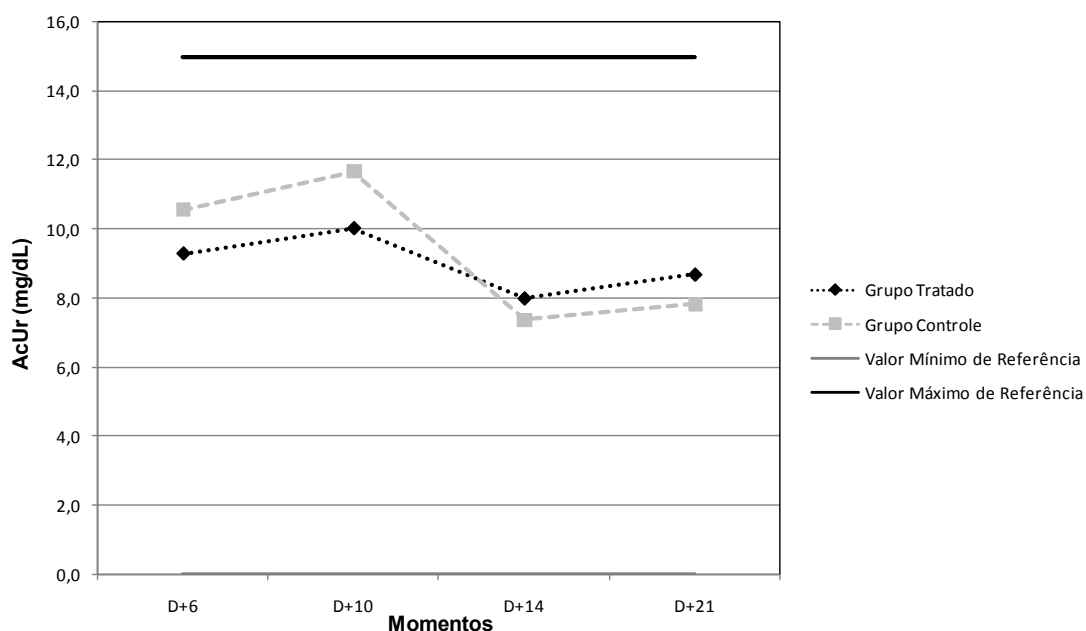
Parâmetro (unidade)	Intervalo de referência	Grupo	Momentos (dias)			
			D+6	D+10	D+14	D+21
LEU (células/ $\mu$ L)	12.000 – 30.000 (WAKENNELL, 2010)	GC	3833,33 $\pm$ 1267,30 <sup>b</sup>	5666,67 $\pm$ 1557,00 <sup>bc</sup>	7083,33 $\pm$ 2609,71 <sup>ac</sup>	9750,00 $\pm$ 3519,43 <sup>a</sup>
		GT	5000,00 $\pm$ 1906,93 <sup>b</sup>	5583,33 $\pm$ 1564,28 <sup>b</sup>	6416,67 $\pm$ 2274,70 <sup>b</sup>	10916,67 $\pm$ 6666,86 <sup>a</sup>
HET (células/ $\mu$ L)	3.000 – 6.000 (WAKENNELL, 2010)	GC	1445,83 $\pm$ 489,01 <sup>b</sup>	1458,33 $\pm$ 901,97 <sup>b</sup>	3793,33 $\pm$ 2137,43 <sup>a</sup>	6246,67 $\pm$ 3020,43 <sup>a</sup>
		GT	1445,83 $\pm$ 1250,11 <sup>b</sup>	2205,00 $\pm$ 822,94 <sup>b</sup>	3692,50 $\pm$ 2780,54 <sup>ab</sup>	6720,00 $\pm$ 6771,01 <sup>a</sup>
LINF (células/ $\mu$ L)	7.000 – 17.500 (WAKENNELL, 2010)	GC	2346,67 $\pm$ 1059,59 <sup>b</sup>	4173,33 $\pm$ 1593,91 <sup>a</sup>	3217,50 $\pm$ 1011,18 <sup>abc</sup>	2506,67 $\pm$ 879,27 <sup>c</sup>
		GT	2211,67 $\pm$ 1078,85	3303,33 $\pm$ 1566,79	2627,50 $\pm$ 990,69	2960,83 $\pm$ 1367,43
EOS (células/ $\mu$ L)	0 – 1.000 (WAKENNELL, 2010)	GC	25,83 $\pm$ 26,78	8,33 $\pm$ 19,92	53,33 $\pm$ 43,97	71,67 $\pm$ 87,47
		GT	25,83 $\pm$ 31,75	35,00 $\pm$ 47,39	25,00 $\pm$ 38,26	28,33 $\pm$ 60,58
MONO (células/ $\mu$ L)	150 – 2.000 (WAKENNELL, 2010)	GC	6,67 $\pm$ 16,14 <sup>b</sup>	26,67 $\pm$ 35,25 <sup>b</sup>	19,20 $\pm$ 35,8 <sup>b</sup>	906,70 $\pm$ 720,30 <sup>a</sup>
		GT	22,50 $\pm$ 33,06 <sup>b</sup>	36,67 $\pm$ 36,76 <sup>b</sup>	71,70 $\pm$ 72,8 <sup>b</sup>	1207,5 $\pm$ 799,7 <sup>a</sup>
BAS (células/ $\mu$ L)	Raro (WAKENNELL, 2010)	GC	8,33 $\pm$ 19,46	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	18,33 $\pm$ 43,03
		GT	0,00 $\pm$ 0,00	3,33 $\pm$ 11,55	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. Bioquímica Sérica

#### a. Ácido úrico

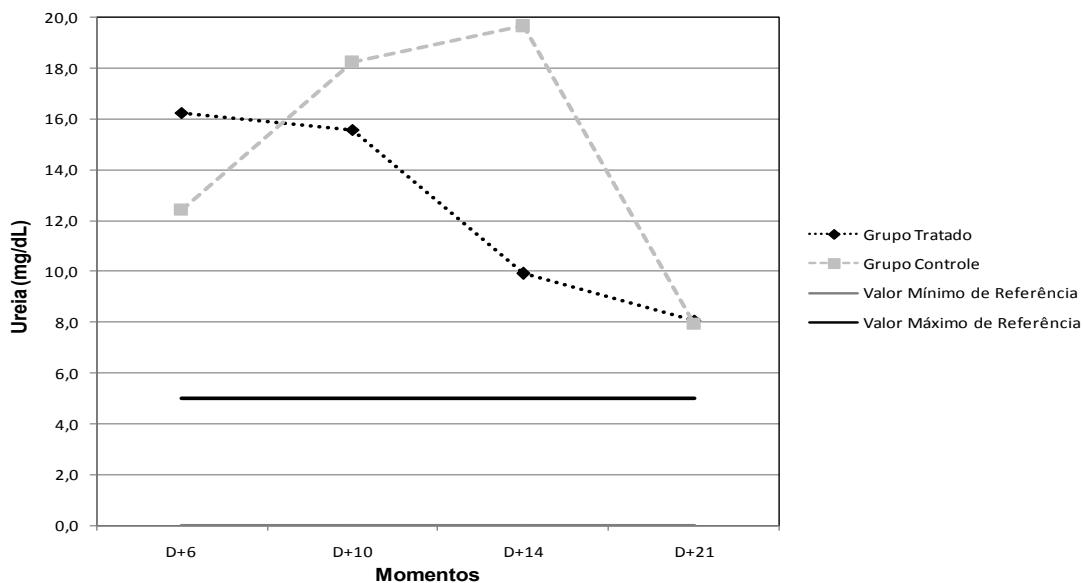
As determinações séricas de AcUr apresentaram diminuição significativa de D+14 e D+21 em relação a D+10 no GC. Para o GT, não houve diferença relevante. Entre grupos, não observou-se diferença estatística (Tabela 5 e Figura 13).



**Figura 13.** Valores médios e intervalo de referência (CAMPBELL, 2004) do ácido úrico (mg/dL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### b. Ureia

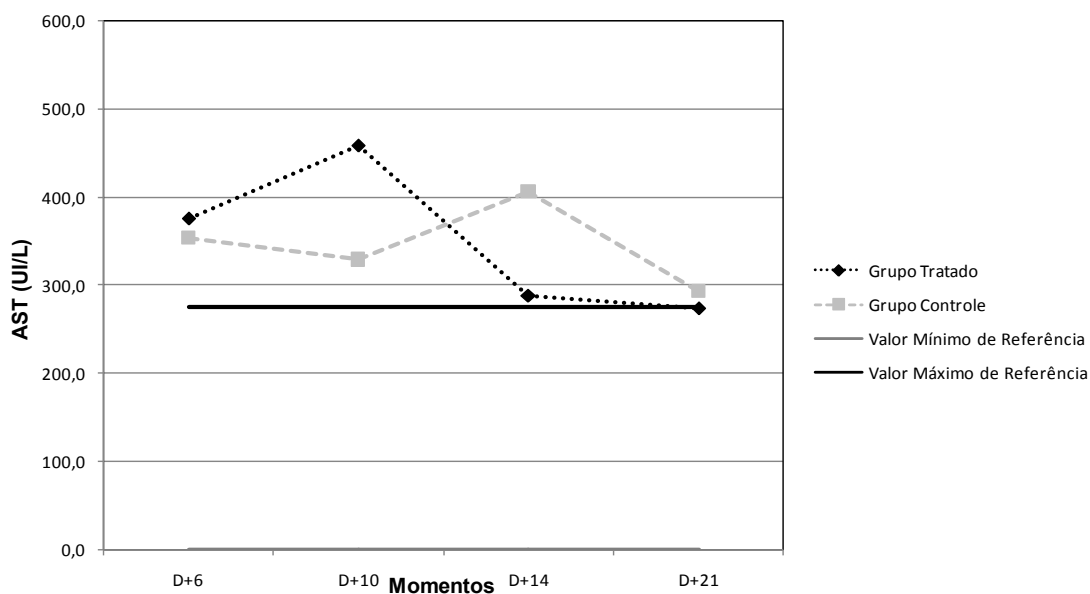
Nos resultados do grupo controle, houve redução em D+21 quando comparado com D+10 e D+14 ( $p \leq 0,05$ ). Para o grupo tratado, não foi observada alteração significativa. Entre grupos, não observou-se diferença estatística (Tabela 5 e Figura 14).



**Figura 14.** Valores médios e intervalo de referência (CAMPBELL, 2004) da ureia (mg/dL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

### c. Aspartato aminotransferase

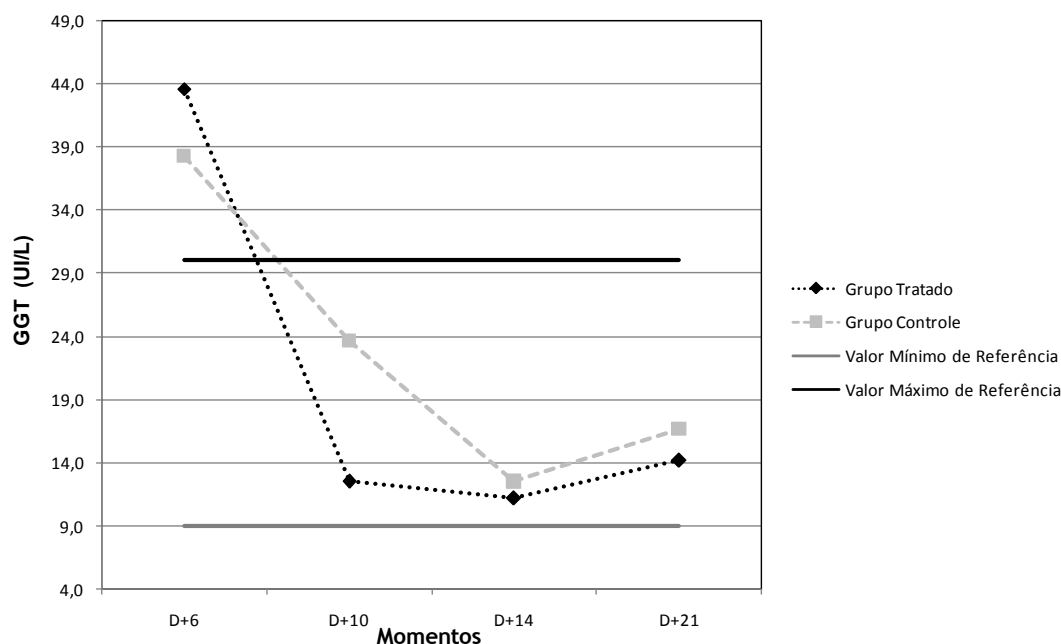
Para o AST, não se observou variação significativa entre os momentos do mesmo grupo e tão pouco entre tratamentos (Tabela 5 e Figura 15).



**Figura 15.** Valores médios e intervalo de referência (CAMPBELL, 2004) do aspartato aminotransferase (UI/L) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### d. Gama glutamiltransferase

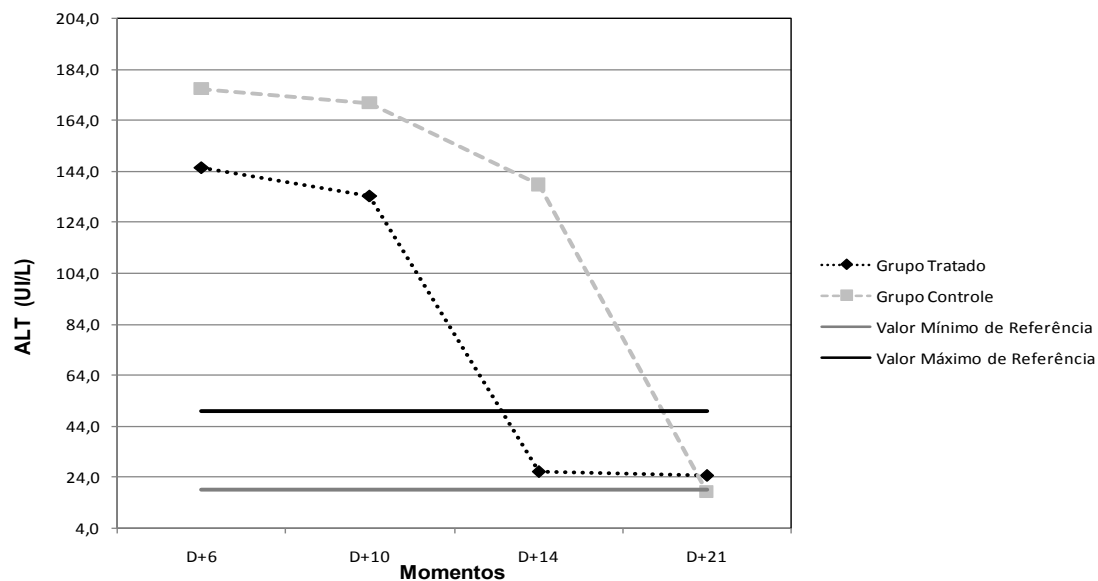
No grupo controle, os valores médios dos momentos D+14 e D+21 apresentaram diminuição significativa quando comparados com D+6 (Tabela 5 e Figura 16). Ainda neste grupo, o D+14 foi menor ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao D+10. Já no grupo tratado, houve diminuição significativa dos momentos D+10, D+14 e D+21 em relação ao D+6. Entre grupos, a média do GC foi significativamente superior a do GT em D+10.



**Figura 16.** Valores médios e intervalo de referência (BORSA, 2006) da gama glutamiltransferase (UI/L) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

#### e. Alanina aminotransferase

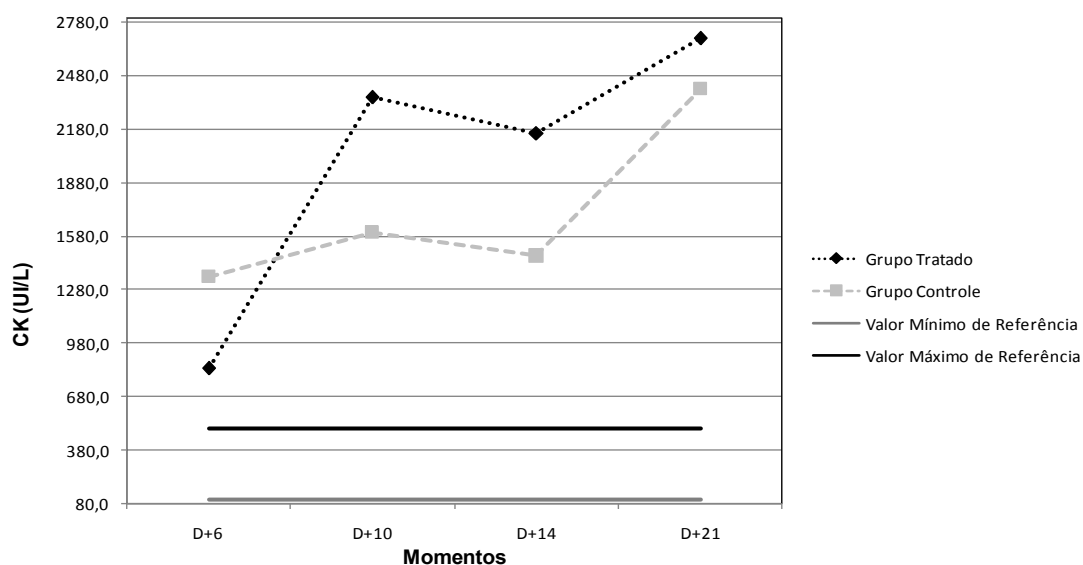
A enzima ALT apresentou diminuição ( $p \leq 0,05$ ) no momento D+21 quando comparada com os demais momentos analisados (D+6, D+10 e D+14), para o GC. Com relação ao GT, as quantificações de ALT nos momentos D+10 e D+6 apresentaram-se elevadas ( $p \leq 0,05$ ) quando confrontadas com os momentos D+14 e D+21. Entre grupos, os valores de ALT diferiram significativamente em D+14, sendo a média do GC superior a do GT (Tabela 5 e Figura 17).



**Figura 17.** Valores médios e intervalo de referência (CAMPBELL, 2004) da alanina aminotransferase (UI/L) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado)

#### f. Creatina quinase

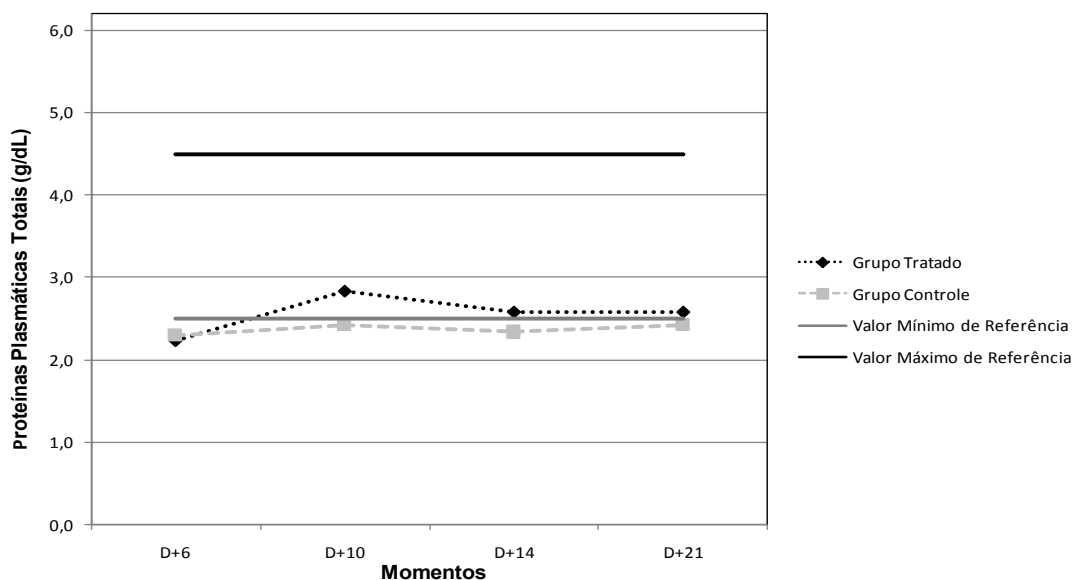
Neste estudo, observou-se que a dosagem de CK não diferiu estatisticamente entre os grupos e entre momentos do mesmo grupo (Tabela 5 e Figura 18).



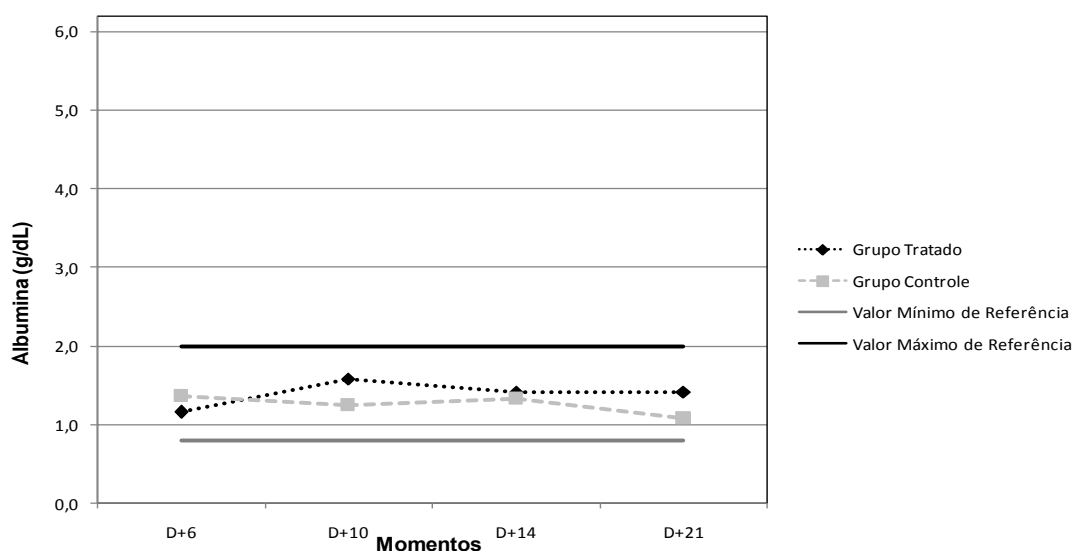
**Figura 18.** Valores médios e intervalo de referência (CAMPBELL, 2004) da creatina quinase (UI/L) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

## g. Proteínas plasmáticas totais e albumina

Não houve diferença significativa entre os momentos de colheita no mesmo grupo ou entre tratamentos quanto aos níveis de PPT (Tabela 5 e Figura 19) e de ALB (Tabela 5 e Figura 20).



**Figura 19.** Valores médios e intervalo de referência (KANEKO et al., 1997) das proteínas plasmáticas totais (g/dL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).



**Figura 20.** Valores médios e intervalo de referência (KANEKO et al., 1997) da albumina (g/dL) em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada à gentamicina (grupo tratado).

**Tabela 5.** Valores médios  $\pm$  desvios-padrão da concentração sanguínea de ácido úrico (AcUr), uréia (UR), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT), creatina quinase (CK), proteína plasmáticas totais (PPT) e albumina (ALB), em frangos nos momentos D+6, D+10, D+14 e D+21, após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (grupo controle) ou associada a gentamicina (grupo tratado).

Parâmetro (unidade)	Intervalo de referência	Grupo	Momentos (dias)			
			D+6	D+10	D+14	D+21
AcUr (mg/dL)	0 – 15 (CAMPBELL, 2004)	GC	10,57 $\pm$ 3,47 <sup>ab</sup>	11,67 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>	7,38 $\pm$ 3,21 <sup>b</sup>	7,82 $\pm$ 1,82 <sup>b</sup>
		GT	9,29 $\pm$ 2,90	10,02 $\pm$ 2,72	8,00 $\pm$ 3,12	8,68 $\pm$ 2,68
UR (mg/dL)	0 – 5 (CAMPBELL, 2004)	GC	12,42 $\pm$ 5,78 <sup>ab</sup>	18,25 $\pm$ 7,42 <sup>b</sup>	19,67 $\pm$ 9,45 <sup>b</sup>	7,92 $\pm$ 5,93 <sup>a</sup>
		GT	16,25 $\pm$ 16,70	15,58 $\pm$ 15,58	9,92 $\pm$ 4,58	8,08 $\pm$ 5,25
AST (UI/L)	0 – 275 (CAMPBELL, 2004)	GC	353,83 $\pm$ 179,44	328,92 $\pm$ 277,23	406,42 $\pm$ 218,38	292,92 $\pm$ 134,25
		GT	376,50 $\pm$ 216,25	459,08 $\pm$ 293,61	288,25 $\pm$ 90,85	273,67 $\pm$ 88,73
GGT (UI/L)	9 – 30 (BORSA, 2006)	GC	38,25 $\pm$ 14,07 <sup>a</sup>	23,67 $\pm$ 8,97 <sup>acA</sup>	12,50 $\pm$ 7,44 <sup>b</sup>	16,67 $\pm$ 5,91 <sup>bc</sup>
		GT	43,58 $\pm$ 21,42 <sup>a</sup>	12,50 $\pm$ 6,64 <sup>bB</sup>	11,17 $\pm$ 2,72 <sup>b</sup>	14,17 $\pm$ 2,08 <sup>b</sup>
ALT (UI/L)	19 – 50 (CAMPBELL, 2004)	GC	176,42 $\pm$ 225,14 <sup>b</sup>	170,75 $\pm$ 160,84 <sup>b</sup>	138,75 $\pm$ 142,66 <sup>bA</sup>	18,17 $\pm$ 11,43 <sup>a</sup>
		GT	145,67 $\pm$ 212,14 <sup>a</sup>	134,42 $\pm$ 94,85 <sup>a</sup>	26,00 $\pm$ 20,42 <sup>bB</sup>	24,67 $\pm$ 24,62 <sup>b</sup>
CK (UI/L)	100 – 500 (CAMPBELL, 2004)	GC	1352,17 $\pm$ 1059,09	1600,58 $\pm$ 1233,91	1468,83 $\pm$ 1267,79	2406,50 $\pm$ 2317,93
		GT	838,67 $\pm$ 430,80	2356,67 $\pm$ 2493,67	2152,83 $\pm$ 2968,95	2687,17 $\pm$ 2418,14
PPT (g/dL)	2,5 – 4,5 (KANEKO et al., 1997)	GC	2,30 $\pm$ 0,43	2,42 $\pm$ 0,79	2,33 $\pm$ 0,89	2,42 $\pm$ 0,79
		GT	2,23 $\pm$ 0,69	2,83 $\pm$ 0,72	2,58 $\pm$ 0,90	2,58 $\pm$ 0,79
ALB (g/dL)	0,8 – 2 (KANEKO et al., 1997)	GC	1,37 $\pm$ 0,37	1,25 $\pm$ 0,45	1,33 $\pm$ 0,49	1,08 $\pm$ 0,29
		GT	1,16 $\pm$ 0,33	1,58 $\pm$ 0,51	1,42 $\pm$ 0,67	1,42 $\pm$ 0,79

Letras minúsculas diferentes na linha e letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.5. Mortalidade**

Durante todo o estudo houve mortalidade de quatro aves do grupo tratado, duas no momento D+3, e outras duas nos momentos D+6 e D+10. Todas estas foram necropsiadas a fim de determinar a *causa mortis*. Nenhuma alteração macroscópica foi observada nas aves necropsiadas, exceto para a ave encontrada morta no momento D+6, a qual apresentou alterações patológicas caracterizadas por focos miliares amarelados nos pulmões e sacos aéreos torácicos translúcidos.

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Peso corporal médio e exame físico**

Para o parâmetro peso corporal médio, a ausência de alterações significativas após administração de gentamicina *in ovo* corrobora com Khan et al. (2008), Saleemi et al. (2009), Islam et al. (2011) e Javed et al. (2013), os quais afirmaram que a administração via IM de doses seriadas de gentamicina menores que 10 mg/kg são inócuas as aves. Os mesmos autores observaram que doses elevadas de gentamicina afetaram o crescimento das aves, possivelmente devido à anorexia e depressão apresentadas logo em seguida da administração deste princípio ativo. Já McCapes et al. (1975) averiguaram que os embriões toleram até um mg/ovo de gentamicina.

De maneira similar, a ausência de achados físicos deste experimento também foi descrita por Saleemi et al. (2009). Estes autores não encontraram quaisquer alterações comportamentais e físicas em pintinhos de um dia medicados com gentamicina nas doses de 10 a 20 mg/kg, doses superiores as utilizadas neste estudo.

### **4.2. Eritrograma**

O eritrograma fornece dados sobre a série vermelha ou eritrocítica [contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, porcentagem de

hematócrito e determinação dos índices hematimétricos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média)].

A contagem de hemácias é uma análise importante na detecção de anemia ou hemoconcentração, tanto em animais como em humanos (CHARLES NORIEGA, 2000). No decorrer do estudo, observou-se que as médias de ambos os grupos apresentaram-se discretamente abaixo dos valores de referência no D+6 (somente grupo controle) e em D+10 (grupos tratado e controle) ou acima no D+21 (somente grupo tratado), sendo que este intervalo de referência para a espécie varia entre  $1,69$  e  $2,03 \times 10^6/\mu\text{L}$  (BORSA, 2009). Apesar desta variação, durante os momentos avaliados observou-se que as médias de ambos os grupos demonstraram similaridade ao longo do estudo, e os resultados permaneceram próximos a normalidade. Ademais, os frangos não apresentaram alterações indicativas de anemia.

Dados similares foram obtidos por Mohamed (2009), ao avaliar a contagem de glóbulos vermelhos em galinhas inoculadas com *Pasteurella multocida* e tratadas com 4 mg/kg de gentamicina, IM, por 5 dias. Neste estudo, os valores variaram de  $1,87$  a  $1,97 \times 10^6/\mu\text{L}$  para os animais submetidos ao desafio e posteriormente tratados, e permaneceram entre  $2,06$  e  $2,24 \times 10^6/\mu\text{L}$  no grupo controle. Apesar da diferença, tal fato não foi caracterizado como anemia. Já Tessari et al. (2006) averiguaram o número médio de hemácias em aves saudáveis, obtendo valores da ordem de  $2,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ , assim como em aves anêmicas, nas quais o hemograma chegou a  $1,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ , em associação com a diminuição de hematócrito e hemoglobina, alterações estas não evidenciadas neste estudo.

Em consonância, Fudge (2000) postula que quadros de anemia são evidenciados apenas quando estas três variáveis (hemoglobina, hematócrito e hemácias) se encontram igualmente comprometidas. No caso da hemoglobina e do hematócrito, apesar dos resultados variarem ao longo dos momentos dentro do mesmo grupo, todos os valores médios permaneceram dentro da faixa de normalidade de 7 a 13 g/dL e 22 a 35%, respectivamente (WAKENELL, 2010). Já Bounous e Stedman (2000) consideram que o hematócrito normal das aves varia de 35 a 55%, e que valores inferiores a 35% sugerem anemia e superiores a 55% indicam desidratação ou policitemia

(eritrocitose). Em contrapartida, outros valores considerados como fisiológicos são mencionados na literatura: 30% (MACARI; LUQUETTI, 2002), 27% (FURLAN et al., 1999), 30,6 a 37% (CARDOSO; TESSARI, 2003) e 43,5% (TESSARI et al., 2006). No que tange à hemoglobina, a administração de doses de 50 mg/kg de gentamicina em coelhos, por até 20 dias, desencadearam redução significativa deste parâmetro (ELYAZJI; ABDEL-AZIZ, 2013).

Neste caso, pode-se notar que gentamicina não foi capaz de desenvolver quadros de anemia nos frangos, uma vez que as quantificações destes três parâmetros permaneceram em torno dos padrões de normalidade em todos os momentos e nenhuma alteração comportamental ou física foi observada, além da proximidade ( $p > 0,05$ ) de todos os valores de ambos os grupos ao longo dos momentos. No estudo de Mohamed (2009), aves tratadas com gentamicina também não apresentaram alterações para os valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina. Em outras espécies, doses de gentamicina acima de 100 mg/kg durante 21 dias proporcionaram quadros anêmicos em animais de laboratório (NAESHIRO et al., 1997), e 50 mg/kg por 10 ou 20 dias em coelhos não alteraram a contagem de glóbulos vermelhos e hematócrito (ELYAZJI; ABDEL-AZIZ, 2013).

A partir dos valores de hemácia, hematócrito e hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM). Ao longo dos momentos D+6 (somente grupo controle), D+10 (grupos tratado e controle) e D+14 (grupos tratado e controle) os valores médios de VCM permaneceram acima dos valores de referência para frangos, 90 – 140 fL (WAKENELL, 2010). Já os valores de HCM e CHCM, que expressam a concentração da hemoglobina presente na hemácia, ao longo de todo o estudo também permaneceram acima dos valores considerados normais para a espécie: 33 a 47 pg e 26 a 35 g/dL, respectivamente (WAKENELL, 2010). Todavia, os valores médios dos grupos permaneceram próximos entre os tratamentos em todos os momentos.

Segundo Wintrobe (1933), os índices hematimétricos auxiliam na classificação de anemia, na capacidade da medula óssea em produzir hemácias de tamanho e capacidade metabólica normais, assim como na quantificação do conteúdo de hemoglobina. Valores elevados de CHCM podem

estar relacionados a amostras lipêmicas, aglutinação de hemácias e hiperleucocitose (ROSENFELD, 2012).

Uma vez que as alterações dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) foram detectadas nos dois grupos e em praticamente todo o estudo e que os demais valores dos parâmetros eritrocitários (He, Ht, Hb) permaneceram em torno da normalidade, cabe sugerir que estas alterações sejam associadas a variações fisiológicas da espécie, sem apresentar correlação com o antimicrobiano testado. Além disto, em função dos possíveis problemas decorrentes da deficiência em transportar oxigênio, o organismo tentaria compensar tal deficiência por meio de alterações comportamentais e físicas, tais como: dispneia, depressão, palidez de mucosas, taquicardia e taquipneia (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). Ressalta-se que, neste estudo, nenhuma destas variações foram detectadas.

#### **4.3. Leucograma**

O leucograma corresponde à série branca do sangue, que é composta pela avaliação da contagem global de leucócitos e da sua contagem diferencial (heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos).

A contagem total de leucócitos variou ao longo dos momentos para ambos os grupos e permaneceu abaixo dos valores fisiológicos: 12.000 a 30.000 células/ $\mu$ L (WAKENELL, 2010). Esta leucopenia se manteve ao longo do estudo para ambos os grupos, não havendo diferença entre eles. Verificou-se que os valores médios aumentaram ao longo dos momentos, chegando muito próximo ao limite fisiológico no último momento avaliado, valores estes próximos a 10.000 células/ $\mu$ L em GC e GT. A contagem de leucócitos, no entanto, começou a aumentar ao longo do estudo em virtude do aumento gradual na contagem de heterófilos. Quando os resultados deste estudo foram confrontados com os valores obtidos por Cunha et al. (1987), 3.200 a 44.300 células/ $\mu$ L, os níveis mostraram-se dentro do intervalo especificado por estes autores. Outros autores avaliaram ainda a determinação do número de leucócitos no sangue aviário, entretanto, a variabilidade nos resultados ocasionada por fatores como espécie, raça, sexo, linhagem, estação do ano, estresse, fatores ambientais, além da variação nas metodologias laboratoriais,

tornam a interpretação do leucograma uma tarefa difícil (STURKIE; GRIMINGER, 1986).

Sabe-se ainda que o sistema imune, e, conseqüentemente, a disponibilidade das células de defesa dos pintinhos logo após a eclosão é deficiente. Neste sentido, constatou-se que a concentração de glóbulos brancos e outras células de defesa (CD3, CD4, CD8, etc.) aumentaram ao longo do crescimento das aves. Os glóbulos brancos variaram de  $0,4 \times 10^7$  no primeiro dia de vida para  $4,9 \times 10^7$ ,  $25 \times 10^7$ ,  $185 \times 10^7$ , após sete, 14 e 42 dias após o nascimento, respectivamente (LOWENTHAL et al., 1994), fato este também observado neste estudo. Estes resultados estão de acordo com Latimer e Bienzle (2010) e Mahdy (2005), que relataram que a leucopenia pode ser devido a algumas infecções virais ou vacina viva. Valores reduzidos de leucócitos foram quantificados em aves após a vacinação para coccidiose, possivelmente em virtude da migração celular para o foco inflamatório (SCHMIDT et al., 2006).

Os valores para a contagem de heterófilos seguiram o mesmo perfil de crescimento visto na contagem dos leucócitos totais, onde os resultados quantificados nos momentos 6 e 10 dias após o nascimento permaneceram abaixo dos valores considerados fisiológicos para frangos – 3.000 a 6.000 células/ $\mu$ L (WAKENELL, 2010). No momento D+14, as contagens de heterófilos retornaram aos padrões de normalidade. Já no momento D+21, as contagens excederam este critério. Cardoso e Tessari (2003) observaram diferentes contagens de heterófilos ao longo da vida dos frangos de corte, onde nas idades 1, 10, 24, 26, 31, 38, 45 e 52 dias foram encontrados os valores de 5.254, 5.518, 5.522, 4.882, 6.176, 6.984, 10.938 e 8.076 células/ $\mu$ L, respectivamente.

Alguns autores citam que, em aves jovens (1 a 14 dias), os heterófilos são funcionalmente deficientes quando comparados com aves mais velhas (GENOVESE et al., 1998; GENOVESE et al., 2000; WELLS et al., 1998; LOWRY et al., 1997). Esta ineficiência continua até cerca de 21 dias, o que aumenta a suscetibilidade das aves domésticas a infecções nas primeiras semanas de vida (LOWRY et al., 1997; GENOVESE et al., 1998; GENOVESE et al., 2000). Em consonância, estudo com a administração de linfocinas imunes resultou no aumento da atividade fagocítica do heterófilo até o quinto

dia pós-eclosão, período este considerado como mais crítico (GENOVESE et al., 2000). Os mesmos autores também verificaram uma correlação entre a idade do frango e o aumento nas concentrações de heterófilos circulantes, o que também ocorreu neste experimento.

No que tange à contagem de linfócitos, verificou-se que no decorrer dos momentos a contagem desta variável se manteve abaixo dos valores considerados normais (7.000 – 17.500 células/ $\mu$ L) para espécie, segundo Wakennell (2010). Os linfócitos são os leucócitos predominantes nos frangos (MACARI; LUQUETTI, 2002) e suas funções primárias são imunológicas, tanto na imunidade celular quanto na humoral (KERR, 2003). Neste contexto, a linfopenia pode ocorrer devido à infecção sistêmica aguda, drogas imunossupressivas, radiação, administração de corticosteróides exógenos ou liberação de corticosteróides endógenos em situações de estresse (LATIMER & BIENZLE, 2010).

Além das alterações já discutidas, Friedman, Shalem-Meilin e Heller (1992) constataram que a vacinação contra a doença de *Marek* promoveu a depleção temporária da atividade de linfócitos B de intensidades variáveis, e a recuperação se deu por volta de 3 e 4 semanas de idade. Contudo, observou-se a mesma diminuição linfocitária após a infecção de aves por cepas patogênicas do vírus da doença de *Marek*. Já Islam et al. (2002) averiguaram que a vacina contra a doença de *Marek* teve efeitos supressivos sobre o número de células B e T circulantes, mas não conseguiu afetar os pesos dos órgãos linfóides primários e respostas de anticorpos humorais.

Outros autores citam que o efeito temporal das vacinas contra a doença de *Marek* sobre a sensibilidade à infecção bacteriana coincidiu com a redução temporária da atividade *in vitro* de linfócitos B, e ambas suportam uma possível, embora fraca, fase citolítica causada pela vacina (LYDYARD et al., 1976; LEE; BACON, 1983). Frente ao exposto, acredita-se que a alteração linfocitária observada neste estudo pode estar relacionada à administração da vacina contra a doença de *Marek*, haja visto que ambos os grupos apresentaram semelhança nos resultados ao longo das avaliações.

No estudo em questão, a contagem de eosinófilos não apresentou diferença relevante entre os grupos, tão pouco entre momentos. Todos os resultados para este parâmetro permaneceram entre os limites de normalidade

para a espécie: 0 – 1.000 células/ $\mu$ L (WAKENELL, 2010). Esses dados foram similares aos encontrados por Cardoso e Tessari (2003), que variaram de 0 a 164 células/ $\mu$ L para frangos de corte saudáveis da linhagem Cobb. Sabe-se que estas células participam da regulação alérgica, resposta aguda inflamatória e podem induzir dano tecidual (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

Neste estudo a contagem de monócitos entre os momentos D+6 e D+14 permaneceu abaixo dos valores de referência (150 a 2.000 células/ $\mu$ L), todavia retornou a normalidade em D+21. Segundo Latimer e Bienzle (2010), a monocitopenia isolada é clinicamente irrelevante. Tendo em vista que as médias de monócitos foram similares nos grupos em todos os momentos do estudo, eventuais alterações ocorridas não foram associadas ao fármaco testado.

Quantidades de basófilos foram quantificadas em alguns animais do experimento, o que elevou a média para deste parâmetro, principalmente dos resultados obtidos no GC, não existindo interferência pela utilização de gentamicina. Segundo Cardoso e Tessari (2003), Borsa (2009) e Wakenell (2010), a contagem de basófilos é rara para esta espécie, e conforme Campbell (2004) a função dessa variável ainda não é bem conhecida em aves. Apesar disto, no estudo de Cardoso e Tessari (2003) esta variação foi de zero a 106 células/ $\mu$ L ao longo da vida das aves. No estudo em questão, a média máxima encontrada foi de 18,33 células/ $\mu$ L, não tendo relevância clínica.

#### **4.4. Bioquímico**

O ácido úrico e a ureia são as provas bioquímicas utilizadas para avaliar a função renal das aves (CAMPBELL, 2004), de forma que distúrbios na função renal podem levar ao aumento na concentração sérica destes dois metabólitos.

No caso das aves, o ácido úrico é o principal produto do metabolismo de nitrogênio, constituindo aproximadamente 60 a 80% do total de nitrogênio excretado pela urina. É sintetizado no fígado e nos rins, sendo 90% do ácido úrico sanguíneo excretado primariamente por secreção tubular, nos túbulos proximais dos néfrons corticais (LUMEIJ, 1997; CAMPBELL, 2004). Assim, distúrbios na função renal e dietas ricas em proteínas podem aumentar a

concentração sérica ou plasmática de ácido úrico (LUMEIJ, 1997). Segundo o mesmo autor, por não ser um teste renal muito sensível, determinações sequenciais devem ser realizadas para monitorar a progressão de doenças, uma vez que, somente com 75% da função renal comprometida é possível detectar aumento da concentração sanguínea desse metabólito.

Neste caso em específico, uma característica marcante do grupo dos aminoglicosídeos é o seu potencial nefrotóxico (GRINGAUZ, 1997; ITO et al., 2005; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; LÓPEZ; OLVERA, 2008; ISLAM et al., 2011). Este efeito está relacionado ao acúmulo de aminoglicosídeos nas células dos túbulos proximais, dado que, cerca de 80-85% da gentamicina é excretada via urina (MARTÍNEZ-SALGADO, HERÁNDEZ-LÓPEZ; NOVOA-LÓPEZ, 2007; LÓPEZ; OLVERA, 2008) sem sofrer processo de metabolização, ou seja, na forma inalterada (CHAMBERS, 2001; TAVARES, 2002; RIVIERE; SPOO, 2003). Como alternativas para o uso seguro destes fármacos, terapias com longos intervalos entre doses ou mesmo em dose única, conforme empregado neste estudo, resultam em um menor contato do medicamento com a membrana da borda em escova do rim, evitando este acúmulo (DOWLING, 2010).

No atual estudo, as concentrações de AcUr variaram de 7,38 a 11,67 mg/dL, porém permaneceram sempre abaixo do valor crítico de 15 mg/dL (CAMPBELL, 2004). Ross et al. (1978) afirmam que os valores considerados normais para frangos de corte da linhagem Cobb giram entre 4,42 e 11,14. Variações deste metabólito podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como a espécie, idade e dieta, uma vez que animais jovens tendem a apresentar maiores concentrações de ácido úrico do que adultos (CAMPBELL, 2004).

Assim como no estudo em questão, González et al. (2001) encontraram concentrações mais elevadas de ácido úrico em aves saudáveis de 10 dias de idade, a qual reduziu ao longo do desenvolvimento das aves. Já Mohamed (2009), verificou que para aves de quatro semanas de idade tratadas com gentamicina (4 mg/kg por 5 dias) a concentração de ácido úrico variou de 5,27 a 7,99 mg/dL. Dados semelhantes foram encontrados por Afzal e colaboradores (1999), onde as concentrações variaram de 5,73 a 6,31 mg/dL para aves de 42 dias de idade sem terapia antimicrobiana.

As concentrações de ureia no presente estudo variaram de 7,92 a 19,67 mg/dL para o grupo controle e de 8,08 a 16,25 mg/dL para o grupo tratado, muito acima do valor considerado fisiológico (0 a 5 mg/dL) para a espécie (CAMPBELL, 2004). Tendo em vista estes resultados, acredita-se que a gentamicina não interferiu negativamente na concentração de uréia, já que os níveis elevados foram visualizados em ambos os grupos. Por outro lado, Coles (1984) observou que os níveis de ureia são afetados por alterações na função renal, taxa de excreção renal, disfunção hepática ou ingestão de proteínas. Diante disto, Campbell (2004) encontrou que o valor diagnóstico da uréia é inferior quando comparado ao do ácido úrico nas aves.

Em concordância com o presente estudo, valores bastante elevados para a uréia foram encontrados por outros autores em aves: 51,67 mg/dL (AFZAL et al., 1999) e 20 a 25 mg/dL (KHAN et al., 2008). Doses crescentes de gentamicina (duas doses, com intervalo de um dia entre as aplicações, de 10, 50 e 100 mg/kg) levaram ao acréscimo gradual das concentrações de ureia, chegando a 47 mg/dL nas aves que receberam a dose de 50 mg/kg e as aves que receberam 100 mg/kg morreram na primeira semana de estudo (KHAN et al., 2008). Este mesmo autor expõe que doses duplas, de 10 mg/kg de gentamicina foram seguras para as aves e não resultam em alterações renais. Da mesma forma, em ratos e coelhos, doses crescentes de gentamicina também influenciaram significativamente as quantificações de ureia (ALARIFI et al., 2012; ELYAZJI; ABDEL-AZIZ, 2013).

Outros antibióticos amplamente utilizados na avicultura moderna também interferem nas quantificações de ureia, quando administrados em altas doses. Doses crescentes de colistina em frangos (5 a 40 mg/kg) prejudicaram as concentrações de ureia, que chegaram a 17,8 mg/dL (SALEEMI et al., 2014). Em compensação, Sureshkumar, Sarathchandra e Ramesh (2013), confirmaram o uso seguro do ativo enrofloxacin na dose de 10 mg/kg durante cinco dias em frangos de corte, não causa alterações nos parâmetros hepáticos e renais.

As aves apresentam alta atividade da AST no fígado, nos músculos esqueléticos e cardíaco, no cérebro e nos rins, sendo considerada dessa forma, uma enzima inespecífica, todavia, pode ser utilizada como índice de alteração de células hepáticas em conjunto com outros indicadores (KANEKO,

1989). No presente estudo todas as médias de AST permaneceram acima dos padrões de referência para a espécie que variam de 0 – 275 UI/L (CAMPBELL, 2004), o que sugere aumento da sua atividade. Esse incremento pode estar relacionado a distúrbios hepáticos ou musculares, porém normalmente concentrações acima de 800 UI/L são sugestivas de dano hepático severo, o que não ocorreu neste estudo. Em compensação, Borsa et al. (2006), observaram variação de 126 a 332 UI/L nas concentrações de AST de frangos de corte saudáveis. O uso de altas doses de gentamicina em ratos (80 e 150 mg/kg) demonstrou acréscimo significativo nas dosagens de AST, ALT e fosfatase alcalina (ALARIFI, 2012).

Uma vez que a atividade da AST não é considerada específica aos distúrbios hepatocelulares na maioria das aves, outras enzimas como a creatina quinase devem ser mensuradas em conjunto para diferenciar possível dano hepático ou muscular. Neste caso, as concentrações da enzima CK mantiveram um comportamento crescente e permaneceram acima dos padrões considerados normais para a espécie 100 – 500 UI/L (CAMPBELL, 2004), entretanto, não diferiram estatisticamente entre os grupos e entre momentos no decorrer dos dias. Essa correlação no aumento de AST e CK pode estar relacionada ao estresse durante a contenção dos animais para as colheitas, que de acordo com Campbell (2004) denomina-se como miopatia de contenção, do estresse ou de captura. Este quadro resulta em alterações como acidose, elevação da CK e da desidrogenase láctica, sendo muito comum em animais silvestres e domésticos (DIAS, 1993).

No caso da GGT, no momento D+6 a concentração desta enzima para ambos os grupos ficou acima dos valores normais para a espécie, que segundo Borsa (2006) variam entre 9 – 30 UI/L. Contudo, este fato foi isolado e ocorrido nos dois grupos, não demonstrando correlação com o tratamento, e retornaram aos patamares de normalidade nas avaliações seguintes. Em D+10, o grupo controle apresentou níveis de GGT acima ( $p \leq 0,05$ ) dos encontrados pelo grupo tratado e, apesar disto, as concentrações médias encontradas em ambos os grupos permaneceram dentro dos limites fisiológicos para a espécie. A GGT é uma enzima de membrana associada a vários tecidos e sua atividade sérica ou plasmática elevada ocorre pelo aumento de produção e liberação pelo tecido hepatobiliar (MEYER et al., 1995).

Dados similares aos obtidos neste estudo são relatados por Barbosa et al. (2011), os quais observaram concentrações de GGT variando de 18 a 23,4 UI/L em galinhas poedeiras e por Mohamed (2009), que citou concentrações variando de 14,47 a 19,66 UI/L em frangos de corte.

Já no que diz respeito à ALT, houve redução na dosagem desta enzima ao longo dos momentos e somente no momento D+21 a mesma permaneceu dentro dos valores de referência para ambos os grupos. No momento D+14, observou-se diferença significativa entre os grupos, mas a concentração média do grupo tratado permaneceu dentro da faixa de normalidade que varia de 19 – 50 UI/L (CAMPBELL, 2004). Pode-se perceber que no decorrer do estudo as quantificações do grupo controle (138,75 a 176,42) permaneceram acima do relatado para o grupo tratado (26 a 145,67 UI/L), nos três primeiros momentos. Diante disto, constatou-se que a gentamicina não interferiu nas concentrações de ALT, visto que o grupo controle obteve valores superiores ao grupo tratado. Ademais, não houve correlação clínica com os achados observados.

Diversos autores verificaram que o incremento nas doses de gentamicina tanto em aves (BIRD et al., 1983; ITOH; OKADA, 1993, JAVED et al., 2013; SALEEMI et al., 2009) quanto em animais de laboratório (KAHN et al., 1980; ALARIFI, 2012) elevaram as concentrações da enzima ALT no soro sanguíneo destas espécies. Além disto, Javed et al. (2013) observaram que doses de 30 mg/kg de gentamicina refletiram no aumento dos níveis séricos desta enzima e doses superiores desencadearam danos hepáticos e renais graves.

A maioria das proteínas circulantes no plasma é sintetizada pelo fígado, com exceção das imunoglobulinas. As principais funções destas moléculas são manter o volume sanguíneo por meio do efeito osmótico coloidal; participar na manutenção do pH do sangue; fazer o transporte de hormônios e fármacos; participar da coagulação celular; catalisar (enzimas) e regular (hormônios) processos biológicos. Algumas delas também são indispensáveis nas reações inflamatórias, imunes, nos processos de regeneração e reparação tissular (MELILLO, 2013). Nas aves a maior fração protéica é a albumina (40-50%) que é sintetizada 100% no fígado, por isto sua medição pode ser uma ajuda complementar no diagnóstico das doenças hepáticas (KANEKO et al., 1997).

No presente estudo, os valores médios de PPT variaram de 2,23 a 2,83 g/dL e todas as concentrações permaneceram em torno do valor mínimo de referência (2,5 a 4,5 g/dL) sugerido por Kaneko et al. (1997). Quanto à albumina, ao longo dos momentos as quantificações variaram de 1,08 a 1,58 g/dL, todas permanecendo dentro da normalidade - 0,8 a 2 g/dL (KANEKO et al., 1997). Os resultados obtidos para as concentrações de proteína total (2,8 g/dL) e albumina (1,14 g/dL) publicados por Barbosa et al. (2011) foram similares aos encontrados no presente estudo. Cabe ressaltar que não foram observadas alterações protéicas críticas indicativas de lesão renal e hepática, para ambos os estudos.

Javed e colaboradores (2013) verificaram diminuição das proteínas totais e albumina no soro de frangos de corte após administração de doses superiores a 50 mg/kg de gentamicina, via IM. Tal achado pode estar relacionado à queda na síntese de proteínas séricas, provavelmente relacionada a lesão hepática (MUHAMMAD et al., 2012), ou a perda através dos rins danificados (COWAN et al., 1980). Dados similares foram encontrados por Saleemi et al. (2009), onde doses de gentamicina superiores a 30 mg/kg levaram a redução dos níveis séricos de albumina e proteínas totais, e ao aumento da enzima ALT, que juntamente com as alterações histopatológicas sugeriram o efeito nefrotóxico e hepatotóxico deste ativo em aves. Outros autores relataram alterações semelhantes em diferentes espécies aviárias (BIRD et al., 1983; ITOH; OKADA, 1993; DONALDSON; CHRISTENSEN, 1995; KHAN et al., 2008).

#### **4.5. Mortalidade**

Considerando os primeiros 21 dias de criação o percentual de mortalidade foi de 8,33%, ou seja, quatro aves mortas para um total de 48 para o grupo tratado. Segundo Mendes e Patrício (2004) aceita-se como percentual normal de mortalidade na primeira semana 0,8% e a partir desse ponto 0,5% por semana.

No presente estudo constatou-se que uma das aves morta apresentou lesões compatíveis com aspergilose, onde segundo Rossini e Monteiro (2004) a aspergilose é uma enfermidade comum nas aves, ocasionada por fungos do

gênero *Aspergillus* e que apresenta diversas formas de manifestação clínica. É bastante comum em incubatórios, onde o sistema de ventilação das salas favorece a disseminação do agente por toda a instalação. E ainda, Baracho, Nääs e Gigli (2010) observaram que infecção provocada por fungos do gênero *Aspergillus* causam mortalidade em pintinhos entre o primeiro e o terceiro dia de idade, sendo tal contaminação oriunda de nascedouros contaminados. Ademais, as outras aves mortas do grupo tratado não apresentavam nenhuma alteração macroscópica evidente, e com isso acredita-se que a gentamicina não interferiu negativamente no percentual de mortalidade nos frangos ao longo dos momentos.

A gentamicina quando aplicada em ovos férteis na dose de 0,2 mg/ovo, no quarto dia de incubação, não influenciou a mortalidade dos pintinhos recém-nascidos (SINGROHA; SRIVASTAVA; CHHIKARA, 2012; SINGROHA; SRIVASTAVA; CHHIKARA, 2013). Entretanto, Javed et al. (2013) constataram que somente doses superiores a 50 mg/kg, em frangos de 4 semanas, apresentaram mortalidade, inclusive doses entre 70 mg/kg e 120 mg/kg resultaram em 100% de mortalidade. Esses dados são muito similares aos encontrados por Khan et al. (2008) e Saleemi et al. (2009), na administração de doses crescentes de gentamicina em pintinhos de um e três dias.

## 5. CONCLUSÃO

Com base na metodologia proposta, pode-se inferir que a administração de 0,22 mg/ovo de sulfato de gentamicina em associação com a vacina contra a doença de *Marek*, não causou alterações físicas e/ou clínicas significantes quando administrada em ovos de aves reprodutoras pesadas.

## 6. REFERÊNCIAS

AFZAL, M.; KHAN, S. A.; MUNEER, K.; AFZAL, M. Study on the effect of doxin on the serum biochemical and enzymic values of broiler chickens. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 19, n. 3, 1999.

ALARIFI, S.; AL-DOAISS, A.; ALKAHTANI, S.; AL-FARRAJ, S. A.; AL-EISSA, M. S.; AL-DAHMAH, B. AL-YAHYA, H.; MUBARAK, M. Blood chemical changes and renal histological alterations induced by gentamicin in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 19, n. 1, p. 103–110, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.11.002>>.

BAILEY, J. S.; LINE, E. *In ovo* gentamicin and mucosal starter culture to control Salmonella in broiler production. **The Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, v. 10, p. 376–379, 2001.

BARACHO, M. S.; NÄÄS, I. A.; GIGLI, A. C. S. Impacto das variáveis ambientais em incubatório de estágio múltiplo de frangos de corte. **Engenharia Agrícola**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 563-577, 2010.

BARBOSA, T. S.; MORI, C. K.; POLONIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; CIARLINI, P. C. Perfil bioquímico sérico de galinhas poedeiras na região de Araçatuba, SP. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1583-1588, 2011.

BIFFI, C. P. **Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* de origem avícola frente aos antimicrobianos ceftiofur, gentamicina e enrofloxacina**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2012.

BIRD, J. E.; WALSER, M. M.; DUKE, G. E. Toxicity of gentamicin in red tailed hawks. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, n. 7, p. 1289–1293, 1983.

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

BORSA, A. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 5, n. 1, p. 25–31, 2009.

BOUNOUS, D. I.; STEDMAN, N.L. Normal Avian Hematology: Chicken and Turkey. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's: veterinary hematology**. 5<sup>th</sup>. Ed. Philadelphia: Lippincot, Williams & Wilkins, 2000. p.1147-1154.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa (MAPA) Nº 26, de junho de 2009**: aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>>. Acesso em: 15 set. 2014.

CAMPBELL, T. W. **Avian hematology and cytology**. 2<sup>nd</sup>. ed. Iowa: Isupress, 1995. 108 p.

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

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudos dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 419-424, 2003.

CHAMBERS, H. F. The aminoglycosides. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 10<sup>th</sup>. ed. New York: McGraw-Hill; 2001. 2045 p.

CHARLES NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviar**: material didático para curso de hematologia aviária. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Producción Animal: aves. México, 2000. 70 p. (Apostila mimeo).

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. p. 48-250.

COWAN, R. H.; JUKKOLA, A. F.; ARANT, B. S. Pathophysiologic evidence of gentamicin nephrotoxicity in neonatal puppies. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 14, n. 11, p. 1204–1211, 1980. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1203/00006450-198011000-00011>>.

CUNHA, M. N. M. A.; GOMES, F. V. B. A.; SOUSA, F. M. de; Leucograma em frangos de corte industrial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA. 1987, Natal, RN. **Anais...** Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 1987. p. 50-51.

DIAS, J. L. C. Miopatia de captura. **Informativo ABRAVAS**, v. 1, n. 1, p. 1-2, 1993.

DONALDSON, W. E.; CHRISTENSEN, V. L. Possible toxic effects of gentamicin in newly hatched turkey poults. **The Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, v. 4, n. 3, p. 271–275, 1995.

DOWLING, P. M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÉRE, S. PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2010. cap. 13, p. 213-237.

EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R.; CASAS, I. A.; DOBROGOSZ, W. J. Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 179-196, 1997.

ELYAZJI, N. R.; ABDEL-AZIZ, I. Some hematological and physiological changes associated with gentamicin and/or novalgine injection in rabbits. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, Jalpaiguri, v. 3, n. 1, p. 172-181, 2013.

FRIEDMAN, A.; SHALEM-MEILIN, E.; HELLER, E. D. Marek's disease vaccines cause temporary U - lymphocyte dysfunction and reduced resistance to infection in chicks. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 21, n. 4, p. 621-631, 1992.

FUDGE, A. M. Avian complete blood count. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine – avian and exotic pets**. Saunders, 2000. p. 9-18.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; MORAES, V. M. B.; MALHEIROS, R. D.; MALHEIROS, E. B.; SECATO, E. R. Alterações hematológicas e gasométricas em diferentes linhagens de frangos de corte submetidos ao estresse calórico agudo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 77-84, 1999.

GENOVESE, K. J.; MOYES, R. B.; GENOVESE, L. L.; LOWRY, V. K.; KOGUT, M. H. Resistance to *Salmonella enteritidis* organ invasion in day-old turkeys and chickens by transformed t cell line produced lymphokines. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 42, p. 545–553, 1998.

GENOVESE, L. L., LOWRY, V. K., GENOVESE, K. J., KOGUT, M. H. Longevity of augmented phagocytic activity of heterophils in neonatal chickens following administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines to chickens. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 29, p. 117–122, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D.; HAIDA, K. S.; MAHL, D.; GIANNESI, G.; KRONBAUER, E. Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 141-147, 2001.

GRINGAUZ, A. Antimicrobial drugs. In: GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry**, 1997. cap. 6, p. 247-255.

HOFACRE, C. L. Uso de antimicrobianos em aves domésticas. In: GIGUÉRE, S. PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2010. cap. 35, p. 591-602.

ISLAM, N. U.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; KHAN, A.; BHATTI, S. A.; YOUSAF, M.; UL-HASSAN, Z. Clinic pathological studies on gentamicin toxicity in White Leghorn commercial layers. **The Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 31, n. 4, p. 305-308, 2011.

ISLAM, A. F. M. F.; WONG C. W.; WALKDEN-BROWN, S. W.; COLDITZ, I. G.; ARZEY, K.; GROVES, P. J. Immunosuppressive effects of *Marek's* disease virus (MDV) and herpesvirus of turkeys (HVT) in broiler chickens and the protective effect of HVT vaccination against MDV challenge. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 31, n. 5, p. 449-461, 2002.

ITO, N. M. K.; MIYAJU, C. I.; LIMA, R. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: Usos preventivos e Curativos na Avicultura. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Editora Roca, 2005. cap. 8, p. 115-147.

ITOH, N.; OKADA, H. Pharmacokinetics and potential use of gentamicin in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Zentralblatt für Veterinärmedizin - Reihe A**, Berlin, v. 40, p. 194-199, 1993.

JAVED, U.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; KHAN, A.; JAVED, I. RAFIQUE, S. Toxicopathological effects of parenteral administration of gentamicin in growing broilers. **Journal of Agricultural and Biological**, Islamabad, v. 15, n. 3, P. 529-534, 2013.

KAHN, T.; BOSCH, J.; WIENER, P.; DIKMAN, S. Course of gentamicin nephrotoxicity. **Toxicology**, Amsterdam, v. 16, p. 49-57, 1980.

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic, 1989. 932p.

KANEKO, J. J.; SMITH, H. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. **The California Veterinarian**, San Francisco, v. 21, n. 4, p. 21-24, 1967.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup>. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KERR, M. G. Glóbulos vermelhos. In: KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária – bioquímica clínica e hematologia**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2003. p. 3-43.

KHAN, I.; KHAN, M. Z.; SALEEMI, M. K.; JAVED, I.; KHAN, A. Pathological and Biochemical Effects of Intramuscular Gentamicin Administration in Chickens. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 32, n. 5, p. 345-351, 2008.

LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. Determination and interpretation of the avian leukogram. In.: **Schalm's: veterinary hematology**. 6. ed. Yoma: Blackwell Publishinf, 2010. cap. 50, p. 345-357.

LEE, L. F.; BACON, L. D. Ontogeny and line differences in the mitogenic response of chicken lymphocytes. **Poultry Science**, Champaign, v. 62, p. 579-584, 1983.

LINZMEIER, L. G.; BAZAN, C. T.; ENDO, R. M.; LINO, R. S.; MENINO, B. B.; PUGLIESE, P.; SHAFRANSKI, E.; SILVA, L. C.; PEREIRA, D. M. Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p.

LÓPEZ, H. S.; OLVERA, L. G. Aminoglicósidos. In: SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L. **Farmacología clínica em aves**. 3. ed. México: Avimex Salud Animal, 2008. p. 134-139.

LOWENTHAL, J. W.; CONNICK, T. E.; McWATERS, P. G.; YORK, J. J. Development of T cell immune responsiveness in the chicken. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 72, n. 2, p. 115-122, 1994.

LOWRY, V. K.; GENOVESE, K. J. BOWEN, L. L.; KOGUT, M. H. Ontogeny of the phagocytic and bactericidal activities of turkey heterophils and their potentiation by Salmonella enteritidis-immune lymphokines. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, New York, v. 19, n. 1, p. 95-100, 1997.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup>. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

LYDYARD, P. M.; GROSSI, C. E.; COOPER, M. D. Ontogeny of B cells in the chicken: I. Sequential development of clonal diversity in the bursa. **Journal of Experimental Medicine**, Baltimore, v. 144, n. 1, p. 79-97, 1976.

MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Fisiologia cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 17-36.

MAHDY, S. A. **Clinicopathological studies on the effect of duck viral hepatitis in ducks**. 2005. Thesis (Doctorate Clinical Pathology) - Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Zagazig, Egypt, 2005.

McCAPES, R. H.; YAMAMOTO, R.; ORTMAYER, H. B.; SCOTT, W. F. Injecting antibiotics into turkey hatching eggs to eliminate *Mycoplasma meleagridis* infection. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 19, n. 3, p. 506-514, 1975.

McCAPES, R. H.; YAMAMOTO, R.; GHAZIKHANIAN, G.; DUNGAN, W. M.; ORTMAYER, H. B. Antibiotic egg injection to eliminate disease i. effect of injection methods on turkey hatchability and mycoplasma meleagridis infection. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 21, n. 1, p. 57-68, 1977.

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; HENÁNDEZ-LÓPEZ, F. J.; NOVOA-LÓPEZ J. M. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 223, n. 1, p. 86-98, 2007.

MELILLO, A. Applications of serum protein electrophoresis in exotic pet medicine. **Veterinary Clinics of North America: exotic animal practice**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 211–225, 2013.

MENDES, A. A.; PATRÍCIO, I. S. Controles, registros e avaliação do desempenho de frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. de A.; MACARI, M. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas: FACTA, 2004. p. 323-336.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.

MOHAMED, S. M. Hematological biochemical immunological and pathological studies on pasteurellosis in chicken. **Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology**, Giza, v. 22, n. 2, p. 195-209, 2009.

MUHAMMAD, D.; CHAND, N.; KHAN, S. SULTAN, A.; MUSHTAQ, M.; RAFIULLAH. Hepatoprotective role of milk thistle (*Silybum marianum*) in meat type chicken fed aflatoxin B1 contaminated feed. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 32, n. 3, p. 443–446, 2012.

NAESHIRO, I.; ISHIMURA, Y.; CHATANI, F.; SATO, S. Possible mechanism for the anaemia induced by gentamicin in rats. **Comparative Haematology International**, London, v. 7, n. 4, p. 220-225, 1997.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidades dos aminoglicosídeos. **The Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, São José do Rio Preto, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.

PAPICH, M. G. **Manual Saunders: terapêutico veterinário**. 2. ed. São Paulo: Editora MedVet, 2009. p. 338-340.

RIVIERE, J. C.; SPOO, J. W. Antibióticos aminoglicosídeos. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ROSENFELD, R. Hemograma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 4, p. 244, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442012000400001>>.

ROSS, J. G.; CHRISTIE, G.; HALLIDAYM, W. G. F.; MORLEY JONES, R. Hematological and blood chemistry “comparison values” for clinical pathology in poultry. **Veterinary Record**, London, v. 102, p. 29–31, 1978.

ROSSINI, L. I.; MONTEIRO, M. C. G. B. Problemas respiratórios em frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. v. 1, p. 261-272.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.

SALEEMI, M. K.; KHAN, M. Z.; JAVED, I.; KHAN, A. Pathological effects of gentamicin administered intramuscularly to day-old broiler chicks. **Experimental and Toxicologic Pathology**, London, v. 61, n. 5, p. 425-432, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2008>>.

SALEEMI, M. K.; HUSSAN, M. F. U.; KHAN, M. Z.; KHAN, A.; ABBAS, R. Z.; AHMAD, A. Hemato-biochemical effects of colistin administered intramuscularly in growing broiler birds. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 34, n. 1, p. 78-81, 2014.

SCHMIDT, E. M. S.; PAULILLO, A. C.; ALFARO, D. M.; OLIVEIRA, E. G.; MANGRICH-ROCHA, R. M. V.; SANTIN, E. Parâmetros laboratoriais de frangos de corte vacinados contra a coccidiose. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, supl., p. 207, 2006.

SINGROHA, R.; SRIVASTAVA, S. K.; CHHIKARA, P. Effect of gentamicin on kidney in developing chicks. **European Journal of Anatomy**, Salamanca, v. 16, n. 2, p. 119-126, 2012.

SINGROHA, R.; SRIVASTAVA, S. K.; CHHIKARA, P. Effect of gentamicin on proximal convoluted tubules of kidney indeveloping chicks. **Journal of the Anatomical Society of India**, Aurangabad, v. 62, p. 17-22, 2013.

SPINOSA, H. S. Antimicrobianos: Aminoglicosídeos, polimixinas, bacitracina e vancomicina. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 38, p. 416-419.

SURESHKUMAR, V.; SARATHCHANDRA, G.; RAMESH, J. Biochemical, histopathological and ultra structural profile after pulsed water medication of enrofloxacin in broiler chickens. **Veterinary World**, Rajkot, v. 6, n. 9, p. 668-673, 2013.

STURKIE, P. D.; GRIMINGER, P. Body fluids: blood. In: STURKIE, P. D. **Avian Physiology**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 102-129.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 792 p.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B1 e fumonisina B1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000300030>>.

VICH Topic GL43. **Guidance for industry: Target animal safety for veterinary pharmaceutical products.** At step 7. Rockville, July 2008.

WAKENELL, P. S. Hematology of chickens and turkeys. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's: veterinary hematology.** 6. ed. Yowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 122, p. 958-967.

WELLS, L. L.; LOWRY V. K.; DELOACHT. J. R.; KOGUTT, M. H. Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. **Developmental and Comparative Immunology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p.103-109, 1998

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematology**, v.51, p.31, 1933.

### **CAPÍTULO 3 - Efeito residual da gentamicina em tecidos de frangos de corte**

**RESUMO** – Os aminoglicosídeos são amplamente utilizados em animais produtores de alimentos, deste modo faz-se necessária a determinação dos efeitos residuais destes medicamentos nos tecidos de animais destinados à alimentação humana, uma vez que nenhum estudo similar foi encontrado em literatura. Diante disto, objetivou-se avaliar os efeitos residuais da gentamicina nos tecidos de frangos de corte, após a administração de 0,22 mg/ovo juntamente com a vacina de *Marek*. Foram incubados 200 ovos, oriundos de matrizes da linhagem comercial Cobb. Aos 18 dias de incubação, todos os ovos receberam a vacina e também o tratamento com sulfato de gentamicina. Em sequência, ovos foram transferidos ao nascedouro e, após o nascimento, os pintinhos foram alojados em galpão de alvenaria onde permaneceram durante todo o período, recebendo ração isenta de quimioterápicos e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em repetições de seis animais cada, compondo cinco grupos de abate (Grupos A, B, C, D e E). Cada grupo teve suas aves abatidas nos momentos D+14, D+21, D+28, D+35 e D+42 (14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade respectivamente). O abate dos animais seguiu as recomendações de eutanásia descritas nas Diretrizes de Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. As colheitas de amostras seguiram o Guideline VICH GL 48 e o Guideline APVMA nº 31 e compreenderam músculo, pele/gordura, fígado e rim. A quantificação de gentamicina e seus metabólitos (C1, C1a, C2 e C2a) em cada amostra de tecido foi realizada de acordo com os critérios da IN nº 24 de 14 de julho de 2009. Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas, a qual foi previamente validada. A metodologia estatística empregada para a análise dos dados seguiu as recomendações da European Medicines Agency para determinação do período de carência nos tecidos das aves. Para o músculo e para pele/gordura, todas as amostras avaliadas durante o estudo se mantiveram abaixo do limite máximo de resíduos (LMR) e do limite de quantificação (LQ), exceto uma repetição do momento D+14, para a matriz pele/gordura, que apresentou valor acima do LQ. Verificou-se que nas matrizes fígado e rim a gentamicina apresentou maior tendência ao acúmulo, com maior permanência no tecido renal. Para todas as matrizes, empregou-se o método alternativo para obtenção do período de carência e este foi de 16,8 dias para as matrizes músculo e pele/gordura. Já para as matrizes rim e fígado, o período de retirada foi de 25,2 dias. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os efeitos residuais da gentamicina em tecidos de frangos de corte e seu período de retirada foram de aproximadamente 26 dias. Considerando o período de abate de um frango de corte no Brasil varia de 35 a 42 dias, a utilização da gentamicina *in ovo* é plausível e não ocasiona danos a saúde humana.

**Palavras-chave:** frangos de corte, gentamicina, ovos, resíduo tecido

## Residual effect of gentamicin in tissues of broiler

**ABSTRACT** – Aminoglycosides are widely used in food-producing animals, thus it is necessary to determine the residual effects of these drugs in tissues of animals intended for human consumption, since no similar studies found in literature. Thus, the objective was to evaluate the residual effects of gentamicin in tissues of broiler, after associated administration of 0.22 mg of gentamicin sulfate with the vaccine of *Marek*/egg. 200 eggs from commercial Cobb strain were incubated. After 18 days incubation, all eggs received vaccine and also the treatment with gentamicin sulfate. In the sequence, eggs were transferred to the hatcher and, after birth, the chicks were housed in a brick shed where they remained throughout the period, receiving food free of antimicrobials and water *ad libitum*. The animals were randomly distributed in replicates of six animals each, making five groups of slaughter (Groups A, B, C, D and E). Each group had their broilers slaughtered in the moments D+14, D+21, D+28, D+35 and D+42 (14, 21, 28, 35 and 42 days respectively). The slaughter of animals followed the recommendations outlined in the Guidelines for Euthanasia Practice of the National Council for the Control of Animal Experimentation. The sampling followed the Guideline VICH GL 48 and the APVMA Guideline N° 31, and included muscle, skin/fat, liver and kidney. The quantification of its gentamicin and metabolites (C1, C1a, C2 and C2a) in each tissue sample was made according to the criteria of IN N° 24 of July 14, 2009. We used a liquid chromatography with detection by mass spectrometry technique, which was previously validated. The statistical methodology used for the data analysis followed the recommendations of the European Medicines Agency (EMA) for the determination of the withdrawal period in the tissues of broilers. It was found that the liver and kidney showed a greater tendency to accumulate gentamicin, with greater permanence in renal tissue. As for the muscle and skin/fat, all samples evaluated during the study remained below the maximum residue limit (MRL) and the limit of quantification (LOQ), except a repetition time of D+14, for the skin/fat sample, which showed values above the LOQ. For all sample of tissues, we used the alternative method of obtaining the withdrawal period this which was 16.8 days for muscle and skin/fat. For kidney and liver, the withdrawal period was 25.2 days. Based on these results, we conclude that the residual effects of gentamicin in tissues of broilers and its withdrawal period is approximately 26 days. Considering the slaughter period of a broiler in Brazil ranges from 35 to 42 days, the use of gentamicin *in ovo* is plausible and does not cause damage to human health.

**Keywords:** broiler, gentamicin, eggs, tissue residue

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de antimicrobianos em programas sanitários preventivos e terapêuticos pode ocasionar o aparecimento de resíduos na carne e nos miúdos das aves destinadas ao consumo humano, o que compromete a garantia da segurança dos alimentos. Atualmente, a possibilidade da presença de resíduos de medicamentos em carne vem causando enorme preocupação à população e aos órgãos governamentais e, por conseguinte aqueles ligados a defesa do consumidor (PALERMO-NETO, 2005).

Tendo como base essa preocupação, no ano de 1986 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014b) desenvolveu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC, que tem como base a inspeção e fiscalização das cadeias produtivas de alimentos baseado em análise de risco, que visa monitorar a efetividade dos controles implementados pelos sistemas de produção e a respectiva qualidade e segurança dos produtos de origem animal e vegetal disponibilizados ao comércio e ao consumo.

Dentre as substâncias potencialmente nocivas a saúde do consumidor destaca-se os resíduos de produtos de uso veterinário, principalmente os antimicrobianos. Atualmente o MAPA, através da Instrução Normativa número 26 de 2009 (BRASIL, 2014a), estabeleceu os critérios mínimos para fabricação, comercialização e emprego dos produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo um deles a gentamicina.

As agências regulatórias internacionais definiram os limites máximos de resíduos para a gentamicina a fim de pesquisar os resíduos desse princípio ativo em diversas espécies animais. Para tanto, todo e qualquer produto de uso veterinário deve passar por ensaios visando à determinação do período de retirada e com isso evitar a disponibilização de produtos de origem animal deletério aos humanos (BRASIL, 2014a).

Diante disso, o objetivo do experimento foi avaliar os efeitos residuais da gentamicina em tecidos de frangos de corte, após a administração *in ovo* juntamente com a vacina contra a doença de *Marek*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais experimentais**

O experimento foi conduzido em duas fases: A primeira caracterizada pelo tratamento *in ovo*, realizada no incubatório da granja São José, (Amparo/SP) e a segunda o estudo de campo, etapa esta conduzida nas instalações do setor de criação de frangos do centro de pesquisas em animais do Brasil (CPABR - Amparo/SP). Todas as práticas realizadas foram devidamente aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CPABR, sob protocolo n° 129.

Foram incubados 200 ovos, com peso médio de 54g, oriundos de aves reprodutoras pesadas da linhagem comercial Cobb, com idade entre 30 e 50 semanas.

Todos os animais incluídos no estudo foram identificados com anilhas plásticas numeradas. Estas foram trocadas periodicamente, conforme o crescimento das aves, mantendo-se sempre a mesma numeração.

### **2.2. Ambiente e manejo**

Os ovos férteis provenientes das granjas de aves reprodutoras pesadas foram transferidos para o incubatório da granja São José e passaram pelo processo de incubação, vacinação/tratamento, conforme fluxo padrão do estabelecimento, para posterior transferência aos nascedouros.

Os ovos provenientes das granjas de matrizes de frango de corte foram encaminhados a uma sala de pré-aquecimento da Granja São José com temperatura controlada na faixa 24 a 27 °C e umidade relativa 40-50%, de modo que todos os ovos atingissem a temperatura desejada para transferência à incubadora evitando o choque térmico.

Após passagem pelo aquecimento inicial os ovos foram transferidos para as incubadoras (CASP CM-120), com temperatura na faixa 35,5 a 37,8 °C e umidade de 50 a 60%, com o número de viragens padronizadas para 1 viragem/hora em ângulo de 45° e capacidade de ventilação de 13,5

m<sup>3</sup>/hora/1000 ovos, onde permaneceram até a transferência para os nascedouros.

Na transferência da incubadora para o nascedouro, os ovos passaram pelo processo de vacinação com a máquina automática Intelliject<sup>®</sup>. A bandeja contendo os ovos seguiu sobre a esteira e parou sob as agulhas da vacinadora automática. Ocorreu a perfuração da casca do ovo e em seguida a administração da solução vacinal. O orifício foi vedado e as bandejas com ovos vacinados seguiram pela esteira, onde foram sugados por ventosas e transferidos para as caixas de eclosão, para posterior transferência ao nascedouro.

Todos os animais permaneceram em bandejas distintas identificadas no mesmo nascedouro até o nascimento. Após o nascimento, os pintinhos foram sexados, através da observação das inserções das penas primárias e secundárias, e posteriormente encaminhados ao aviário experimental. Este aviário se trata de um galpão de alvenaria, telado e coberto com telhas de amianto, subdividido em boxes (3 m<sup>2</sup>) forrados com cama de maravalha (5 cm de altura).

As aves foram distribuídas nos boxes de acordo com o grupo experimental e balanceados por sexo, onde permaneceram durante todo o período de estudo. Neste período, receberam ração isenta de quimioterápicos específica para fase, formulada para atender às exigências nutricionais, segundo Rostagno et al. (2011) e água *ad libitum*. O conforto térmico das aves foi regulado com o auxílio de ventiladores/exaustores e campânulas a gás, além de toda a estrutura de forração presente no aviário.

## **2.3. Procedimento experimental**

### **2.3.1. Preparo da solução vacinal e formulação testada**

Adicionaram-se 100 mL da formulação contendo sulfato de gentamicina a 44 mg/mL (equivalente a formulação F069) a 900 mL do diluente da vacina de *Marek*. Transcorridos 20 minutos, tempo este necessário para estabilização da solução, fez-se a reconstituição de 04 ampolas da vacina de

*Marek* (Cryomarex<sup>®</sup> HVT) com 1.000 mL do diluente específico contendo o sulfato de gentamicina.

### 2.3.2. Grupos experimentais

Aos 18 dias de incubação, 200 ovos receberam a vacina contra a doença de *Marek* contendo também o sulfato de gentamicina. O tratamento foi administrado no líquido amniótico por meio de agulhas, na dosagem de 0,05 mL da solução/ovo fértil equivalente a dose de 0,22 mg/ovo de gentamicina, com auxílio de sistema próprio para injeção *in ovo* (máquina vacinadora automática Intelliject<sup>®</sup>).

Foram formados cinco grupos, identificados como Grupos A ao E de acordo com o momento de abate, em quantidade proporcional de machos e fêmeas. Levando em consideração a mortalidade de embriões e ovos claros do total de ovos incubados, bem como possível mortalidade das aves na fase de crescimento e o balanceamento por sexo, foram selecionados para formação dos grupos aproximadamente 200 aves, das quais 108 foram consideradas para os momentos de abate e colheita de amostras.

Em decorrência ao baixo peso corporal das aves nos momentos definidos para abate, e objetivando atender a quantidade mínima de cada tecido para envio ao laboratório analítico, o número de aves abatidas em cada momento foi definido conforme Tabela 1. As amostras de músculo foram compostas por apenas um animal em cada repetição e as demais amostras foram compostas por mais de um animal por repetição, conforme preconizado pelo APVMA Residue Guideline nº 31 (AUSTRALIA, 2014).

**Tabela 1.** Colheita das amostras de tecido em frangos após a administração de gentamicina *in ovo* aos 18 dias de incubação.

Tratamento	Grupo	Dose (mg/ovo fértil)	Momento de abate	Número de repetições	Número de animais por repetição	Total de animais
Sulfato de gentamicina	A	0,22	D+14	6	6	36
	B		D+21	6	4	24
	C		D+28	6	4	24
	D		D+35	6	2	12
	E		D+42	6	2	12
Total de animais abatidos =						108

Legenda: D+14, D+21, D+28, D+35 e D+42 significam 14, 21, 28, 35 e 42 dias após o nascimento das aves, respectivamente.

### 2.3.3. Colheitas de amostras

Para a quantificação de gentamicina e seus metabólitos nas matrizes músculo, pele/gordura, rim e fígado (VICH, 2009), em cada ave abatida nos momentos pré-definidos foram colhidas amostras dos seguintes locais: músculos peitoral superficial e profundo, pele com gordura subcutânea da região peitoral, fígado e as porções craniais, médias e caudais dos rins. De cada repetição de animais, foram colhidas duas porções de aproximadamente 10 a 100 g de músculo, pele e gordura em proporções naturais (5 a 40 g), além do fígado inteiro (15 a 40 g) e os 2 rins inteiros (5 a 15 g).

As amostras de cada grupo de abate foram armazenadas em sacos plásticos separados, devidamente identificadas e armazenadas em freezer com temperatura de no mínimo -22°C até o envio ao laboratório analítico, local onde foram realizadas as análises cromatográficas.

### 2.3.4. Metodologia de quantificação da gentamicina nos tecidos

A quantificação de gentamicina em cada amostra de tecido foi realizada pelo laboratório Nanocore Biotecnologia S/A, de acordo com metodologia

previamente validada, baseada em normas internacionais e seguindo os critérios da IN 24 de 14 de julho de 2009 (BRASIL, 2014a). Este método analítico utilizou a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas e possibilitou a quantificação do composto gentamicina e seus metabólitos (C1, C1a, C2 e C2a). O limite de quantificação (LQ) desta metodologia foi definido a partir do limite máximo de resíduo (LMR) de 100 ug/kg fornecidos pelo FDA e The Japan Food Research Foundation (FDA, 2013; THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2013). Somente as quantificações acima do LQ foram consideradas fidedignas, visto que concentrações do analito abaixo disto foram somente detectados e não quantificados, não tendo exatidão e precisão nos resultados. Diante isto, os dados abaixo do LQ foram considerados  $<50\mu\text{g}/\text{kg}$ .

#### **2.4. Estatística**

A metodologia estatística empregada na análise dos dados seguiu as recomendações da EMA no Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods, Committee for Veterinary Medicinal Products – EMEA/CVMP/036/95 Final (EMA, 1995). O referido guia preconiza a técnica de regressão linear como método de primeira escolha para a determinação dos períodos de carência. De acordo com as recomendações deste guia, para a obtenção de uma reta de regressão linear, devem-se utilizar no mínimo três pontos quantificáveis distintos de abate. O programa utilizado para este cálculo é o WT 1.4 (Withdrawal-Time Calculation-Program) disponibilizado pela mesma agência regulatória.

Há casos onde a aplicação da metodologia de cálculo por regressão linear fica impossibilitada, como por exemplo, quando não há formação de um número mínimo de pontos para estabelecimento de uma reta de regressão. Nestes casos, utiliza-se o método alternativo que considera como período seguro aquele tempo de colheita onde a maioria das amostras apresenta seus valores de concentração abaixo do LMR, com a aplicação de um fator de segurança que varia de 10 a 30% (EMEA/CVMP/036/95 Final) (EMA, 1995).

Considerando-se os resultados obtidos nas análises cromatográficas, a metodologia mais adequada para análise dos resultados foi a metodologia alternativa proposta pela EMA.

### **3. RESULTADOS**

Os dados de concentração de gentamicina (soma dos metabólitos C1, C1a, C2 e C2a) apresentados a seguir foram separados por matrizes (fígado, rim, pele/gordura e músculo) e apresentados em função dos momentos de abate. As amostras de tecido foram enviadas ao laboratório analítico e quantificadas de forma gradativa e por isto o último momento de abate (D+42) não foi avaliado, pois os resultados no momento anterior já apresentavam abaixo do LMR estabelecido.

#### **3.1. Análise das concentrações residuais da gentamicina nos tecidos**

##### **3.1.1. Tecido muscular**

Considerando o LMR de 100 µg/kg (FDA, 2013; THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2013) para resíduos de gentamicina na matriz músculo, verificou-se que todas as amostras avaliadas em todos os momentos mantiveram-se abaixo do LMR e também do LQ estabelecido (50 µg/kg).

Devido as quantificações abaixo do LQ já no momento D+14, considerou-se este tempo acrescido de uma margem de segurança de 20%, resultando em um período de carência de 16,8 dias, ou seja, um período de retirada de 17 dias para a matriz músculo.

##### **3.1.2. Tecido adiposo**

Na matriz pele/gordura, verificou-se que todas as amostras avaliadas durante o estudo se mantiveram abaixo do LMR e LQ, exceto a amostra número um no momento D+14. Esta apresentou quantificação acima do LQ,

entretanto, abaixo do LMR. A média de concentração residual da somatória dos metabólitos da gentamicina (C1, C1a, C2 e C2a) apresentada pela única repetição quantificada no momento D+14 foi igual a 55,92 µg/kg.

Considerou-se o primeiro período de coleta, D+14, com uma margem de segurança de 20% para determinação do período de carência. Assim, a análise dos resultados culminou em um período de carência de 16,8 dias, ou seja, um período de retirada de 17 dias para os resultados de pele/gordura.

### 3.1.3. Tecido renal

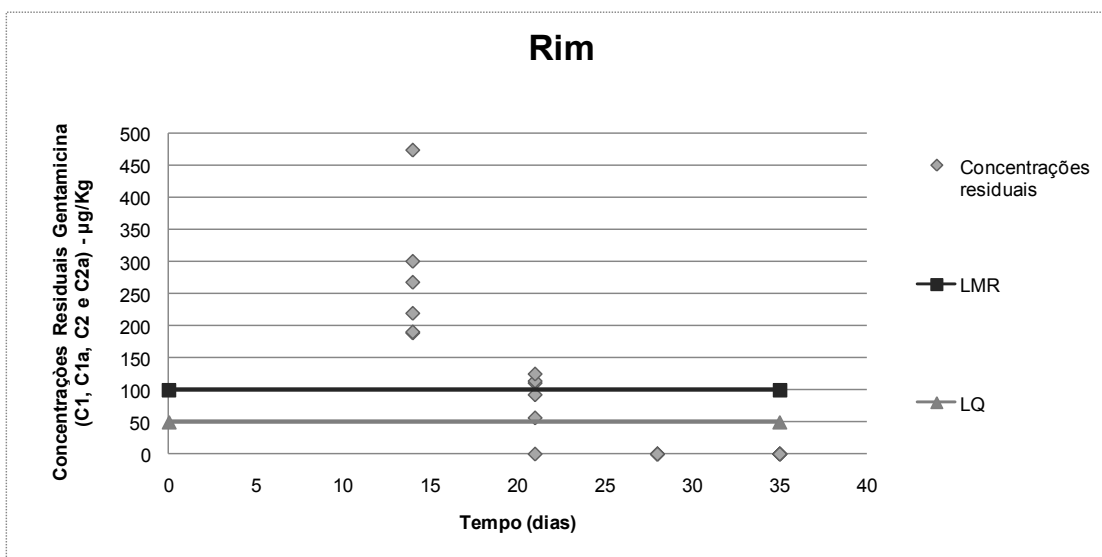
Na matriz rim, constatou-se que os resultados de três amostras do momento D+21, assim como em todas de D+28 e D+35, mantiveram-se abaixo do LMR. Já para o LQ, apenas uma amostra do momento D+21 e todas as amostras dos momentos D+28 e D+35 permaneceram abaixo deste limite. As médias de concentração residual da somatória dos metabólitos da gentamicina (C1, C1a, C2 e C2a) apresentada pelas repetições quantificadas em D+14 e D+21 foram de 273,59 e 99,66 µg/kg, respectivamente (Tabela 2 e Figura 1).

**Tabela 2.** Concentrações residuais da gentamicina (soma dos metabólitos C1, C1a, C2 e C2a) em rim de frangos, após a administração *in ovo* aos 18 dias de incubação.

Número da amostra ( <i>pool</i> )	Momentos (dias)			
	D+14	D+21	D+28	D+35
1	474,12	110,74	<50	<50
2	219,53	92,44	<50	<50
3	188,83	113,86	<50	<50
4	267,96	56,42	<50	<50
5	300,62	<50	<50	<50
6	190,48	124,85	<50	<50
<b>Média</b>	273,59	99,66	<50	<50

Legenda: Resultado em µg/kg.

<50 – concentrações abaixo do LQ (50 µg/kg)



**Figura 1.** Concentrações residuais das 24 amostras *versus* tempo da gentamicina (soma dos metabólitos C1, C1a, C2 e C2a) em rim de frango de corte. Valores abaixo do LQ foram considerados iguais a zero nesta representação gráfica.

Para determinação do período de carência na matriz rim, e avaliando os resultados supracitados, considerou o ponto de colheita D+21 com uma margem de segurança de 20%. Desta forma, a quantificação resultou em um período de carência de 25,2 dias, ou seja, um período de retirada de 26 dias para o resultado de rim.

#### 3.1.4. Tecido hepático

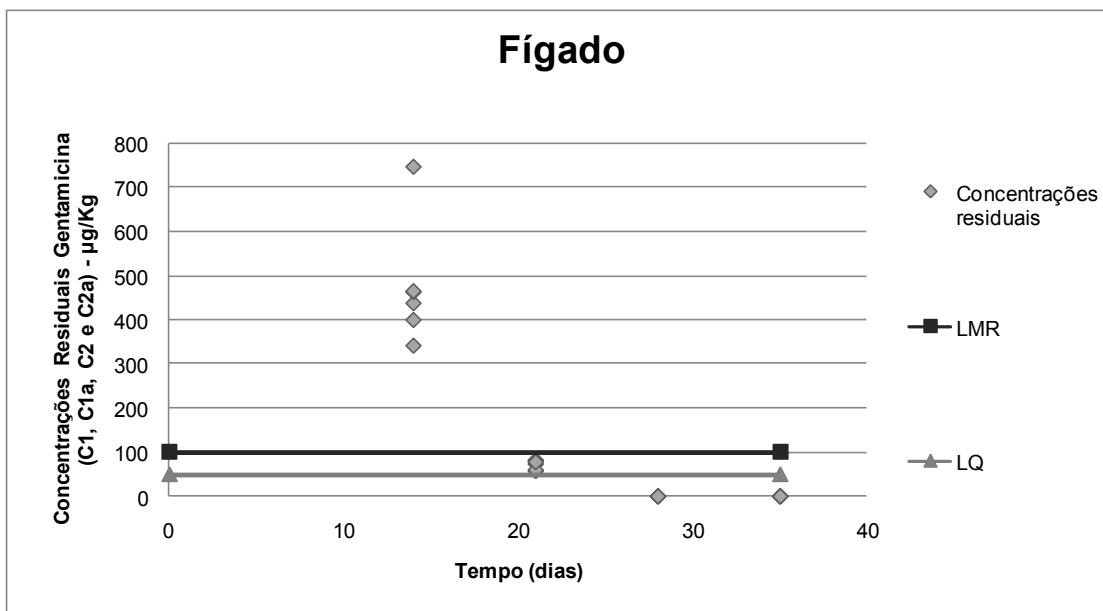
Já na matriz fígado, os resultados obtidos em D+14 para todas as repetições apresentaram valores acima do LMR definido, diferentemente dos momentos D+21, D+28 e D+35. Quanto ao LQ, apenas as amostras dos momentos D+28 e D+35 permaneceram abaixo deste limite. As médias de concentração residual da somatória dos metabólitos da gentamicina (C1, C1a, C2 e C2a) apresentadas pelas repetições dos momentos D+14 e D+21 foram de 476,96 e 71,85 µg/kg, respectivamente (Tabela 3 e Figura 2).

**Tabela 3.** Concentrações residuais da gentamicina (soma dos metabólitos C1, C1a, C2 e C2a) em fígado de frangos, após a administração *in ovo* aos 18 dias de incubação.

Número da amostra ( <i>pool</i> )	Momentos (dias)			
	D+14	D+21	D+28	D+35
1	749,01	82,27	<50	<50
2	400,87	57,41	<50	<50
3	342,42	80,47	<50	<50
4	438,90	73,17	<50	<50
5	464,19	59,92	<50	<50
6	466,39	77,84	<50	<50
<b>Média</b>	476,96	71,85	<50	<50

Legenda: Resultado em µg/kg.

<50 – concentrações abaixo do LQ (50 µg/kg)



**Figura 2.** Concentrações residuais das 24 amostras *versus* tempo da gentamicina (soma dos metabólitos C1, C1a, C2 e C2a) em fígado de frango de corte. Valores abaixo do LQ foram considerados iguais a zero nesta representação gráfica.

Para obtenção do período de carência no fígado de frangos, considerou-se o ponto de colheita D+21, que somado a uma margem de segurança de 20%, resultou em um período de carência de 25,2 dias, ou seja, um período de retirada de 26 dias para o resultado de fígado.

#### 4. DISCUSSÃO

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos amplamente utilizados em animais produtores de alimentos, por isso, é de grande importância a

determinação dos efeitos residuais destes medicamentos nos tecidos de animais destinados à alimentação humana, visando a segurança dos alimentos. Para isto, após análise minuciosa dos estudos toxicológicos e farmacocinéticos do respectivo princípio ativo (PALERMO-NETO, 2005), órgãos reguladores mundialmente reconhecidos fixaram o LMR. A partir daí, este é considerado o nível máximo de resíduo que se pode ter em um determinado alimento, para que o homem possa consumir de forma normal e abundante (ERRECALDE, 2004).

Cabe ressaltar que, para evitar problemas de resíduos nos alimentos de origem animal, as boas práticas da administração de medicamentos devem ser seguidas. Deve-se também utilizar os medicamentos em conformidade com suas respectivas bulas, uma vez que a depleção de resíduos de um fármaco varia na dependência do veículo, forma farmacêutica, dose, via de administração e também da espécie animal indicada (PALERMO-NETO, 2005).

Para monitorar a presença de resíduos ou contaminantes em produtos de origem animal, as estâncias fiscalizadoras de diversos países realizam anualmente um plano estratégico a fim de detectar estes resíduos. No Brasil, o PNCR no ano de 2013 analisou cerca de 490 amostras de carne de aves, e em nenhuma destas foi detectado resíduo de antimicrobianos, dentre estes, a gentamicina (BRASIL, 2014c). Da mesma maneira, os resultados de monitoramento de resíduos de antibióticos em carne bovina, suína, aves e de cavalos para os anos de 2008/2009 mostraram que 99,97% das amostras estavam em conformidade com a legislação brasileira, exceto uma amostra. Dentro dos limites permitidos (abaixo do LMR), os principais antibióticos encontrados foram lincomicina, tilmicosina, tilosina, eritromicina, gentamicina, neomicina e diidroestreptomicina (NONAKA et al., 2012).

Estes dados mostram que o uso dos antibióticos no Brasil apresentam uma tendência de uso adequado, respeitando as boas práticas veterinárias. No entanto, o Programa Nacional de Resíduos dos EUA apresenta quantificações de antimicrobianos acima dos LMRs, e dentre estes constatou que a classe dos aminoglicosídeos foi a mais detectada em alimentos de origem animal no ano de 2000 (GEHRING et al., 2005).

No presente experimento, amostras de tecidos de fígado, rim, pele/gordura e músculo, provenientes de animais tratados com 0,22 mg de gentamicina *in ovo* foram processadas para determinação de resíduos, e estes comparados com o LMR específico do antimicrobiano em questão, para cada matriz biológica. As quantificações de gentamicina na pele/gordura e músculo foram consideradas irrelevantes, em razão de que apenas uma amostra de pele/gordura apresentou quantificação de gentamicina aos 14 dias de idade das aves, porém abaixo do LMR. A ausência de resíduos no músculo, assim como a mínima presença na pele/gordura pode estar relacionada com a natureza hidrofílica da gentamicina (CHAMBERS; SANDE, 1996; EMEA, 2001; ITO et al., 2005; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). Normalmente, os aminoglicosídeos não ultrapassam membranas biológicas que não apresentem mecanismos ativos de transporte. Portanto, estes compostos apresentam baixa concentração intracelular na grande maioria dos tecidos animais (PAES, 2012). Todavia, no ano de 1995, a Organização Mundial da Saúde relatou que o antimicrobiano gentamicina foi detectado em concentrações quantificáveis de 0,2 mg/kg em pele/gordura em frangos de sete dias, após a administração de 0,2 mg, via SC, no primeiro dia de vida das aves (WHO, 2014).

Em relação ao músculo, os resultados abaixo do limite de quantificação observados também foram relatados em vários estudos nas espécies suína e bovina citados pela EMEA (2001). Abo-El-Sooud et al. (2012) observaram, com a utilização de doses de 5 mg/kg de gentamicina via IM na coxa ou peito, similaridade nas detecções deste antimicrobiano nos respectivos músculos, dado que somente até 12 horas as quantificações foram observadas.

No caso do fígado e rim, verificou-se que a gentamicina teve maior tendência ao acúmulo nestas matrizes, com maior permanência no tecido renal. Estes resultados concordam com os observados por Abo-El-Sooud et al. (2012) e Who (2014), onde as concentrações mais elevadas de gentamicina foram observadas no tecido renal e hepático. Alguns autores, entretanto, obtiveram resultados que não condizem com uma possível eliminação tardia da gentamicina nas matrizes rim e fígado. Abo-El-Sooud et al. (2012) quantificaram este princípio ativo no rim até 48 horas após a

administração na musculatura peitoral e até 24 horas quando aplicada no músculo da coxa. Já WHO (2014) verificou concentrações teciduais de gentamicina por até sete dias, após a administração de 0,2 mg de gentamicina via subcutânea em pintinhos.

Essa classe de antimicrobianos não sofrem processo de metabolização e são eliminados como produtos inalterados (CHAMBERS, 2001; TAVARES, 2002; RIVIERE; SPOO, 2003). Cerca de 80 - 85% da gentamicina é excretada via urina, e o restante se acumula sobre as células corticais renais (MARTÍNEZ-SALGADO, HERÁNDEZ-LÓPEZ; NOVOA-LÓPEZ, 2007; LÓPEZ; OLVERA, 2008), onde praticamente não ocorre biotransformação. Este acúmulo se deve a alta concentração de fosfatidil inositol nos tecidos renais, onde os aminoglicosídeos catiônicos se ligam aos fosfolipídios da parede celular (atração eletrostática) (ITO et al., 2005). A partir daí, através de mecanismos de transporte ativo, acumulam-se no interior das células tubulares proximais (PAES, 2012).

Além dos estudos já citados quanto ao uso de gentamicina pela via parenteral, a imersão de ovos férteis em solução de gentamicina parece proporcionar a mesma cinética residual. Quando a imersão ocorreu em solução de gentamicina a 500 ppm, demonstrou a perpetuação deste antimicrobiano nos rins de perus até a quarta semana após o tratamento, onde no fígado, músculo e gordura a concentração não foi quantificada (BICKFORT; LOY; BARNES, 1973). Corroborando com esses autores, Gehring et al., (2005) observaram que os aminoglicosídeos persistem nos rins, apesar de desaparecerem relativamente rápido do plasma e outros tecidos comestíveis.

Já em relação as quantificações de gentamicina no fígado, Paes (2012) relatou que os aminoglicosídeos proporcionam concentrações terapêuticas adequadas em fígado, baço, pulmões, rins, linfa, bile e líquido sinovial. No entanto, como citado anteriormente, uma característica primordial é sua marcante afinidade pelo tecido cortical renal, onde sofrem acúmulo, apresentando concentrações que superam a plasmática em até 50 vezes (CHAMBERS, 2001; TAVARES, 2002; RIVIERE; SPOO, 2003).

As quantificações de gentamicina em suínos e bovinos de corte também seguiram a mesma premissa, onde a deposição no tecido renal foi

quantificada por um período mais prolongado do que nas demais matrizes (EMEA, 2001).

Após o cálculo do período de carência, conforme recomendado pelo guia da EMA, pode-se verificar que o abate de frangos tratados com 0,22 mg de gentamicina *in ovo* no 18° dia de incubação apresentou 26 dias de período de retirada para frangos de corte. Os resultados deste estudo são promissores, já que diversos autores relatam que o período de carência da gentamicina injetável nos tecidos varia em torno de 35 dias para frangos (FDA, 2014a; GEHRING et al., 2005; LÓPEZ; OLVERA, 2008; AGUNOS; LEGER; CARSON, 2012; FDA, 2014b). Nenhum estudo similar ao realizado foi encontrado em literatura, e todos os estudos disponíveis consideraram a aplicação deste antimicrobiano nos primeiros dias após o nascimento. Apesar da gentamicina permanecer no tecido renal por um período elevado, nenhum efeito nefrotóxico foi constatado, dado que este efeito estaria relacionado ao acúmulo de aminoglicosídeos nas células do túbulo proximal. Conforme já abordado pela literatura, o pico da concentração não foi correlacionado com a postulada nefrotoxicidade da gentamicina, uma vez que intervalos maiores entre doses ou doses únicas resultam em menor contato do medicamento com o tecido renal (CHAMBERS, 2001; TAVARES, 2002; DOWLING, 2010).

Considerando-se o período de abate de um frango de corte definido pelas exigências de mercado, que varia entre 35 e 42 dias (SILVA; VIEIRA, 2012), a utilização da gentamicina injetável em questão na dose de 0,22 mg/ovo no 18° dia de incubação é plausível, de modo que quando utilizada conforme as boas práticas veterinárias não ocasiona resíduos deste antimicrobiano nos alimentos.

## **5. CONCLUSÃO**

Em conformidade com as condições experimentais deste estudo, concluiu-se que o período de carência determinado para o consumo de tecidos de frangos de corte, tratados com 0,22 mg/ovo de sulfato de gentamicina em associação com a vacina contra a doença de *Marek*, é de 26 dias. Diante disto, a partir deste período o consumo de frango tratado com a gentamicina em questão poderá ser realizado, sem causar danos à saúde pública.

## 6. REFERÊNCIAS

ABO-EL-SOUD, K.; SWIELIM, G. A. KHALIFA, E. F.; EL-GAMMAL, S. M. Effect of different sites of intramuscular injection on elimination, bioavailability and tissue residues profile of gentamicin in broiler chickens. **Insight Poultry Research**, New York, v. 2, p. 1-7, 2012.

AGUNOS; A.; LEGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 53, p. 1289–1300, 2012.

AUSTRALIA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. **Residue guideline nº 31** – residues in poultry tissue and eggs. Disponível em: <[http://archive.apvma.gov.au/transition/guidelines/docs/rgl\\_31.pdf](http://archive.apvma.gov.au/transition/guidelines/docs/rgl_31.pdf)>. 20 jun. 2014.

BICKFORD, S. M.; LOY, J. I.; BARNES, L. E. Gentamicin concentrations in turkey eggs and in tissues of progeny following egg dipping. **Avian Diseases**, St. Paul, v. 17, n. 2, p. 301-307, 1973.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº24 (MAPA), de 19 de julho de 2009**: dispõe sobre os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa (MAPA) Nº 26, de junho de 2009**: aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2014a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986**: Plano Nacional de Controle de Resíduos em produto de origem animal – PNCR. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 04 ago. 2014b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria SDA Nº 60, de 07 de maio de 2014**: publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em carnes (bovina, suína, de aves, de avestruz e equina), em leite, ovos, mel e pescado. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2014c.

CHAMBERS, H. F. The aminoglycosides. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman`s: the pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Farmacos antimicrobianos. In.: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman** - las bases farmacológicas de la terapéutica. 8. ed. Mexico: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, 1996. cap. 46.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasília/DF – 2013. **Diretrizes de prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.** Disponível em: <[www.cobea.org.br/arquivo/download?ID\\_ARQUIVO=36](http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=36)>. Acesso em: 10 mar. 2013.

DOWLING, P. M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária.** 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 2010. cap. 13, p. 213-237.

EMEA. European Union Agency. **CVMP/036/95** - note for guidance approach towards harmonisation of withdrawal periods. 1995.

EMEA. European Union Agency. **MRL/803/01-final.** Committee Veterinary Products - Gentamicin – Summary Report, 2001.

ERRECALDE, J. O. **Uso de antimicrobianos em animales de consumo. incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública.** Roma: FAO - Organización de las Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación, 2004.

FDA. Food and Drug Administration. 2012. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**– food and drugs . chap. 1 –Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=556&showFR=1&subpartNode=21:6.0.1.1.17.2>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

FDA. Food and Drug Administration. **ANADA 200 147:** gentamicin sulfate injection - original approval. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm118319.htm>>. Acesso em: 16 set. 2014a.

FDA. Food and Drug Administration. **ANADA 200 468:** gentamed-p for poultry injection chickens and turkeys. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/UCM396874.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2014b.

GEHRING, R.; HASKELL, S. R.; PAYNE, M. A.; CRAIGMILL, A. L.; WEBB, A. I.; RIVIERE, J. E. Aminoglycoside residues in food of animal origin. Vet Med Today: FARAD Digest. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 1, p. 63-66, 2005.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: Usos preventivos e curativos na avicultura. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Editora Roca, 2005. cap. 8, p. 115-147.

LÓPEZ, H. S.; OLVERA, L. G. Aminoglicósidos. In: SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L. **Farmacología clínica em aves**. 3. ed. México: Avimex Salud Animal, 2008. p. 134-139

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; HENÁNDEZ-LÓPEZ, F. J.; NOVOA-LÓPEZ J. M. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 223, n. 1, p. 86-98, 2007.

NONAKA, C. K. V.; OLIVEIRA, A. M. G.; PAIVA, C. R.; ALMEIDA, M. P.; REZENDE, C. P.; MORAES, C. G. O.; BOTELHO, B. G.; SOUZA, L. F.; DIAS, P. G. Occurrence of antimicrobial residues in Brazilian food animals in 2008 and 2009. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 29, n. 4, p. 526–534, 2012.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidades dos aminoglicosídeos. **The Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

PAES, A. C. Aminoglicosídeos. In: BARROS, C. M.; DI STASI, L. C. **Farmacologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2012. séc. 7, cap. 5, p. 387-394.

PALERMO-NETO, J. Resíduos de medicamentos veterinários em carne de frango e ovos. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. **Farmacologia aplicada a avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Roca, 2005. p. 287-301.

RIVIERE, J. C.; SPOO, J. W. Antibióticos aminoglicosídeos. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SILVA; I. J. O.; VIEIRA, F. M. C. Manejo pré-abate de frangos de corte em dias frios os cuidados com a ambiência e bem-estar das aves transportadas durante o inverno. **Thesis**, São Paulo, v. 8, n. 17, p. 79-90, 2012.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Maximum Residue Limits (MRLs) of Agricultural Chemicals in Foods**. Disponível em: <[http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a\\_inq=23800](http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=23800)>. Acesso em: 10 mar. 2013.

VICH Topic GL48. **Guideline on studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods**. At step 4. EMEA/CVMP/VICH/463199/2009-CONSULTATION. London, 14 December 2009.

WHO. World Health Organization. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**: forty-third report of the joint FAO/WHO Committee on Food Additives. World Health Organization, Geneva 1995. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41725/1/WHO\\_TRS\\_855.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41725/1/WHO_TRS_855.pdf?ua=1)>. Acesso em: 09 ago. 2014.

## ANEXOS CAPÍTULO II

**Anexo 1.** Valores individuais da contagem total de hemácias (He,  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), porcentagem de hematócrito (Ht, %), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e concentração corpuscular média (CHCM, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+6.

Grupo	Animal	He	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM
GC	5	1,13	7,9	22	194,7	69,9	35,9
	11	1,84	10,5	26	141,3	57,1	40,4
	12	1,73	10,2	24	138,7	59	42,5
	15	1,95	9,1	20	102,6	46,7	45,5
	22	1,17	10	15	128,2	85,5	66,7
	24	1,28	8,3	22	171,9	64,8	37,7
	26	1,6	10,1	21	131,3	63,1	48,1
	33	1,18	6,9	23	194,9	58,5	30
	36	2,15	6,3	24	111,6	29,3	26,3
	46	1,96	8,5	27	137,8	43,4	31,5
	47	1,76	7,5	25	142	42,6	30
	48	1,51	9,4	21	139,1	62,3	44,8
GT	57	1,76	9,9	21	119,3	56,3	47,1
	58	1,64	9,3	25	152,4	56,7	37,2
	60	1,74	9,8	21	120,7	56,3	46,7
	65	2,09	8,1	26	124,4	38,8	31,2
	67	2,03	10,3	24	118,2	50,7	42,9
	68	1,26	9,1	20	158,7	72,2	45,5
	76	2,03	9,4	24	118,2	46,3	39,2
	81	1,79	9,2	25	139,7	51,4	36,8
	83	2,21	8,9	25	113,1	40,3	35,6
	85	1,77	9,6	19	107,3	54,2	50,5
	89	1,7	9,3	26	152,9	54,7	35,8
	90	1,24	8,1	18	145,2	65,3	45

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 2..** Valores individuais da contagem total de hemácias (He,  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), porcentagem de hematócrito (Ht, %), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e concentração corpuscular média (CHCM, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+10.

Grupo	Animal	He	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM
GC	2	2,03	11,8	35	172,4	58,1	33,7
	3	1,28	9,5	20	156,3	74,2	47,5
	10	1,49	10	28	187,9	67,1	35,7
	13	1,59	10	24	150,9	62,9	41,7
	19	1,75	11,7	30	171,4	66,9	39
	23	1,32	11,6	28	212,1	87,9	41,4
	28	1,83	10,4	25	136,6	56,8	41,6
	30	1,37	9,3	24	175,2	67,9	38,8
	34	1,65	10,5	22	133,3	63,6	47,7
	40	1,54	8,9	24	155,8	57,8	37,1
	43	1,37	10,7	25	182,5	78,1	42,8
	45	1,26	9,6	26	206,3	76,2	36,9
	GT	50	1,25	9,4	24	192	75,2
56		1,77	9,1	26	146,9	51,4	35
64		1,8	8,2	25	138,9	45,6	32,8
71		1,4	9,7	26	185,7	69,3	37,3
72		1,33	9,7	24	180,5	72,9	40,4
74		1,9	12,1	22	115,8	63,7	55
78		1,55	10,7	27	174,2	69	39,6
80		1,91	10	29	151,8	52,4	34,5
87		1,53	12,8	25	163,4	83,7	51,2
88		1,43	9	25	174,8	62,9	36
91		1,56	9,3	21	134,6	59,6	44,3
98		1,71	7,8	22	128,7	45,6	35,5

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 3.** Valores individuais da contagem total de hemácias (He,  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), porcentagem de hematócrito (Ht, %), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e concentração corpuscular média (CHCM, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+14.

Grupo	Animal	He	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM
GC	6	1,99	10,7	28	140,7	53,8	38,2
	8	1,53	10,8	27	176,5	70,6	40
	9	1,74	12,2	26	149,4	70,1	46,9
	16	1,65	11,9	20	121,2	72,1	59,5
	18	1,88	11,9	26	138,3	63,3	45,8
	20	1,91	10,9	28	146,6	57,1	38,9
	27	2,05	11,8	30	146,3	57,6	39,3
	29	1,31	6,8	19	145	51,9	35,8
	35	2,15	10,6	30	139,5	49,3	35,3
	37	1,85	12,6	24	129,7	68,1	52,5
	38	1,65	12,8	26	157,6	77,6	49,2
	44	1,83	11,5	29	158,5	62,8	39,7
	GT	49	1,56	12,6	24	153,8	80,8
53		1,28	11,1	22	171,9	86,7	50,5
52		1,83	12,2	26	142,1	66,7	46,9
63		2,04	10,6	28	137,3	52	37,9
69		1,98	10,9	27	136,4	55,1	40,4
70		1,23	10,8	19	154,5	87,8	56,8
79		1,66	9,7	28	168,7	58,4	34,6
82		2,02	12,5	31	153,5	61,9	40,3
84		2,11	11,1	29	137,4	52,6	38,3
86		1,49	11,8	23	154,4	79,2	51,3
93		1,58	12,3	30	189,9	77,8	41
96		1,7	11,9	34	200	70	35

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 4.** Valores individuais da contagem total de hemácias (He,  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (Hb, g/dL), porcentagem de hematócrito (Ht, %), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg) e concentração corpuscular média (CHCM, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+21.

Grupo	Animal	He	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM
GC	1	1,54	10,5	19	123,4	68,2	55,3
	4	2,26	12,5	23	101,8	55,3	54,3
	7	2,62	11,9	28	106,9	45,4	42,5
	14	1	5,2	10	100	52	52
	17	2	11,9	25	125	59,5	47,6
	21	2,38	13,7	27	113,4	57,6	50,7
	25	1,72	11,4	19	110,5	66,3	60
	31	1,97	11,6	23	116,8	58,9	50,4
	32	2,15	11	26	120,9	51,2	42,3
	39	2,21	11,5	24	108,6	52	47,9
	41	2,23	11,2	27	121,1	50,2	41,5
	42	1,3	10,5	16	123,1	80,8	65,6
GT	51	1,39	10,5	19	136,7	75,5	55,3
	54	2,48	10,8	27	108,9	43,5	40
	55	2,47	12,1	28	113,4	49	43,2
	61	1,85	11,6	22	118,9	62,7	52,7
	66	1,71	11,4	20	117	66,7	57
	73	2,42	10,1	26	107,4	41,7	38,8
	75	2,27	10,5	24	105,7	46,3	43,8
	77	2,34	11,1	25	106,8	47,4	44,4
	95	2,55	12,8	33	129,4	50,2	38,8
	97	2,67	11,8	28	104,9	44,2	42,1
99	2,65	12,5	29	109,4	47,2	43,1	
100	2,28	11	26	114	48,2	42,3	

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 5.** Valores individuais da contagem total (LEU, células/ $\mu$ L) e diferencial de leucócitos [heterófilos (HET, células/ $\mu$ L), linfócitos (LINF, células/ $\mu$ L), eosinófilos (EOS, células/ $\mu$ L), monócitos (MONO, células/ $\mu$ L) e basófilos (BAS, células/ $\mu$ L)], em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+6.

Grupo	Animal	LEU	HET	LINF	EOS	MONO	BAS
GC	5	5000	2050	2850	50	0	50
	11	3000	1410	1590	0	0	0
	12	3000	1530	1470	0	0	0
	15	4000	440	3520	40	0	0
	22	4000	1840	2080	80	0	0
	24	2000	900	1100	0	0	0
	26	6000	2040	3960	0	0	0
	33	4000	1720	2240	40	0	0
	36	5000	1200	3750	0	50	0
	46	5000	1850	3050	50	0	50
	47	3000	1230	1710	30	30	0
48	2000	1140	840	20	0	0	
GT	57	4000	2800	1160	0	40	0
	58	3000	1860	1140	0	0	0
	60	6000	3360	2520	60	60	0
	65	9000	4680	4230	90	0	0
	67	2000	1100	860	20	20	0
	68	5000	3450	1550	0	0	0
	76	5000	3050	1850	50	50	0
	81	3000	1170	1800	30	0	0
	83	7000	4060	2940	0	0	0
	85	5000	900	4000	0	100	0
	89	5000	2550	2450	0	0	0
90	6000	3900	2040	60	0	0	

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 6.** Valores individuais da contagem total (LEU, células/ $\mu$ L) e diferencial de leucócitos [heterófilos (HET, células/ $\mu$ L), linfócitos (LINF, células/ $\mu$ L), eosinófilos (EOS, células/ $\mu$ L), monócitos (MONO, células/ $\mu$ L) e basófilos (BAS, células/ $\mu$ L)], em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+10.

Grupo	Animal	LEU	HET	LINF	EOS	MONO	BAS
GC	2	8000	1520	6400	0	80	0
	3	5000	1900	3050	0	50	0
	10	4000	1040	2880	40	40	0
	13	5000	650	4350	0	0	0
	19	4000	520	3480	0	0	0
	23	5000	1900	3100	0	0	0
	28	9000	1530	7380	0	90	0
	30	6000	360	5640	0	0	0
	34	6000	1200	4800	0	0	0
	40	6000	3720	2220	60	0	0
	43	6000	2040	3900	0	60	0
	45	4000	1120	2880	0	0	0
GT	50	5000	2400	2600	0	0	0
	56	5000	2950	1950	50	50	0
	64	5000	3200	1750	50	0	0
	71	5000	1750	3150	0	100	0
	72	9000	2340	6570	0	90	0
	74	6000	2220	3660	60	60	0
	78	6000	660	5340	0	0	0
	80	4000	1600	2320	0	40	40
	87	4000	1840	2160	0	0	0
	88	6000	3540	2340	60	60	0
	91	4000	1320	2600	40	40	0
	98	8000	2640	5200	160	0	0

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 7.** Valores individuais da contagem total (LEU, células/ $\mu$ L) e diferencial de leucócitos [heterófilos (HET, células/ $\mu$ L), linfócitos (LINF, células/ $\mu$ L), eosinófilos (EOS, células/ $\mu$ L), monócitos (MONO, células/ $\mu$ L) e basófilos (BAS, células/ $\mu$ L)], em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+14.

Grupo	Animal	LEU	HET	LINF	EOS	MONO	BAS
GC	6	6000	2580	3300	120	0	0
	8	6000	1440	4440	60	60	0
	9	5000	2100	2800	100	0	0
	16	7000	3220	3780	0	0	0
	18	6000	4200	1800	0	0	0
	20	10000	4800	5100	100	0	0
	27	5000	2600	2400	0	0	0
	29	8000	5280	2640	80	0	0
	35	6000	3420	2520	60	0	0
	37	14000	9520	4480	0	0	0
	38	5000	2300	2550	50	100	0
	44	7000	4060	2800	70	70	0
GT	49	6000	2760	3060	60	120	0
	53	5000	2050	2900	0	50	0
	52	5000	2750	2200	0	50	0
	63	5000	1900	2950	100	50	0
	69	7000	3430	3570	0	0	0
	70	13000	11700	1040	0	260	0
	79	5000	3300	1600	0	100	0
	82	6000	1620	4320	60	0	0
	84	6000	2220	3720	0	60	0
	86	8000	6160	1760	80	0	0
	93	6000	3120	2760	0	120	0
	96	5000	3300	1650	0	50	0

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 8.** Valores individuais da contagem total (LEU, células/ $\mu\text{L}$ ) e diferencial de leucócitos [heterófilos (HET, células/ $\mu\text{L}$ ), linfócitos (LINF, células/ $\mu\text{L}$ ), eosinófilos (EOS, células/ $\mu\text{L}$ ), monócitos (MONO, células/ $\mu\text{L}$ ) e basófilos (BAS, células/ $\mu\text{L}$ )], em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+21.

Grupo	Animal	LEU	HET	LINF	EOS	MONO	BAS
GC	1	10000	7900	1400	100	600	0
	4	5000	2350	2150	0	500	0
	7	9000	5400	2790	90	720	0
	14	10000	6400	2400	300	900	0
	17	8000	4560	3040	80	320	0
	21	5000	3000	1650	50	300	0
	25	12000	9720	1800	120	360	0
	31	17000	11050	3060	0	2890	0
	32	10000	5400	3200	0	1300	100
	39	13000	7540	4030	0	1430	0
	41	6000	1920	3360	0	720	0
	42	12000	9720	1200	120	840	120
GT	51	24000	20640	2160	0	1200	0
	54	13000	5850	5720	0	1430	0
	55	6000	2700	1620	0	1680	0
	61	25000	21000	2500	0	1500	0
	66	10000	7200	2400	200	200	0
	73	7000	3150	3150	0	700	0
	75	6000	2400	2880	0	720	0
	77	8000	1920	2880	0	3200	0
	95	8000	4800	2400	80	720	0
	97	10000	3100	5700	0	1200	0
99	8000	5120	2560	0	320	0	
100	6000	2760	1560	60	1620	0	

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 9.** Valores individuais da uréia (UR, mg/dL), ácido úrico (AcUr, mg/dL), aspartato aminotransferase (AST, UI/L), alanina aminotransferase (ALT, UI/L), gama glutamiltransferase (GGT, UI/L), creatina quinase (CK, UI/L), albumina (ALB, g/dL) e proteína plásmicas totais (PPT, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+6.

Grupo	Animal	UR	AcUr	AST	ALT	GGT	CK	ALB	PPT
GC	5	8	11,5	242	25	44	2089	1,4	3
	11	4	8,6	513	218	69	1146	2,2	2,4
	12	11	8,4	274	40	41	1455	1	2,4
	15	10	14,7	227	32	36	527	1	2
	22	5	5,7	218	24	21	1926	1,8	2
	24	18	4,4	342	66	25	741	1	1,8
	26	12	10,3	217	61	26	748	1,3	2
	33	11	11,1	205	35	37	809	1,1	2,2
	36	19	11,6	428	364	36	602	1,4	2,2
	46	21	16,8	226	47	47	4216	1,5	3
	47	10	12,4	634	672	54	1559	1,6	2,8
	48	20	11,3	720	533	23	408	1,1	1,8
GT	57	6	10,1	202	25	15	1566	1,1	2,4
	58	6	11,3	711	66	34	957	1,2	2,8
	60	12	7,2	170	76	60	646	1	1,6
	65	12	11,7	628	67	34	189	1,5	2,4
	67	66	3,1	174	42	20	495	1	3,2
	68	16	9,1	392	58	56	644	0,6	1,4
	76	8	11,5	340	20	72	950	1,1	3
	81	6	6,6	295	14	24	1030	1,8	1,6
	83	5	8,3	348	29	63	1455	1,2	2,8
	85	21	14	303	186	77	1137	1,3	2,4
	89	16	10,7	786	668	44	755	1,4	2,2
	90	21	7,9	169	497	24	240	0,7	1

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 10.** Valores individuais da uréia (UR, mg/dL), ácido úrico (AcUr, mg/dL), aspartato aminotransferase (AST, UI/L), alanina aminotransferase (ALT, UI/L), gama glutamiltransferase (GGT, UI/L), creatina quinase (CK, UI/L), albumina (ALB, g/dL) e proteína plásmaticas totais (PPT, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+10.

Grupo	Animal	UR	AcUr	AST	ALT	GGT	CK	ALB	PPT
GC	2	21	7,3	154	200	31	1736	1	2
	3	24	10,3	281	168	25	2278	1	2
	10	25	14,3	966	342	12	1817	1	3
	13	11	13,4	191	18	26	692	1	3
	19	32	11,4	821	255	15	2664	2	3
	23	17	11,5	216	126	27	2234	2	3
	28	17	12,1	126	19	24	396	1	2
	30	15	13,7	213	51	22	418	1	3
	34	18	11	144	136	24	1292	1	1
	40	18	12	222	576	31	478	1	1
	43	19	10,1	181	45	40	644	1	3
45	2	12,9	432	113	7	4558	2	3	
GT	50	14	12	180	267	12	658	1	3
	56	14	11,6	303	88	14	1073	2	2
	64	4	3,7	562	182	28	1037	2	3
	71	7	12,3	226	59	13	1583	1	3
	72	13	10,3	693	161	3	1603	1	2
	74	61	11,9	477	129	7	410	1	2
	78	4	13,5	167	113	14	1044	2	3
	80	12	10,7	948	253	6	410	1	3
	87	6	7,2	224	16	12	5233	2	3
	88	7	9,5	225	11	8	1360	2	4
	91	16	9,8	507	56	20	6445	2	4
98	29	7,7	997	278	13	7424	2	2	

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 11.** Valores individuais da uréia (UR, mg/dL), ácido úrico (AcUr, mg/dL), aspartato aminotransferase (AST, UI/L), alanina aminotransferase (ALT, UI/L), gama glutamiltransferase (GGT, UI/L), creatina quinase (CK, UI/L), albumina (ALB, g/dL) e proteína plásmicas totais (PPT, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de *Marek* (GC) ou associada a gentamicina (GT),, no momento D+14.

Grupo	Animal	UR	AcUr	AST	ALT	GGT	CK	ALB	PPT
GC	6	20	10,2	285	28	14	1379	1	3
	8	32	13,9	331	258	22	1739	2	3
	9	18	8,6	698	343	4	2499	2	2
	16	19	4,3	108	58	18	2829	1	1
	18	35	4,4	570	413	3	850	1	2
	20	4	10,1	177	62	9	4600	1	2
	27	7	6,2	339	18	12	593	2	4
	29	22	2,2	342	272	27	522	1	2
	35	26	8,4	569	27	14	787	2	3
	37	26	4,9	846	119	3	920	1	1
	38	17	7,3	273	52	10	379	1	2
	44	10	8	339	15	14	529	1	3
	GT	49	6	5,2	424	26	11	559	2
53		9	5,6	315	13	10	350	1	3
52		11	7,6	360	16	11	1341	1	3
63		9	9,9	231	14	12	566	2	3
69		17	11,4	369	71	8	996	1	2
70		21	6,8	150	13	10	423	1	1
79		9	5,5	326	10	5	656	0	3
82		8	6,3	212	15	15	396	2	3
84		8	8,8	327	20	14	9007	2	3
86		8	3,5	185	20	12	2591	1	1
93		8	11,6	375	29	13	7667	2	3
96		5	13,8	185	65	13	1282	2	4

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

**Anexo 12.** Valores individuais da uréia (UR, mg/dL), ácido úrico (AcUr, mg/dL), aspartato aminotransferase (AST, UI/L), alanina aminotransferase (ALT, UI/L), gama glutamiltransferase (GGT, UI/L), creatina quinase (CK, UI/L), albumina (ALB, g/dL) e proteína plásmicas totais (PPT, g/dL), em frangos após a administração *in ovo* da vacina contra a doença de Marek (GC) ou associada a gentamicina (GT), no momento D+21.

Grupo	Animal	UR	AcUr	AST	ALT	GGT	CK	ALB	PPT
GC	1	10	7,7	338	13	13	6742	1	2
	4	26	6,3	212	15	15	1129	1	3
	7	5	7,1	532	15	21	2302	1	3
	14	6	4,4	443	13	10	1064	1	1
	17	7	7,7	421	13	15	6756	1	3
	21	7	9,8	208	51	21	221	2	3
	25	6	6	158	25	31	947	1	2
	31	6	7,5	232	13	12	1066	1	2
	32	7	9,6	129	17	21	571	1	3
	39	5	10,5	200	10	15	1494	1	3
	41	7	9,8	204	9	15	4609	1	3
	42	3	7,4	438	24	11	1977	1	1
GT	51	5	2,9	297	101	11	821	0	1
	54	4	10,6	245	14	13	1613	1	3
	55	22	10,5	246	14	15	5960	1	3
	61	4	6	300	17	14	641	1	2
	66	4	4,9	257	30	12	6632	1	1
	73	10	8,3	438	14	15	731	1	3
	75	14	11,2	229	20	11	6312	1	3
	77	7	9,7	223	17	15	903	2	3
	95	6	9	128	20	15	4449	2	3
	97	7	9,6	439	15	15	1994	2	3
	99	8	10,4	216	24	18	1554	3	3
	100	6	11,1	266	10	16	636	2	3

Legenda: GT – Grupo Tratado e GC – Grupo Controle

## ANEXOS CAPÍTULO III

**Anexo 1.** Concentração amostral da gentamicina (soma dos metabólitos C1, C1a, C2 e C2a) por momento de abate, para as matrizes gordura, fígado, rim e músculo de frangos, após a administração *in ovo* aos 18 dias de incubação.

Amostras	Grupo	Momentos (dias)	Gordura (µg/kg)	Fígado (µg/kg)	Rim (µg/kg)	Músculo (µg/kg)
1	A	14	55,92	749,01	474,12	<50
2	A		<50	400,87	219,53	<50
3	A		<50	342,42	188,83	<50
4	A		<50	438,90	267,96	<50
5	A		<50	464,19	300,62	<50
6	A		<50	466,39	190,48	<50
1	B	21	<50	82,27	110,74	<50
2	B		<50	57,41	92,44	<50
3	B		<50	80,47	113,86	<50
4	B		<50	73,17	56,42	<50
5	B		<50	59,92	<50	<50
6	B		<50	77,84	124,85	<50
1	C	28	<50	<50	<50	<50
2	C		<50	<50	<50	<50
3	C		<50	<50	<50	<50
4	C		<50	<50	<50	<50
5	C		<50	<50	<50	<50
6	C		<50	<50	<50	<50
1	D	35	<50	<50	<50	<50
2	D		<50	<50	<50	<50
3	D		<50	<50	<50	<50
4	D		<50	<50	<50	<50
5	D		<50	<50	<50	<50
6	D		<50	<50	<50	<50

Legenda: <50 – concentrações abaixo do LQ (50µg/Kg)