

PI 00162809
PI 00162809



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0016280-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0016280-9

(22) Data do Depósito: 08/12/2000

(43) Data da Publicação do Pedido: 14/06/2001

(51) Classificação Internacional: A61K 38/48; A61K 31/205; A23K 1/16

(30) Prioridade Unionista: 09/12/1999 GB 9929152.8

(54) Título: ADITIVO PARA UM PRODUTO ALIMENTÍCIO PARA ANIMAIS

(73) Titular: FINNFEEDS INTERNATIONAL LTD., Sociedade Inglesa. Endereço: Market House, Aylesbury Court - High Street, Marlborough - Wiltshire SN8 1AA, Reino Unido (GB).

(72) Inventor: JUHA HEIKKI ANTERO APAJALAHTI; NINA RAUTONEN; MICHAEL RICHARD BEDFORD

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 07/04/2015, observadas as condições legais.

Expedida em: 7 de Abril de 2015.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ADITIVO PARA UM PRODUTO ALIMENTÍCIO PARA ANIMAIS".

Esta invenção refere-se a um aditivo para um produto alimentício para animais e particularmente a tal aditivo que aumenta a taxa de ganho de peso de um animal alimentado com um produto alimentício em que este está incorporado. Esta refere-se além disso a tal aditivo que é útil para o tratamento e/ou a profilaxia de coccidiose e/ou uma infecção bacteriana que inclui as que resultam em enterite necrótica.

A criação de muitos tipos diferentes de animais é importante por todo o mundo para a produção de alimentos para o consumo humano. Enquanto os animais estão sendo criados, estes podem entrar em contato com uma variedade de bactérias e parasitas causadores de infecções tais como *Eimeria*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *E. coli* e *Listeria*.

A coccidiose é uma causa comum de doença em gado de criação criado de forma intensiva, particularmente em aves de corte. A coccidiose é causada por um protozoário, um parasita de célula única, do subfilo *Apicomplexa*. Muitas das espécies que causam a doença em animais domésticos pertencem ao gênero *Eimeria*. Os parasitas se multiplicam no epitélio do intestino. Em galinhas, foram identificados sete espécies de *Eimeria*, das quais cinco são consideradas patogênicas. Estas são *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella* e *E. brunetti*.

Os coccídios são organismos ubíquos e são geralmente endêmicos onde quer que as galinhas sejam criadas. Os surtos da doença podem variar de infecções graves até muito brandas. Como muitos protozoários os parasitas, o ciclo de vida de *Eimeria* é relativamente complexo. A multiplicação sexuada e assexuada ocorrem dentro dos intestinos da galinha. Durante este processo de multiplicação e de desenvolvimento do parasita, o tecido do hospedeiro é destruído o que leva a várias manifestações clínicas observadas nos surtos de coccidiose. Os oocistos produzidos e excretados se desenvolvem adicionalmente fora do hospedeiro onde podem sofrer desenvolvimento adicional e infectar outras galinhas. Os oocistos podem de fato sobreviver fora de um hospedeiro durante um longo período de tempo o

que os possibilita infectar outras aves mesmo após a remoção do hospedeiro infectado inicialmente. Podem ser também espalhados entre flocos por outros agentes incluindo pessoas, animais de estimação, insetos, roedores, poeira e outras aves.

5 Os oocistos esporulados contêm quatro esporocistos, cada um contendo dois esporozoítos. Estes esporozoítos são liberados por ação mecânica e enzimática no trato digestivo da galinha. Isto os possibilita invadir as células epiteliais no intestino ou cecos dependendo da espécie de *Eimeria* envolvida.

10 Embora haja diferenças na patogenicidade entre as espécies e cepas de *Eimeria*, os sintomas exibidos por um animal infectado pode ser um ou mais dos seguintes: excrementos com sangue, alta mortalidade, letargia geral, definhamento, uma excreção notável no consumo de alimentos, diarréia e uma excreção na produção de ovos. Foi estimado que a coccidiose é provavelmente responsável por aproximadamente 6-10% da mortalidade indesejada entre os bandos de aves de corte. Adicionalmente, a doença subclínica aumenta as taxas de conversão de alimento (FCRs) e reduz o desempenho. Conseqüentemente, as consequências econômicas desta doença são consideráveis e principalmente indesejáveis.

15 20 Foram investigados vários métodos para combater a coccidiose. Foram feitas tentativas para controlar a doença através de estratégias de manejo baseadas em altos padrões de higiene junto com o uso de desinfetantes químicos no ambiente das aves de corte. Entretanto, mesmo sob condições de higiene escrupulosa, não foi descoberto como sendo possível erradicar a coccidiose embora tenha sido descoberto que tais medidas diminuíssem a pressão de infecção inicial em um galinheiro. Tanto vacinas vivas quanto atenuadas foram investigadas como métodos de controle, mas estas são relativamente caras e tendem a reprimir as taxas de crescimento dos animais como um resultado de sua ação.

25 30 Atualmente, a coccidiose em aves de corte é controlada rotineiramente através do uso de programas com drogas anticoccídicas preventivas relativamente caras. Tais programas tentam restringir infecções de

- coccídios limitando assim os efeitos de surtos subclínicos da doença. Isto é geralmente realizado pela inclusão contínua de agentes anticoccídicos no produto alimentício desde o início da vida do bando até próximo ao abate para as aves de corte para grelhar ou até a retirada controlada para as poeiras.
- 5 Quando foram desenvolvidos pela primeira vez, tais agentes eram utilizados individualmente. Isto resultava freqüentemente em cepas de parasitas que desenvolviam resistência à droga. Tenta-se atualmente controlar a coccidiose através da introdução contínua de novas drogas ou através do uso de programas de drogas envolvendo o uso rotatório de agentes anticoccídicos de estruturas bioquímicas diferentes durante o período de crescimento (programas bidirecionais) ou em intervalos freqüentes (programas de rotação). Apesar do uso de rotina de agentes anticoccídicos em produtos alimentícios para aves de corte, a coccidiose subclínica é ainda observada na maioria dos criadouros de aves de corte.
- 10 Os sais internos de ácidos carboxílicos de amina quaternária funcionam como osmoprotetores. Tais sais aumentam a resistência osmótica de células sem afetar adversamente a atividade enzimática e protegem as enzimas da inativação iônica e por temperatura (Nash e outros, Aust. J. Plant Physiol. 9:47-57 (1982); Yancey e outros, Science 224: 1064-1069 (1982); Rudolph e outros, Archives Biochem. Biophys. 245:134-143 (1986); McCue & Hanson, Trends in Biotechnology 8:358-362 (1990); Papageorgiou e outros, Curr. Res. In Photosynthesis 1:957-960 (1990)). Embora alguns organismos (e tecidos) possam acumular sais internos tal como a betaína em altas quantidades sob estresse osmótico através de síntese induzida
- 15 osmoticamente, a maioria dos animais não possui esta capacidade e são dependentes da ingestão de sais internos exógenos. Por exemplo, as mitocôndrias de fígado de salmão isoladas, quando expostas a estresse osmótico, exibem captação aumentada de betaína, mas não a síntese (Bjorkoy, G., Synthesis and Accumulation of glycine betaine in Salmon (*Salmo salar*) and
- 20 Mussels, tese de MSc, Norwegian College of Fisheries, University of Tromso, pp. 94).
- O uso da betaína para o tratamento da coccidiose é divulgado

na US 5.834.473. O uso combinado da betaina e de um coccidioestático para a mesma finalidade é ensinado pela WO 94/24886. A EP-A-0 681 787 sugere o uso de enzimas tais como uma protease e/ou uma carboidrase para o tratamento e/ou prevenção da coccidiose.

5 A GB-A-2 327 345 ensina que infecções bacterianas no íleo do gado podem ser tratadas através da incorporação de enzimas em um produto alimentício para animais que promovem a digestão do alimento. Tais enzimas quebram os polissacarídeos presentes no componente cereal do produto alimentício em oligossacarídeos que são utilizados como uma fonte
10 de alimento pelos microorganismos benéficos para o hospedeiro presentes no intestino. Como uma consequência desta proliferação, as bactérias patogênicas não podem se desenvolver por causa do processo de exclusão competitiva. Esta estratégia é geralmente mais eficiente quando a qualidade do alimento é baixa (Classen e outros, Proc. 2nd Eur. Symp. on Feed Enzymes, 1995, 65; Pack e Bedford, *Poultry International*, 1998, 43).
15

A JP-A-01 238538 e a JP-A-01 132533 ensinam o uso combinado da betaina e de várias enzimas para melhorar a função digestiva de animais. Entretanto, nenhum destes documentos sugere o uso de tais combinações para o tratamento ou para a prevenção da coccidiose ou de infecções bacterianas ou para ajudar a manter a taxa de crescimento em animais
20 submetidos ao desafio coccídial.

Uma das doenças mais problemáticas no gado é a enterite necrótica causada pelo *Clostridium perfringens*. As infecções por *Clostridium* são geralmente precedidas pela coccidiose. A coccidiose compromete a
25 resposta imunológica de um animal de forma que o animal é menos capaz de responder quando é subsequentemente exposto a uma infecção bacteriana. Entretanto, outros fatores tais como estresse, super população do gado ou saturação do estábulo podem também contribuir. A enterite necrótica é geralmente tratada através da suplementação do produto alimentício para
30 animais com bacitracina de zinco solúvel em água, virginamicina ou penicilina.

Na descrição e nas reivindicações a seguir, é feita referência às

unidades de atividade de protease, às unidades de atividade de xilanase e às unidades de atividade de α -amilase. Estas atividades em uma pré-mistura de enzimas ou em uma mistura líquida de enzimas são analisadas como a seguir.

5 Método de Análise para a Atividade de Protease

Uma unidade de atividade de protease é uma quantidade de enzima que libera do substrato um micrograma de composto fenólico (expresso como equivalentes de tirosina) em um minuto sob as condições descritas.

10 Reagentes

1. Substrato de caseína 0,6% (p/v)

0,6 g em peso de Hammarsten Casein seca (Merck 2242) em um bêquer de 200 mL. Umedecer com uma pequena quantidade (aproximadamente 5 mL) de água destilada. Quando a caseína estiver totalmente umelecida adicionar 20 mL de solução de bifosfato dissódico 0,2 M. Aquecer a mistura a +60°C com agitação até a caseína dissolver e uma solução opal ser obtida. Adicionar 60 mL de água destilada e se necessário 1-2 gotas de álcool octílico (agente antiespumante; podem ser utilizados produtos similares). Após resfriar até a temperatura ambiente, ajustar o pH até 7,5 com hidróxido de sódio 0,5 M e ácido láctico 1 M. Transferir a solução para um balão volumétrico e completar até 100 mL com água destilada.

A solução de substrato pode ser utilizada durante uma semana se for armazenada em uma câmara fria.

2. Solução de Na_2HPO_4 0,2 M

Dissolver 17,80 g de hidrogeno fosfato dissódico di-hidratado em água destilada e completar o volume até 500 mL com água destilada.

30 3. Solução de NaCl 0,02 M

Dissolver 1,168 g de cloreto de sódio em água destilada e completar o volume até 1000 mL com água destilada.

4. Reagente de precipitação (TCA)

Dissolver 18,80 g de ácido tricloroacético (CCl_3COOH), 18,10 g de acetato de sódio anidro (CH_3COONa) e 18,80 g de ácido acético (CH_3COOH) em água destilada e completar o volume até 1000 mL com água destilada.

5
5. Reagente fenol

Misturar uma (1) parte de reagente fenol Folin-Ciocalteau com uma (1) parte de água destilada logo antes da análise.

10
6. Solução de Na_2CO_3 0,55 M
Dissolver 58,295 g de carbonato dissódico em água destilada e completar o volume até 1000 mL com água destilada.

Procedimento

15
1. Amostra de enzima
Equilibrar 1 mL da diluição da enzima (em solução de NaCl 0,02 M) a +40°C (durante aproximadamente 5 minutos). Adicionar 5 mL do substrato de caseína equilibrado, agitar e incubar a +40°C durante exatamente 30 minutos. Adicionar 5 mL do reagente de precipitação e agitar. Incubar a +40°C durante exatamente 30 minutos e filtrar imediatamente com papel de filtro (Whatman 1 ou Macherey Nagel 640 we).

20
25
Pipetar 2 mL do filtrado, 5 mL da solução de Na_2CO_3 0,55 M e 1 mL do reagente fenol. Agitar e incubar a +40°C durante 30 minutos. Resfriar à temperatura ambiente e medir a absorbância a 660 nm contra água destilada.

30
2. Branco da enzima
Equilibrar 1 mL da diluição da enzima (em solução de NaCl 0,02 M) a +40°C (durante aproximadamente 5 minutos). Adicionar 5 mL do reagente de precipitação, agitar e incubar a +40°C durante exatamente 30 minutos. Adicionar 5 mL do substrato de caseína, agitar e incubar a +40°C durante exatamente 30 minutos. Filtrar imediatamente com papel de filtro (Whatman 1 ou Macherey Nagel 640 we).

Tratar o filtrado como a amostra de enzima.

A diferença de absorbância entre a amostra de enzima e o branco da enzima deve ser de 0,2-0,5.

3. Curva padrão

- 5 Preparar uma solução estoque de tirosina pesando 10 mg de L-tirosina em uma proveta, dissolver na solução de NaCl 0,02 M e completar o volume até 100 mL com a solução de NaCl 0,02 M.
 Preparar diluições partindo da solução estoque de tirosina na solução de NaCl 0,02 M como a seguir:

10	1:50	=	2 µg/ml
	1:20	=	5 µg/ml
	1:10	=	10 µg/ml
	1:5	=	20 µg/ml
	1:3	=	33 µg/ml
15	1:2	=	50 µg/ml

- 15 Pipetar 2 mL de cada diluição de tirosina, 5 mL de solução de Na₂CO₃ 0,55 M e 1 mL do reagente fenol. Agitar e incubar a +40°C durante 30 minutos. Resfriar à temperatura ambiente e medir a absorbância a 660 nm contra água destilada.

- 20 Representar graficamente a concentração de tirosina como uma função da absorbância.

Cálculo

A atividade da protease da amostra é calculada de acordo com a equação a seguir:

$$25 \quad \text{Atividade (U/g)} = \frac{[A(X) - A(O)] \times k \times F \times D_f}{t}$$

em que:

- A(X) = absorbância da amostra da enzima
 A(O) = absorbância do branco da enzima
 30 k = a inclinação da curva padrão
 F = fator de diluição da reação (= 11)
 D_f = fator de diluição (mL/g)

t = tempo de reação (30 minutos)

Método de Análise para a Atividade da Xilanase

Uma unidade de atividade da xilanase é a quantidade de enzima que libera um μmol de açúcares redutores (expresso como equivalentes de 5 xilose) do substrato em um minuto sob as condições descritas.

Reagentes

1. Substrato de xilana 1% (p/v)

10 Adicionar 10 mL de hidróxido de sódio 0,5 M em 1,0 g de xilana (Fluka 95590). Misturar durante 30 minutos com um agitador magnético. Adicionar aproximadamente 40 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3. Ajustar o pH para 5,3 com ácido acético 1 M. Completar o volume até 100 mL com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3. O substrato deve ser misturado todo o tempo quando utilizado.

15 2. Ácido acético 1 M

Pipetar 5,7 mL de ácido acético glacial em uma proveta e completar o volume até 100 mL com água destilada.

3. Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3

20 A. Dissolver 4,1 g de acetato de sódio em água destilada e completar o volume até 1000 mL com água destilada.

B. Dissolver 3,0 g de ácido acético glacial em água destilada e completar o volume até 1000 mL com água destilada.

Ajustar o pH da solução A até pH 5,3 com a solução B.

4. Reagente ácido dinitrossalicílico (DNS)

25 Suspender 20,0 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em aproximadamente 800 mL de água destilada. Adicionar gradualmente 300 mL de solução de hidróxido de sódio (32,0 g de NaOH em 300 mL de água destilada) durante agitação contínua. Aquecer a suspensão em um banho de água (a temperatura não pode exceder +48°C) durante agitação até que a solução esteja límpida. Adicionar gradualmente 600 g de tartarato de sódio e potássio. Aquecer a solução (a temperatura não pode exceder +48°C)

se necessário até que a solução esteja límpida.

Completar o volume até 2000 mL com água destilada e filtrar através de um filtro de vidro sinterizado grosso.

5 Armazenar em um frasco escuro à temperatura ambiente. O Re-agente se mantém estável durante um máximo de 6 meses.

Procedimento

1. Amostra de enzima

10 1 mL da diluição da enzima (em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3) é equilibrado a +50°C. Adicionar 1 mL de substrato de xilana, agitar e incubar a +50°C durante exatamente 30 minutos. Adicionar 3 mL do reagente de DNS, agitar e ferver a mistura de reação durante exatamente 5 minutos. Resfriar a mistura de reação em um banho de água fria até a temperatura ambiente e medir a absorbância a 540 nm contra água destilada.

15 2. Branco da enzima

Incubar 1 mL de substrato de xilana a +50°C durante 30 minutos. Adicionar 3 mL da solução de DNS e agitar. Adicionar 1 mL da diluição da enzima (em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3) e agitar. Ferver a mistura durante exatamente 5 minutos. Resfriar a mistura de reação em um banho de água fria até a temperatura ambiente e medir a absorbância a 540 nm contra água destilada.

20 25 A diferença de absorbância entre a amostra de enzima e o branco da enzima deve ser de 0,3-0,5.

3. Curva padrão

Preparar as soluções padrões partindo da xilose anidra em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3. A concentração de xilose nos padrões deve ser de 0,05-0,5 mg/mL. Pipetar 1 mL da solução padrão, 1 mL do substrato de xilana e 3 mL do reagente de DNS em um tubo de ensaio. Agitar e ferver durante exatamente 5 minutos. Resfriar em um banho de água fria até a temperatura

ambiente e medir a absorbância a 540 nm contra o branco do padrão. No branco do padrão, a solução de xilose é substituída por 1 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3. De outra maneira o branco do padrão é tratado como o padrão da xilose.

5 Representar graficamente a concentração da xilose como uma função da absorbância. Uma nova curva padrão é preparada para cada reagente de DNS.

Cálculo

A atividade da xilanase da amostra é calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{([A(X) - A(O)] \times k + C_0) \times 1000 \times D_f}{\text{MW}_{xyl} \times t}$$

em que:

15	A(X) = absorbância da amostra da enzima
	A(O) = absorbância do branco da enzima
	k = a inclinação da curva padrão
	C _o = a interceção da curva padrão da xilose
	1000 = fator, mmol → μmol
	Df = fator de diluição (mL/g)
20	MW _{xyl} = peso molecular da xilose (150,13 mg/mmol)
	t = tempo de reacção (30 minutos)

Método de Análise para a Atividade da α -Amilase

Uma unidade de atividade da α -amilase catalisa um micromol de hidrólise de ligações glicosídicas em um minuto sob as condições descritas.

25 Reagentes

1. Substrato

Como um substrato é utilizado o Phadebas Amylase Test-tablet para uso em diagnósticos *in vitro* (Pharmacia Diagnostics). Os comprimidos são produzidos com água destilada partindo do polímero de amido azul insolúvel em água, albumina de soro bovino e tampão.

2. Solução do reagente

Diluir 9,0 g de cloreto de sódio, 2,0 g de albumina de soro bovino e 2,2 g de cloreto de cálcio em água destilada em uma proveta e completar o volume até 1000 mL com água destilada.

3. Solução de NaOH 0,5 M

5 Dissolver 20,0 g de hidróxido de sódio em água destilada em uma proveta e completar o volume com água destilada até 1000 mL.

4. Papel de Filtro

Macherey Nagel 640 mn ou equivalente.

10 Procedimento

1. Amostra da enzima

Pipetar 200 μ L da diluição adequada da enzima na solução do reagente e 4,0 mL da solução do reagente em um tubo de ensaio. Equilibrar a +37°C durante 5 min. Adicionar o comprimido de substrato com pinças e misturar bem durante 10 segundos. Incubar a +37°C durante exatamente 15 min. O tempo de reação se inicia com a adição do comprimido. Adicionar 1,0 mL da solução de NaOH 0,5 M e agitar bem. Filtrar ou centrifugar a 3500 rpm 10 min e medir a absorbância contra o branco do reagente a 620 nm.

20 A absorbância da amostra da enzima deve ser de 0,3-0,5.

2. Branco do reagente

Equilibrar 4,2 mL da solução do reagente a +37°C durante 5 min. Adicionar o comprimido de substrato com pinças e agitar bem durante 10 segundos. Incubar a +37°C durante exatamente 15 min. Adicionar 1,0 mL de solução de NaOH 0,5 M, agitar bem e filtrar ou centrifugar a 3500 rpm durante 10 min.

Cálculo

30 A absorbância da amostra é proporcional à atividade da α -amilase. A atividade da α -amilase da diluição da enzima é lida partindo de uma tabela incluída no kit do comprimido. Para cada batelada de comprimido é fornecida uma tabela calibrada.

A atividade da α -amilase da amostra é calculada como a seguir:

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{\text{Act} \times \text{Df}}{1000}$$

onde:

- 5 Act = valor da atividade da α -amilase (expresso em U/L)
da diluição da enzima lido partindo da tabela do
Phadebas Amylase Test
- Df = fator de diluição (mL/g)
- 1000 = fator, para converter litros em mL

- 10 É um primeiro objetivo da presente invenção fornecer uma combinação de compostos para incluir em um produto alimentício para animais que aumenta a taxa de ganho de peso de animais saudáveis. É um segundo objetivo fornecer o uso de tal combinação para a produção de um agente para a prevenção e/ou o tratamento da coccidiose ou de infecções bacterianas tal como a enterite necrótica. É um terceiro objetivo fornecer uma combinação de aditivos para um produto alimentício para animais que opõe-se ao efeito de um desafio de *Eimeria* que diminui a taxa de ganho de peso de um animal.
- 15 20 Conseqüentemente, um primeiro aspecto da presente invenção fornece o uso de uma protease e de um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia da coccidiose, particularmente quando causada por infecção por *Eimeria*.

- 25 De acordo com um segundo aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma protease e de um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia de uma infecção bacteriana, por exemplo uma infecção causada por *Salmonella*, *Campylobacter* ou *Listeria*.

- 30 De acordo com um terceiro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma protease e de um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia da enterite necrótica resultante da infecção *inter alia* do *Clostri-*

dium perfringens.

De acordo com um quarto aspecto, a presente invenção fornece um aditivo para um produto alimentício para animais que compreende uma protease e um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária.

- 5 Em cada um dos primeiro - quarto aspectos anteriores, é particularmente preferido que o agente ou o aditivo comporte ainda uma xilanase.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra uma representação gráfica dos efeitos da suplementação do produto alimentício de galinhas para grelhar saudáveis com 10 a betaina; uma protease; e com uma combinação de betaina e uma protease.

A Figura 2 mostra uma representação gráfica dos efeitos de suplementação produto alimentício de galinhas para grelhar desafiadas com 15 *Eimeria maxima* com a betaina; uma protease; e com uma combinação de betaina e uma protease.

A Figura 3 é um cromatograma em gel que mostra a presença 20 do gene da toxina do *C. perfringens* no íleo de galinhas alimentadas com produtos alimentícios suplementados de forma variada e desafiadas com vários agentes patogênicos.

Na descrição a seguir, faz-se referência a várias metodologias que constituem o conhecimento geral comum dos versados na arte da imunologia e da imunopatologia veterinária, das vacinas, da farmácia animal e da criação de animais. As publicações e outros materiais que apresentam 25 tais metodologias conhecidas incluem:

Os princípios gerais da ciência veterinária são apresentados, por exemplo, em The Merck Veterinary Manual, 6^a Edição, editado por Fraser e outros, 1986; the Food and Drug Administration's FDA 1994 Feed Additive Compendium, U.S. Food and Drug Administration, 1994; Trends in 30 Veterinary Research and Development, parte 6, Anti-coccidials, editado por Lloyd-Evans, L. P. M., PJB Publications Ltd., 1991; Diseases of Poultry, editado por B. W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1991.

Os princípios gerais da criação de animais são apresentados, por exemplo, em H. Patrick e outros, *Poultry: Feeds & Nutrition*, Segunda Edição, AVI Publishing Co. Inc. Westport, Conn. (1980).

Os princípios gerais das ciências farmacêuticas são apresentados, por exemplo, em Remington's *Pharmaceutical Sciences* (18^a edição, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing, Easton, Pa. 1990).

Como mencionado anteriormente, a presente invenção fornece o uso de uma protease e de um sal interno de um ácido carboxílico de amônia quaternária para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia da coccidiose, de infecção bacteriana ou da enterite necrótica resultante *inter alia* da infecção do *Clostridium perfringens*. A vantagem de se utilizar os produtos alimentícios que contêm uma combinação da betaina e uma protease para criar animais é que a quantidade de drogas antimicrobianas que eram anteriormente incorporadas rotineiramente nos produtos alimentícios pode ser reduzida ou em alguns casos omitida totalmente. Em países onde tais drogas são proibidas, esta representa uma nova abordagem para o controle de doenças bacterianas.

Quando se omite os antibióticos da dieta de um animal se obtêm várias vantagens adicionais potenciais. Era anteriormente necessário retirar os antibióticos da dieta do animal durante um certo período de tempo antes do abate. Isto garante que a carne fica relativamente livre de tais drogas e assim serve para o consumo humano. Em contraste, se os antibióticos forem totalmente omitidos da dieta de um animal, como pode ser conseguido com a presente invenção, então o animal pode ser abatido em qualquer época ao invés de após um certo período da retirada. Isto possibilita que o criador tenha uma flexibilidade elevada e remove o risco dos animais se infectarem logo antes do abate. Ainda, é garantido que a carne e os ovos estão livres de antibióticos. Tais carne e ovos possuem uma vantagem no mercado comparados com os produtos que não podem ser aprovados com tal garantia.

A presente invenção possui também vantagens para a saúde humana. Seu uso reduz a pressão seletiva de cepas de bactérias resis-

tes a antibióticos, por permitir que os antibióticos sejam removidos do produto alimentício para animais. Conseqüentemente, mais cepas suscetíveis a antibióticos estarão presentes no intestino do animal, garantindo desta forma um efeito mais provavelmente letal no evento de antibióticos sendo utilizados no estado de saúde humano equivalente.

O aditivo do produto alimentício de acordo com a presente invenção pode ser preparado de várias formas. Por exemplo, pode ser preparado simplesmente misturando os compostos apropriados diferentes para produzir o aditivo. Este pode ser misturado diretamente a um produto alimentício ou mais convencionalmente impregnado a um material veículo de base cereal tal como o trigo moído, o milho ou a farinha de soja. Tal veículo impregnado também constitui um aditivo do produto alimentício de acordo com o quarto aspecto da presente invenção.

O aditivo do produto alimentício pode ser misturado diretamente com o produto alimentício para animais ou alternativamente misturado com um ou mais outros aditivos de produto alimentício tais como um aditivo de vitamina de produto alimentício, um aditivo mineral de produto alimentício ou um aditivo de aminoácido de produto alimentício. O aditivo de produto alimentício resultante incluindo os vários tipos diferentes de componentes podem ser então misturados em uma quantidade apropriada com o produto alimentício. É também possível incluir o aditivo de produto alimentício na dieta do animal através da incorporação deste em um segundo (e diferente) produto alimentício ou na água de beber a qual o animal também tem acesso. Conseqüentemente, não é essencial que o aditivo fornecido pela presente invenção esteja incorporado no produto alimentício principal de base cereal de um animal, embora tal incorporação forme um aspecto particularmente preferido da presente invenção.

O aditivo do produto alimentício fornecido pela presente invenção pode ser formulado na forma de uma pré-mistura junto com quaisquer outras enzimas que se deseja incluir. A pré-mistura pode ser adicionada às matérias-primas antes da produção do produto alimentício, durante a produção do produto alimentício ou como uma etapa final uma vez que o

produto alimentício está de outra maneira pronto para uso. É possível adicionar a combinação do sal interno e da protease diretamente a um material de produto alimentício pré-formado na forma de péletes ou na forma de uma pasta.

- 5 Se o aditivo da presente invenção for incorporado em um produto alimentício para animais, então o produto alimentício deve compreender pelo menos 25% em peso de um cereal e preferencialmente pelo menos 35% em peso do cereal. O cereal pode ser qualquer um ou mais do trigo, milho, centeio, cevada, aveia, triticale, arroz e sorgo. É particularmente 10 preferido que o cereal seja milho ou trigo. Se o cereal for milho, então o aditivo ou o agente preferencialmente compreende ainda uma α -amilase.

Embora o componente de cereal de uma dieta com base de cereal constitui uma fonte de proteína, é geralmente necessária para incluir fontes de proteína suplementar na dieta, tal como as derivadas da farinha 15 de peixe, da farinha de carne ou de vegetais. Estas fontes de proteína suplementar podem constituir até 50% em peso do produto alimentício para animais. As fontes de proteína vegetal incluem pelo menos uma de soja com gorduras totais, semente de colza, canola, farinha de soja, farinha de semente de colza e farinha de canola.

- 20 Um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária possui a fórmula estrutural geral $R^1R^2R^3N^+ \cdot L \cdot COO^-$ em que os substitutos R^1 , R^2 e R^3 representam independentemente quaisquer radicais orgânicos, preferencialmente grupos alquila, mais preferencialmente grupos alquila que possuem de 1-6 átomos de carbono e mais preferencialmente são todos 25 metila; o grupo $-L-$ de ligação representa qualquer grupo de ligação orgânico tal como alcoxialquila ou alquileno, preferencialmente C_1-C_6 alquileno e mais preferencialmente metileno. Os exemplos do sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária incluem $(Me_3N^+CH_2COO^-)$, $Me_3N^+ \cdot CHMeCOO^-$, $Et_3N^+CH_2COO^-$, $Me_3EtN^+CH_2COO^-$, $Me_3N^+CH_2CH_2COO^-$, $Me_3N^+CH_2OCH_2COO^-$, 30 e $Me_3N^+C(CHMe_2)HCOO^-$. O sal interno é preferencialmente betaína que é disponível comercialmente na Finnfeeds sob o nome comercial Betafin®.

O sal interno é preferencialmente incluído no produto alimentício

na taxa de 0,01 - 20 g por kg de produto alimentício, mais preferencialmente de 0,1 - 10 g/kg e mais preferencialmente de 0,5 até 2 g/kg.

A protease utilizada pode ser qualquer forma de protease, entretanto é preferido o uso de um subtilisina derivada do *Bacillus subtilis* com uma atividade não menor que 40.000 U/g. Tais subtilisinas são descritas por exemplo na US 4.760.025 A. A protease é incluída no produto alimentício em tal quantidade que o produto alimentício possui uma atividade de protease que corresponde a 100 U até 100.000 U por kg de produto alimentício, preferencialmente 500 U até 10.000 U por kg de produto alimentício. As proteases adequadas incluem mas não estão limitadas às proteases disponíveis comercialmente a seguir: NEUTRASE da Novo (TM) (disponível comercialmente na Novo Nordisk); PURAFECT (TM) (disponível comercialmente na Genecor International, Inc); SAVINASE (TM) (disponível comercialmente na Novo Nordisk); MAXACAL (TM) (disponível comercialmente na Gist-Brocades); DURAZYM (TM) (disponível comercialmente na Novo Nordisk); e MAXAPEM (TM) (disponível comercialmente na Gist Brocades).

Em uma modalidade preferida da invenção, o agente ou o aditivo compreende adicionalmente uma xilanase. As xilanases podem ser derivadas de fontes fúngicas tais como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Necallimastix* ou *Thermomyces*. É preferido que a xilanase seja a xilanase de pl baixo e/ou a xilanase de pl alto que pode ser obtida de *Trichoderma longibrachiatum* tal como a descrita no Exemplo 22 da WO 92/06209. Alternativamente, a xilanase pode ser também obtida de uma bactéria tal como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Microtetraspora*, *Clostridium* ou *Ruminococcus*. É também possível que a xilanase seja obtida de um hospedeiro que foi submetido à manipulação genética tal como através da inclusão de um gene apropriado dentro de uma cepa bacteriana ou fúngica hospedeira. A atividade preferida da xilanase deve ser de aproximadamente 3000 U/g. A xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* com uma atividade mínima de 3000 U/g é disponível comercialmente na Finnfeeds International sob o nome comercial AVIZYME®. A xilanase é incluída no produto alimentício em tal quantidade que o produto alimentício possui uma atividade de xilanase correspondente

a 100 U até 100.000 U por kg de produto alimentício, preferencialmente uma atividade de 200 U até 1000 U por kg de produto alimentício.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, a α -amilase pode estar também presente no agente ou no aditivo, particularmente no caso em que o agente ou o aditivo será incluído em um produto alimentício contendo milho. Embora esteja dentro do âmbito da invenção utilizar qualquer forma de α -amilase, é preferido utilizar a α -amilase de *Bacillus subtilis* com uma atividade máxima de 4000 U/g. A α -amilase de *Bacillus subtilis* com uma atividade máxima de 4000 U/g é disponível comercialmente na Finnfeeds International sob o nome comercial AVIZYME®. A α -amilase é incluída no produto alimentício em tal quantidade que o produto alimentício possui uma atividade de α -amilase que corresponde a 10 U até 100.000 U por kg de produto alimentício, preferencialmente uma atividade de 100 U até 4.000 U por kg de produto alimentício.

O sal interno, a protease e opcionalmente a xilanase e/ou a α -amilase podem ser misturados juntos antes do uso mas podem ser também aplicados separadamente no produto alimentício. Uma combinação da protease, da xilanase e da α -amilase é disponível comercialmente sob o nome comercial AVIZYME® 1510 na Finnfeeds International. Uma combinação adicional destas enzimas é disponível comercialmente na forma de uma pré-mistura seca sob o nome comercial AVIZYME® 1500. Deve ser observado que não é geralmente aconselhável armazenar uma protease junto com outras proteínas durante um período extenso de tempo uma vez que esta tende a degradar as últimas.

O aditivo do produto alimentício da presente invenção pode ser utilizado para uma ampla variedade de animais, mas o uso da invenção é particularmente preferido em animais domésticos e gado de criação. Os animais que podem em particular se beneficiar da invenção incluem aves de corte (tais como galinhas, perus, patos e gansos), ruminantes (tais como gado, cavalos e ovelhas), suíños (porcos), roedores (tais como coelhos) e peixes. A invenção é particularmente útil em relação a galinhas para grelhar.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da pre-

sente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos de qualquer agente patogênico que induz a coccidiose e especialmente de qualquer espécie de *Eimeria* incluindo por exemplo, as espécies de *Eimeria necatrix*, *galloparvonis*, *meleagrimitis*, *innocua*, *meleagridis*, *subrotunda*, *dispersa*, *truncata*, *acervulina*, *brunetti*, *maxima*, *mitis*, *praecox* e *tenella*. Mais particularmente, o aditivo promove ganho de peso em um animal infectado com *Eimeria*.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da presente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos em 10 aves de corte por causa da infecção por espécies de *Eimeria*, especialmente as espécies de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da presente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos 15 induzidos no gado quando infectado com um membro das espécies de *Eimeria*, especialmente das espécies de *Eimeria zuernii*, *bovis (smithii)*, *ellipsoidalis*.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da presente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos 20 induzidos em ovelhas quando infectadas com um membro das espécies de *Eimeria* incluindo as espécies de *Eimeria arloingi A (ovina)*, *weybridgensis (arlongis B)*, *crandallis*, *ahsata*, *ovinoidalis*, *gilruthi*.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da presente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos 25 induzidos em caprinos quando infectados com um membro das espécies de *Eimeria* incluindo, por exemplo, a imunização com as espécies de *Eimeria arloingi*, *faurei*, *caproina*, *ninakohlyakimovae*, *christensenii*.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da presente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos 30 induzidos em porcos quando infectados com um membro das espécies de *Eimeria* incluindo, por exemplo, a imunização com as espécies de *Eimeria debbiecki*, *scabra*, *penninuta*; e, incluindo os efeitos adversos induzidos por

um membro das espécies de *Isospora*, por exemplo, *Isospora suis*.

De acordo com a invenção, os níveis eficazes do aditivo da presente invenção podem ser administrados para aliviar os efeitos adversos em aves de corte por causa da infecção por bactérias tais como *Clostridium*,

- 5 *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria* e especialmente *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis* e *Campylobacter jejuni*. Como o *Clostridium perfringens* é uma das causas principais da enterite necrótica, o aditivo nutricional pode ser consequentemente utilizado para a preparação de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia da enterite necrótica.

- 10 Podem ser empregados processos farmacêuticos adicionais para controlar a duração da ação. A distribuição controlada pode ser realizada através da seleção de macromoléculas apropriadas tais como poliésteres, poliaminoácidos, polipirrolidona, vinilacetato de etileno, metilcelulose, carboximetil-celulose ou sulfato de protamina e a combinação destes de 15 acordo com procedimentos bem estabelecidos a fim de controlar a liberação. A duração da ação do sal interno e da protease pode ser também controlada através da incorporação destes agentes em partículas de materiais poliméricos tais como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogéis, poli(ácido láctico) ou co-polímeros de vinilacetato de etileno. Alternativamente, o sal 20 interno e a protease podem ser formulados em microcápsulas. Vários materiais e métodos para a produção e a utilização de microcápsulas são divulgados em Remington's Pharmaceutical Sciences, (16^a edição, A. Oslow, ed., Mack, Easton, Pa. 1980).

- Em adição à modalidade da invenção em que o processo de 25 administração do sal interno e da protease aos animais ocorre na forma do produto alimentício na dieta do animal, a presente invenção também incorpora o uso de outras composições que contêm o sal interno e a protease que podem ser co-administradas com qualquer composição desejada, incluindo quaisquer vacinas, nutrientes ou medicamentos.

30 **Exemplos**

Exemplo 1

O Exemplo a seguir ilustra os efeitos quando um aditivo de pro-

duto alimentício da presente invenção é incorporado no produto alimentício de animais saudáveis assim como para a produção de um agente para o tratamento de infecção por *Eimeria*.

(a) Procedimento geral:

5 96 galinhas para grelhar (Ross 208) foram divididas em quatro grupos separados, cada um com 24 animais. O tratamento com o produto alimentício foi iniciado no dia 0 e as aves foram submetidas a um desafio com *Eimeria maxima* no 14º dia. Tal desafio foi feito através da inoculação de oocistos de *E. acervulina* e de *E. maxima* no papo das galinhas em um
10 volume de 2 mL de água da torneira. A dose por ave era de 100.000 oocistos de *E. acervulina* 50.000 oocistos de *E. maxima*. Estas duas espécies de *Eimeria* são segregadas espacialmente no intestino: *E. acervulina* infecta o duodeno e o início do jejuno, enquanto que a *E. maxima* prefere o intestino delgado médio: do jejuno distal até a metade do íleo. As aves foram mantidas em gaiolas entre os dias 0 - 14 e em cercados abertos com um forro de serragem entre os dias 14 - 21.

15 O produto alimentício fornecido às aves era baseado em milho e soja sem coccidioestáticos. O alimento era prensado a frio em pequenos péletes friáveis possuindo um diâmetro de aproximadamente 5 mm. Os produtos alimentícios de partida foram utilizados nos dias 0 - 14 e os produtos alimentícios finais foram utilizados nos dias 14 - 21. Os aditivos foram borrifados sobre os péletes de produto alimentício quando apropriado através de uma solução aquosa de betáína (a uma dose de 1 g por kg de produto alimentício) e de uma solução aquosa de AVIZYME® 1510 que compreende
20 aproximadamente 300 U/g de xilanase, 4.000 U/g de protease e 400 U/g de α-amilase disponível na Finnfeeds International a uma dose de 1 g/kg de produto alimentício.
25

As composições de produto alimentício utilizadas eram como a seguir:

Produto alimentício de milho e soja

Ingredientes	de partida	Final
Milho	60,81%	61,09%
Gordura da farinha de peixe 65	0,50%	0,50%
Farinha de soja 48	33,38%	30,18%
Óleo de soja	1,09%	4,18%
Sal	0,39%	0,32%
Bicarbonato de sódio	0,01%	0,00%
DL Metionina	0,18%	0,10%
Cal	1,11%	1,17%
Fosfato dicálcico	1,53%	1,46%
Mistura de vitaminas + minerais	1,00%	1,00%
TOTAL	100,00%	100,00%

A composição nutricional destes produtos alimentícios era como 5 a seguir:

Nutrientes	de partida	Final
% de proteína bruta	21,5	20
M E para ave de corte kcal/kg	2975	3175
D E para porco Kcal	3377,25	3500,69
% de cálcio	0,9	0,9
% de fósf.	0,7	0,67
% de fosf. disp.	0,42	0,4
% de gordura	3,92	6,85
% de fibra	2,59	2,49
% de Met	0,52	0,42
% de Cys	0,36	0,34
% de Met + Cys	0,88	0,76
% de Lys	1,17	1,07
% de His	0,58	0,54
% de Trip.	0,25	0,23
% de Thr	0,83	0,77
% de Arg	1,44	1,33
% de Iso	0,92	0,85
% de Leu	1,9	1,79

% de Phe	1,06	0,98
% de Tyr	0,79	0,73
% de Val	1,01	0,94
% de Gly	0,89	0,83
% de Phe + Tyr	1,84	1,72
% de Na	0,18	0,15
% de Cl	0,29	0,24
% de K	0,92	0,85
% de ácido linoléico	1,64	2,86
Na + K-Cl (meq/kg)	232,46	214,64
D U A (meq/kg)	439,53	436,23
% de magnésio	0,2	0,18

(b) Resultados

O peso das aves foi medido logo antes do desafio com *Eimeria maxima* no 14º dia. A Tabela 1 mostra que o uso da uma combinação de betaína e da protease resulta em um ganho de peso aumentado comparado a quando estes compostos são adicionados individualmente ao produto alimentício.

5

Tabela 1

Grupo	Dieta	Peso Médio (g)
A	Controle (produto alimentício sem suplemento)	422
B	Produto alimentício suplementado com betaína (Comparativo)	418
	Produto alimentício suplementado com protease (Comparativo)	431
	Produto alimentício suplementado com Betaína e Protease (Invenção)	442

Os resultados da Tabela 1 estão representados graficamente na Figura 1.

10 As aves foram pesadas novamente no 21º dia, isto é, um período de 7 dias após o desafio com *Eimeria*. Os resultados estão resumidos na Tabela 2. É observado um ganho de peso aumentado para o grupo D comparado aos Grupos B e C em que os produtos alimentícios são suplementados com betaína ou com protease. Novamente, uma combinação destes 15 dois componentes leva a uma melhoria que é maior do que a soma dos

efeitos dos componentes individuais.

Tabela 2

Grupo (dieta como na Tabela 1)	Peso Médio (g)
A	651
B	644
C	665
D	690

Os resultados apresentados na Tabela 2 estão representados graficamente na Figura 2.

5 Exemplo 2

Foi investigada a atividade de uma combinação de betaina e da protease utilizada no Exemplo 1 sobre a infecção do *Clostridium perfringens* neste Exemplo. O produto alimentício utilizado foi o Produto Alimentício Final como descrito no Exemplo 1.

10 (a) Procedimento geral:

12 galinhas cada uma de 21 dias de idade foram divididas em 3 grupos separados, E, F e G, cada um de 4 aves. O grupo E foi exposto a um desafio com *Eimeria maxima*, o Grupo F a um desafio com *Clostridium perfringens* e o Grupo G a um desafio duplo simultâneo com *Eimeria* e *Clostridium perfringens*. O gene da α -toxina do *C. perfringens* foi detectado do DNA microbiano total como a seguir: o DNA microbiano total do ceco foi submetido a PCR com iniciadores projetados de acordo com a seqüência de nucleotídeos conhecida do gene da α -toxina de *C. perfringens*. A seqüência dos iniciadores da α -toxina e as condições para a realização da reação da 15 PCR são descritas por Songer e de Meer em Am. J. Vet. Res. 1997 Julho; 58(7), pp 702-705.

20 (b) Resultados

A banda intensa na faixa 3 do gel exibida na Figura 3 indica a presença do gene da α -toxina do *C. perfringens* endógeno no animal. A ausência de tais bandas nas faixas 2 e 4 mostra que o desafio com *Eimeria* é 25 um pré-requisito essencial para que a infecção por *C. perfringens* sofra uma interrupção. Sem desejar estar ligado a qualquer teoria, acredita-se que o

desafio com *Eimeria* reduza os níveis normais de protease no intestino o que então diminui a captação de nutrientes nas regiões superiores do intestino e resulta em níveis aumentados de proteínas (e assim condições de crescimento melhoradas para *C. perfringens*) no íleo. Um aspecto adicional 5 que poderia ser significante é o efeito do desafio com *Eimeria* sobre o sistema imunológico do animal hospedeiro. É provável que a resposta imunológica para um desafio com *C. perfringens* esteja enfraquecida quando o sistema imunológico já está preocupado com um desafio com *Eimeria*.

Uma comparação das faixas 6 e 7 na Figura 3 mostra que a 10 banda que é indicativa do gene da α -toxina de *C. perfringens* seja somente observada para o tratamento com a protease sozinha (faixa 6) mas não para o uso combinado da betaína e da protease (faixa 7). É além disso um conhecimento geral comum na arte que a betaína como tal não é eficiente contra um desafio com *C. perfringens*. Assim, pode ser inferido que a 15 combinação da betaína e da protease é eficiente contra a infecção por *C. perfringens* enquanto que o uso da protease ou da betaína individualmente não resulta na infecção por *Clostridium* sendo tratada eficientemente.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma protease e de betaína, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia da coccidiose.
- 5 2. Uso de uma protease e de betaína, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um agente para o tratamento de infecção por *Eimeria* em um animal.
- 10 3. Uso de uma protease e de betaína, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um aditivo para produto alimentício para promover ganho de peso em um animal infectado com *Eimeria*.
- 15 4. Uso de uma protease e de betaína, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia de uma infecção bacteriana causada por *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* ou *Listeria*.
- 20 5. Uso de uma protease e de betaína, caracterizado pelo fato de que é para a produção de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia de enterite necrótica resultante da infecção *inter alia* por *Clostridium perfringens*.
- 25 6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o agente compreende ainda uma xilanase.
7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o agente compreende ainda uma α -amilase.
8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o agente está na forma de um produto alimentício para animais.
- 25 9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o produto alimentício compreende 0,01 - 20 g da betaína por kg do produto alimentício.
- 30 10. Uso de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que a quantidade de protease presente no produto alimentício corresponde a 100 - 100.000 U de atividade da protease por kg do produto alimentício.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que a quantidade de xilanase presente no produto alimentício corresponde a 100 - 100.000 U de atividade da xilanase por kg do produto alimentício.

5 12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11 quando dependentes da reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a quantidade de α -amilase presente no produto alimentício corresponde a 10 - 100.000 U de atividade da α -amilase por kg do produto alimentício.

10 13. Aditivo para um produto alimentício para animais, caracterizado pelo fato de que compreende uma protease, uma xilanase e betaina.

14. Aditivo para um produto alimentício para animais de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma α -amilase.

15 15. Produto alimentício para animais que, caracterizado pelo fato de que compreende um aditivo como definido na reivindicação 13 ou 14 e pelo menos 25% em peso de cereal.

Fig. 1 Sem desafio com Eimeria : Peso das aves no 14º dia

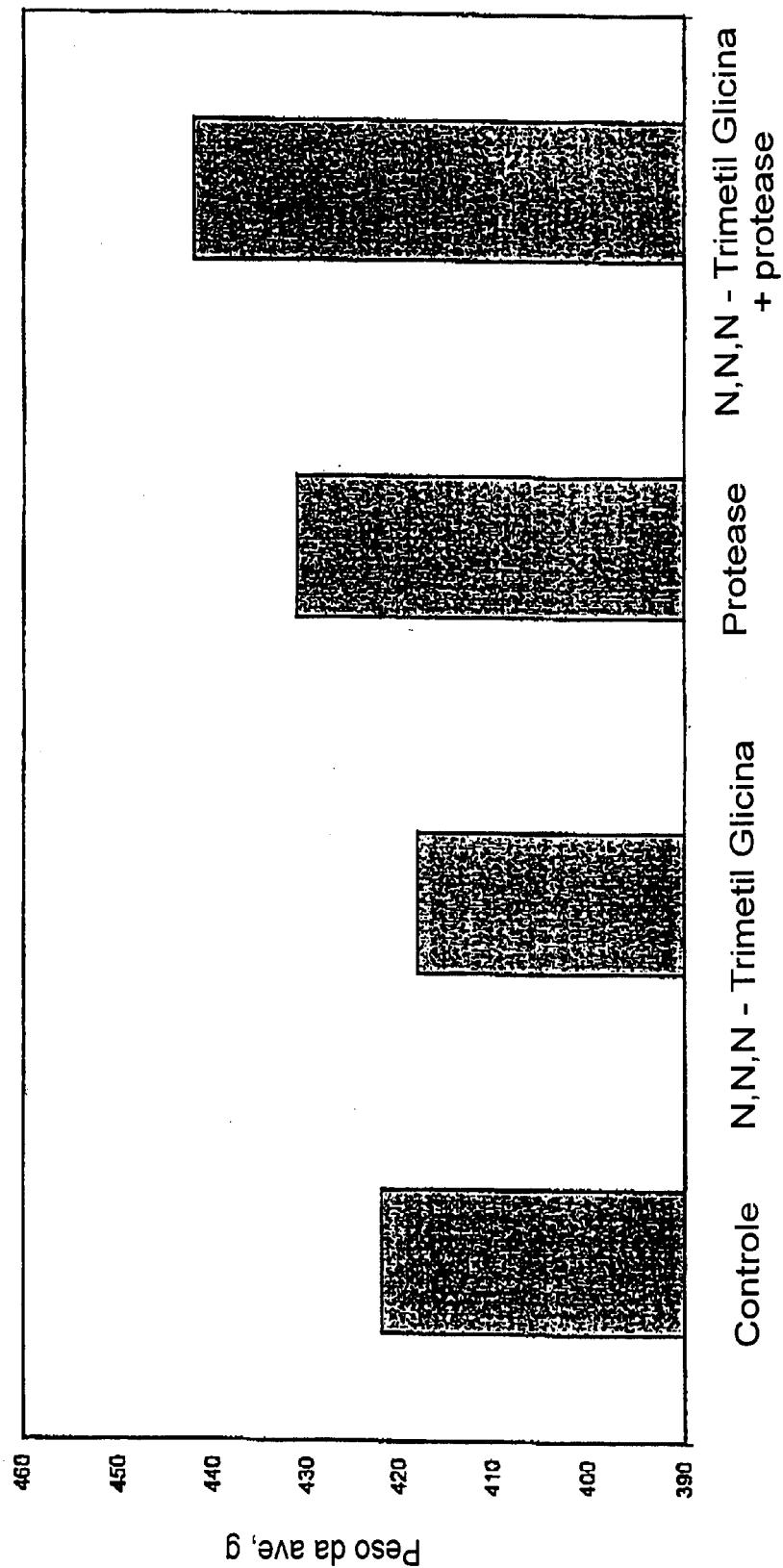


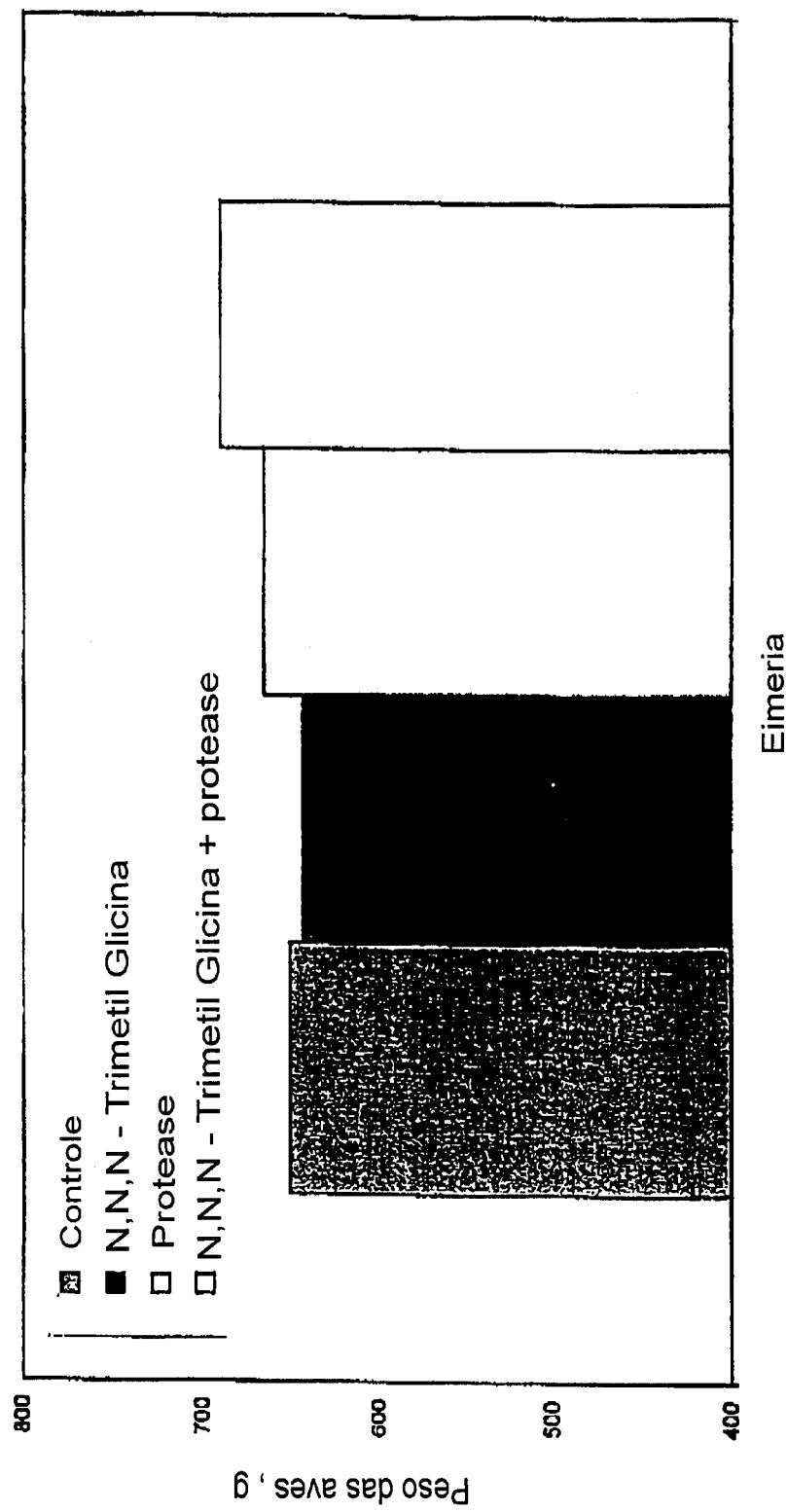
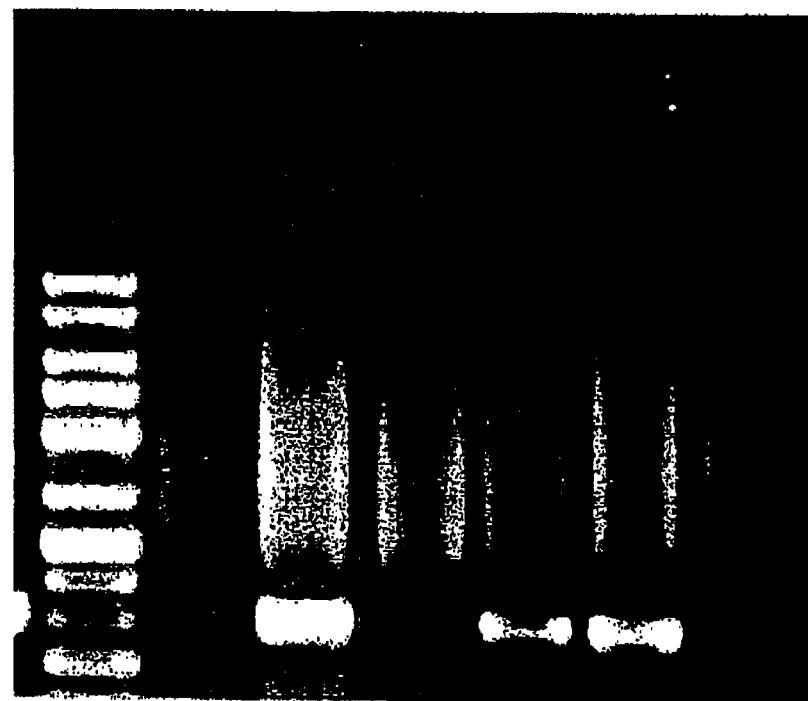
Fig. 2

Fig. 3

Detecção do gene da toxina de *C. perfringens* no íleo

Faixa:

Calibração 1

Sem desafio 2

Desafio com *C. Eimeria* 3Desafio com *C. perfringens* 4Desafio duplo : (*Eimeria* + 5
*C. perfringens*Desafio duplo : protease icluída no 6
produto alimentícioDesafio duplo : protease + betaína 7
incluídos no produto alimentício

RESUMO

Patente de Invenção: "ADITIVO PARA UM PRODUTO ALIMENTÍCIO PARA ANIMAIS".

A presente invenção refere-se ao uso de combinações de uma protease e um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária para a preparação de um agente para o tratamento e/ou a profilaxia da coccidiose e de infecções bacterianas tal como a enterite necrótica em animais. As modalidades preferidas da invenção compreendem a inclusão de uma xilanase e/ou de uma α -amilase no agente. É também divulgado um aditivo nutricional que compreende uma combinação de um sal interno de um ácido carboxílico de amina quaternária, de uma protease e (opcionalmente) de uma xilanase e uma α -amilase. Este pode ser utilizado para aumentar a taxa de ganho de peso dos animais.