



HEBERT SILVEIRA

**ÁCIDO BENZOICO PARA LEITÕES NA FASE
INICIAL: AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *EX VIVO***

LAVRAS - MG

2014

HEBERT SILVEIRA

**ÁCIDO BENZOICO PARA LEITÕES NA FASE INICIAL: AVALIAÇÃO
*IN VIVO E EX VIVO***

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

Orientador

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli

Coorientadores

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

Dr. Mácio Gilberto Zangeronimo

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silveira, Hebert.

Ácido benzoico para leitões na fase inicial : avaliação *in vivo* e *ex vivo* / Hebert Silveira. – Lavras : UFLA, 2014.

121 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Vinícius de Souza Cantarelli.

Bibliografia.

1. Suíno. 2. Ácido orgânico. 3. Expressão gênica. 4. Desempenho.
5. Morfologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.408557

HEBERT SILVEIRA

**ÁCIDO BENZOICO PARA LEITÕES NA FASE INICIAL: AVALIAÇÃO
*IN VIVO E EX VIVO***

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

APROVADA em 22 de setembro de 2014.

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

UFLA/DZO

Dr. Mácio Gilberto Zangeronimo

UFLA/DMV

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

UFLA/DMV

Dr. Leandro Batista Costa

PUC-Paraná

Orientador

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli

LAVRAS - MG

2014

*À Deus por estar sempre me guiando.
Com carinho à minha família, exemplo de vida.
À minha esposa, por todos os momentos inesquecíveis.
Ao meu irmão e amigo fiel, que posso contar sempre.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar nos momentos decisivos de minha vida, por me dar força e pela vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao colegiado do Curso de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Vinícius de Souza Cantarelli, pela orientação, apoio e, principalmente, confiança durante a realização deste trabalho.

Ao professor Marcos Horacio Rostagno, pela amizade e ensinamentos durante a realização do Doutorado Sanduíche.

Aos professores Raimundo Sousa, Rony Ferreira, Márvio Lobão, Ana Paula Peconick e Márcio Zangeronimo pela dedicação, colaboração e amizade.

À professora Dr. Andrea Moreno, pelo fornecimento da cepa bacteriana utilizada para preparar o inóculo do experimento.

À AnimalNutri Ciência e Tecnologia, que me proporcionou grande desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial, Borginho, “Seu Hélio” e Keila pelo auxílio no que foi necessário.

Ao Núcleo de Estudos de Suinocultura (NESUI), pela oportunidade de trabalhar com uma equipe sólida e aos integrantes que já fizeram parte da equipe e sempre continuam ao nosso lado.

Aos amigos Cesar, Fernando, Leticia Amaral, Leticia Mendonça, Guilherme, Carolina, Débora, Jéssica, Túlio, Juliano, Ítalo, Giane e Rhuan, que me ajudaram durante a condução do experimento.

Agradeço a todos que me acompanharam neste período, pois sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

BIOGRAFIA

Hebert Silveira, filho de Hilario da Silveira e Catia Helena Silveira, nasceu em 23 de Abril de 1986, na cidade de Belo Horizonte-MG.

Em fevereiro de 2001 matriculou-se na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF – UFV), obtendo o diploma de Técnico em Agropecuária em dezembro de 2003.

Em agosto de 2004 ingressou na Universidade Federal de Lavras (UFLA), graduando-se em Agronomia em janeiro de 2009.

Em março de 2009 iniciou o mestrado em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Lavras, concentrando seus estudos na área de Produção e Nutrição de Monogástricos.

Em 18 de fevereiro de 2011 submeteu-se à defesa de dissertação obtendo o título de “Mestre”.

Em março de 2011 iniciou o doutorado em Zootecnia na Universidade Federal de Lavras, concentrando seus estudos na área de Produção e Nutrição de Monogástricos, realizando o doutorado sanduíche na *Purdue University* nos Estados Unidos em 2013.

Em 22 de setembro de 2014 submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Doutor”.

RESUMO

Dois experimentos foram realizados para avaliar os efeitos da utilização do ácido benzoico para leitões. No primeiro experimento objetivou-se determinar a expressão para os genes do transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2), transportador de glicose dependente de Na⁺ do tipo1 (SGLT1), Fator nuclear kappa B (p65/RelA) e fator de crescimento semelhante à Insulina 1 (IGF-1) em um modelo *ex-vivo* durante a exposição do jejuno de leitões à L-glutamina, cultura de levedura, ácido benzoico e óleo essencial de orégano, utilizando a técnica de PCR em tempo real. A exposição do jejuno a L-glutamina, células de levedura e óleo essencial de orégano aumentaram a expressão do GLUT2 (P<0,001). A utilização de células de levedura e óleo essencial de orégano aumentaram a expressão de SGLT1 e o ácido benzoico reduziu a expressão de SGLT1 (P=0,0008). A exposição do jejuno à L-glutamina e células de levedura tiveram efeito no aumento da expressão da p65/RelA (P<0,001). A exposição do jejuno à células de levedura teve um efeito no aumento da expressão de IGF-1 (P<0,001). Dessa forma, o ácido benzoico não influenciou na expressão gênica no jejuno de leitões para GLUT2, IGF-1 e p65/RelA. Entretanto favoreceu a redução na expressão do SGLT1. No segundo experimento foram utilizados 224 leitões machos castrados (6,37±0,34Kg) desmamados aos 21 dias, em delineamento experimental em blocos casualizados, com esquema fatorial 4×2, sendo quatro níveis de ácido benzoico (0,00; 0,25; 0,50 e 0,75%), para os leitões inoculados ou não inoculados com *E. coli*, com sete repetições e quatro animais por baía. As variáveis avaliadas foram desempenho de leitões em fase de creche até a terminação, incidência de diarreia, pH dos segmentos intestinais, características morfológicas do intestino, produção de ácidos graxos voláteis no ceco e contagem de *Lactobacilli* spp. e *Bifidobacterium* no ceco. O ácido benzoico influenciou de forma cúbica o pH na porção terminal do íleo (P<0,05). Houve aumento linear (P<0,05) sobre a altura de vilosidade do íleo e redução linear na profundidade de cripta do íleo e cólon de leitões. No ceco foi observado aumento numérico para a produção de ácido butírico (P=0,0708). Houve redução linear (P<0,05) para a incidência de diarreia em resposta a suplementação do ácido benzoico. Entretanto, não foi observado efeito (P>0,05) sobre a contagem de *Lactobacilli* spp. e *Bifidobacterium* no ceco. Com isso, a utilização do ácido benzoico demonstrou efeito linear significativo sobre o peso vivo dos animais, ganho de peso médio diário, consumo de ração médio diário e conversão alimentar aos 63 dias de vida (P<0,05) e para o peso vivo e ganho de peso aos 147 dias (p<0,05). A dose de 0,75% apresenta melhor efeito sobre o, redução do índice de diarreia, melhoria das características morfológicas do intestino e consequentemente o desempenho de leitões na fase de creche até a terminação.

Palavras-chave: Suíno. Ácido orgânico. Expressão gênica. Desempenho. Morfologia. Ácidos graxos. Diarreia.

ABSTRACT

Two experiments were conducted to evaluate the effects of using benzoic acid for piglets. In the first experiment aimed to determine the expression for the genes of the glucose transporter type 2 (GLUT2), glucose transporter-dependent Na⁺ type 1 (SGLT1), Nuclear factor kappa B (p65/RelA) and-like growth factor to insulin 1 (IGF-1) in an *ex-vivo* model jejunum during exposure of piglets to L-glutamine, yeast culture, benzoic acid and oregano essential oil, using the technique of real time PCR. The exposure of the jejunum L-glutamine, yeast culture and oregano essential oil increased the expression of GLUT2 (P<0.001). The use of yeast cells and oregano essential oil increased the expression of SGLT1 and benzoic acid reduced the expression of SGLT1 (P=0.0008). The exposure of the jejunum to L-glutamine and yeast cells had no effect on increasing expression of p65/RelA (P<0.001). The exposure of the jejunum to the yeast cells had an effect on increasing of the expression IGF-1 (P<0.001). Thus, benzoic acid had no effect on gene expression in the jejunum of piglets for GLUT2, IGF-1 and p65/RelA. However, it favored the reduction in the expression of SGLT1. In the second experiment 224 barrows (6.37±0,34Kg) weaned at 21 days, in a randomized block design with 4 × 2 factorial design, with four levels of benzoic acid (0.00; 0.25; 0.50 and 0.75%) for piglets challenged or not challenged with *E. coli* were used, with seven replicates and four pigs per pen. The variables evaluated were the pigs in the nursery phase until termination, incidence of diarrhea, pH of the intestinal segments, morphological features of the intestine, production of volatile fatty acids in the cecum and counting of *Lactobacilli* spp. and *Bifidobacterium* in the cecum. The benzoic acid influenced cubically the pH in the terminal portion of the ileum (P<0.05). There was a linearly increased (P<0.05) on the ileal villus height and linear decrease in crypt depth of the ileum and colon of piglets. In the cecum numerical increase for the butyric acid production (P=0.0708) was observed. There was a linear decrease (P<0.05) for the diarrhea incidence in response to benzoic acid supplementation. However, no effect (P>0.05) was observed on the count of *Lactobacilli* spp. and *Bifidobacterium* in the cecum. Thus, the benzoic acid use showed a significant linear effect on live weight, average daily weight gain, daily feed intake and feed conversion at 63 days of life (P<0.05) and for live weight and weight gain at 147 days (p<0.05). The dosage of 0.75% has a better effect on, reducing the diarrhea index, improvement in the morphological characteristics of the intestine and consequently the piglets performance at nursery phase until termination.

Keywords: Swine. Organic acid. Gene expression. Performance. Morphology. Fatty acids. Diarrhea.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | |
|--|----|
| Tabela 1 Propriedades físicoquímicas de alguns ácidos orgânicos e seus sais .. | 20 |
| Tabela 2 Resumo com resultados dos trabalhos realizados utilizando ácido benzoico para leitões | 33 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Table 1 Gut markers and sequence of primers to real time PCR. | 78 |
| Table 2 mRNA relative abundance of GLUT2, SGLT1, p65/RelA and IGF-1 to piglets received different additives and nutrient ¹ | 78 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 Composição das dietas experimentais..... | 85 |
| Tabela 2 Temperatura máxima e mínima durante a fase de creche do estudo... | 90 |
| Tabela 3 Efeitos dos níveis de ácido benzoico sobre a ocorrência de diarreia em leitões inoculados com <i>E. coli</i> K88+ | 91 |
| Tabela 4 pH dos segmentos intestinais de leitões aos 42 dias de vida, recebendo diferentes níveis de ácido benzoico inoculados com <i>E. coli</i> K88+ | 94 |
| Tabela 5 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo/cripta do jejuno de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com <i>E. coli</i> K88+..... | 96 |
| Tabela 6 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo/cripta do íleo de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com <i>E. coli</i> K88+ | 100 |
| Tabela 7 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a profundidade de criptas no cólon de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com <i>E. coli</i> K88+..... | 101 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 8 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a população de <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacilli</i> spp no ceco de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com <i>E. coli</i> K88+..... | 102 |
| Tabela 9 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a produção de ácidos graxos voláteis no ceco de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com <i>E. coli</i> K88+ | 104 |
| Tabela 10 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o desempenho de leitões inoculados com <i>E. coli</i> K88+ dos 21 aos 42 dias de vida..... | 106 |
| Tabela 11 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o desempenho de leitões inoculados com <i>E. coli</i> K88+ dos 21 aos 49 dias de vida..... | 107 |
| Tabela 12 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o desempenho de leitões inoculados com <i>E. coli</i> K88+ dos 21 aos 63 dias de vida..... | 110 |
| Tabela 13 Efeito residual dos níveis de ácido benzoico na creche em leitões inoculados com <i>E. coli</i> K88+ sobre o desempenho dos 21 aos 147 dias de vida. | 112 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figure 1 mRNA relative abundance of GLUT2 in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. P<0.0001. 74
- Figure 2 mRNA relative abundance of SGLT1 in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. P=0.0008. 75
- Figure 3 mRNA relative abundance of IGF-1 in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. P<0.0001. 76
- Figure 4 mRNA relative abundance of p65/RelA in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. P<0.0001..... 77

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a profundidade de criptas do jejuno de leitões inoculados..... 97
- Figura 2 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a relação vilos:cripta do jejuno de leitões recebendo diferentes níveis de ácido benzoico..... 98
- Figura 3 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a profundidade de criptas do cólon de leitões não inoculados 101

| | |
|---|-----|
| Figura 4 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o peso de leitões aos 49 dias de vida..... | 108 |
| Figura 5 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o ganho de peso diário de leitões aos 49 dias de vida..... | 108 |
| Figura 6 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a conversão alimentar de leitões aos 49 dias de vida..... | 109 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 2.1 Características dos ácidos orgânicos | 18 |
| 2.2 Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos | 22 |
| 2.2.1 Ação sobre pH estomacal | 22 |
| 2.2.2 Ação antimicrobiana | 24 |
| 2.2.3 Aumento da atividade enzimática e estimulação das secreções | 26 |
| 2.2.4 Ação sobre epitélio intestinal | 27 |
| 2.3 Utilização de ácido benzoico em rações para leitões | 29 |
| 2.4 Importância da expressão gênica intestinal de suínos | 35 |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 37 |
| REFERÊNCIAS | 38 |
| CAPÍTULO 2: Pigs show differences in gene expression in the jejunum for the GLUT2, SGLT1, IGF-1 and p65/RelA in response to exposure to benzoic acid, L-glutamine, yeast culture and organo oil using an <i>ex-vivo</i> model | 45 |
| INTRODUCTION | 49 |
| MATERIAL AND METHODS | 52 |
| <i>Ex-vivo</i> model | 52 |
| Real-Time PCR (qPCR) | 54 |
| Statistical analyses | 56 |
| RESULTS | 56 |
| DISCUSSION | 57 |
| ACKNOWLEDGMENTS | 65 |
| REFERENCES | 65 |

| | | |
|------------|---|------------|
| | CAPÍTULO 3: Efeitos do ácido benzoico sobre o desempenho, incidência de diarreia, morfologia intestinal e produção de ácidos graxos voláteis no ceco de leitões inoculados com <i>E. coli</i> K88+ | 79 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 82 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 83 |
| 2.1 | Animais e instalações | 83 |
| 2.2 | Delineamento experimental | 83 |
| 2.3 | Procedimento experimental | 86 |
| 2.3 | Análises estatísticas | 88 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 90 |
| 3.1 | Temperatura ambiental | 90 |
| 3.2 | Incidência de diarreia | 91 |
| 3.3 | pH e morfologia intestinal | 93 |
| 3.4 | Microbiologia e AGVs | 102 |
| 3.5 | Desempenho | 105 |
| 4 | CONCLUSÃO | 114 |
| | REFERÊNCIAS | 115 |

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

A fase pós-desmame é considerada uma das mais críticas na produção de suínos, sendo caracterizada por um período de estresse em que a mudança de instalação, manejo, temperatura e dieta aumentam a susceptibilidade dos leitões a agentes infecciosos presente tanto no ambiente quanto no trato gastrointestinal. Essa situação geralmente proporciona queda no desempenho e aumento da diarreia e mortalidade de animais.

Com o intuito de minimizar esses impactos, os antibióticos foram utilizados por muitos anos, não somente como forma terapêutica, mas também como melhoradores de desempenho. Porém, nos últimos anos, cresceu a preocupação pública sobre o uso de antibióticos promotores de crescimento, referente ao desenvolvimento de cepas resistentes, de patógenos e de seus resíduos nos produtos de origem animal, que levou à proibição dos antibióticos melhoradores de desempenho pela União Europeia em 2006. Dessa forma, diversos estudos à procura de aditivos alternativos ao uso de antibióticos foram iniciados, com objetivo de minimizar as perdas produtivas.

Os ácidos orgânicos, devido à sua atividade antimicrobiana e os seus efeitos benéficos sobre o desempenho dos animais, têm ganhado destaque, podendo ser uma alternativa eficiente para a substituição dos antibióticos melhoradores de desempenho. Entre estes, o ácido benzoico tem ganhado bastante atenção devido à sua capacidade de melhorar o desempenho, controlar bactérias patogênicas e melhorar a saúde intestinal de leitões. Entretanto, dentre os trabalhos presentes na literatura, não é possível avaliar as diferenças entre os efeitos de níveis do ácido benzoico em animais desafiados e não desafiados. Além de não existir informações sobre seu possível efeito na resposta trófica do epitélio intestinal dos suínos. Com isso, objetivou-se neste capítulo realizar uma

revisão sobre os principais mecanismos de ação dos ácidos orgânicos com enfoque nos efeitos da utilização do ácido benzoico para leitões.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características dos ácidos orgânicos

Inicialmente, os ácidos orgânicos foram utilizados como inibidores do crescimento de bactérias ou fungos indesejáveis nas rações, preservando os alimentos armazenados (FRANK, 1994). Seu principal mecanismo de ação é pela sua capacidade de reduzir o pH dos alimentos (PARTANEN; MROZ, 1999).

O uso de ácidos orgânicos na produção suinícola tem sido estudado há mais de 60 anos como preservantes de alimentos. Entretanto, apenas no final dos anos 90 com diversas especulações sobre a proibição do uso de antibióticos melhoradores de desempenho, os ácidos orgânicos foram citados como possíveis alternativos. Entre os aditivos avaliados para minimizar os problemas durante o desmame observa-se que os ácidos orgânicos representam uma das soluções mais satisfatórias encontradas para limitar os problemas da diarreia pós-desmame (LALLÈS, 2008).

Os ácidos orgânicos são aqueles que possuem propriedades ácidas e em sua composição átomos de carbono. Os ácidos orgânicos utilizados como melhoradores de desempenho na suinocultura são caracterizados como ácidos fracos e de cadeia curta (contendo até sete carbonos). São amplamente distribuídos na natureza como constituintes naturais de plantas ou tecido animal, sendo alguns deles formados por meio da fermentação de carboidratos no intestino grosso de suínos e outros no metabolismo intermediário (ROTH; KIRCHGESSNER, 1998). Por isso, são considerados produtos naturais e de baixa toxicidade, podendo ser encontrados na natureza em forma de sais, dissociados ou na forma de *blends* (mistura de ácidos orgânicos e sais).

Existem vários ácidos orgânicos utilizados na alimentação animal com diferentes origens e características (RICKE, 2003). Alguns dos ácidos orgânicos mais utilizados como aditivos alternativos aos antibióticos melhoradores de crescimento na suinocultura são: fórmico, acético, propiônico, láctico, butírico, araquidônico, sórbico, benzoico, fumárico, málico, cítrico e seus respectivos sais, disponíveis como sais de sódio, cálcio e potássio (PARTANEN; SILJANDER-RASI, 2002).

As formas como os ácidos orgânicos se apresentam interferem diretamente na sua manipulação. Ácidos orgânicos na sua forma livre podem apresentar efeitos prejudiciais a equipamentos, visto que na forma líquida (fórmico, acético, propiônico, butírico e láctico) são corrosivos, além apresentar maior risco aos funcionários durante a manipulação na fabricação de ração devido à sua alta volatilização. No consumo de ração pelos animais as formas livres dos ácidos orgânicos podem influenciar diretamente a palatabilidade de dietas, devido alguns ácidos possuem odor repugnante (PARTANEN; MROZ, 1999). Já na forma de sais os ácidos orgânicos são mais fáceis de serem manipulados, pois são menos voláteis, normalmente inodoros, menos corrosivos e podem ser mais solúveis em água do que os ácidos livres e não influenciam no consumo de ração (CANIBE; STEIEN, 2001). Com isso, existem diferenças na eficiência dos sais quando comparado ao seu respectivo ácido (GRÄBER et al., 2012), principalmente por não influenciar o consumo dos animais. Na tabela 1 podem ser observadas as propriedades físicoquímicas dos principais ácidos e seus sais.

Tabela 1 Propriedades físico-químicas de alguns ácidos orgânicos e seus sais

| Nome ¹ | Forma Física ² | Peso molecular | Energia bruta (Kcal/Kg) | Constante De dissociação | CR ³ | Odor ⁴ |
|-------------------|---------------------------|----------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------|
| Fórmico | L | 46,03 | 1,361 | 3,75 | ++(+) | C |
| Acético | L | 60,05 | 3,487 | 4,76 | +++ | C |
| Propiônico | AL | 74,08 | 4,920 | 4,88 | ++ | C |
| Butírico | AL | 88,12 | 5,923 | 4,82 | + | R |
| Lático | L | 90,08 | 3,306 | 3,86 | (+) | LA |
| Sórbico | S | 112,1 | 6,652 | 4,76 | (+) | A |
| Benzoico | S | 122,12 | 6,317 | 4,21 | 0 a (+) | B |
| Fumárico | S | 116,1 | 2,747 | 3,02/4,38 | 0 a (+) | N |
| Málico | L/S | 134,1 | 2,388 | 3,46/5,10 | (+) | M |
| Cítrico | S | 192,1 | 2,436 | 3,1/4,8/6,4 | 0 a ++ | N |
| Formiato-Ca | S | 130,1 | 2,627 | | 0 | N |
| Lactato-Ca | S | 308,3 | 7,165 | | 0 | N |
| Propionato-Ca | S | 184,1 | 9,554 | | 0 | N |
| Diformiato-K | S | 130,0 | 2,723 | | 0 | N |
| Butirato-Ca | S | 214,0 | 11,464 | | 0 | R |
| Citrato-Mg | S | 214,4 | 2,388 | | 0 | N |
| Lactato-Na | S | 112,1 | 3,583 | | 0 | N |

¹ Monocarboxílico (1-7); dicarboxílico (8-9); tricarboxílico (10); sais orgânicos (11-17);

² L: Líquido; AL: Apenas líquido; S: Sólido;

³ CR = Taxa de corrosão: alta (+++), média (++) , baixa (+), Insignificante (0);

⁴ C: Cáustico; R: Rançoso; LA: Leite azedo; A: Acre; B: Benzaldeído; N: Neutro; M: Maça.

Fonte: Adaptado de Mroz (2005)

Atualmente, seus efeitos não são vistos somente na preservação de alimentos, mas dietas que contêm ácidos orgânicos mostram melhor desempenho dos animais. Dentre as funções atribuídas a melhoria do desempenho destes compostos pode-se destacar as antimicrobianas, o efeito

benéfico na digestibilidade e na absorção de nutrientes (FREITAS; LOPES, 2006).

Os efeitos dos acidificantes na digestibilidade estão diretamente ligados às suas propriedades químicas, das quais uma das principais é a constante de dissociação (pK_a), que depende do pK_a do ácido e do pH do meio, interferindo diretamente na sua capacidade antimicrobiana e de acidificação (VIOLA; VIEIRA, 2003). Quanto mais baixo o pK_a do ácido orgânico maior a sua capacidade de diminuir o pH do meio (maior dissociação). Ácidos orgânicos usados como aditivos tem valor de pK_a entre 3 e 5, o que resulta em dissociação intermediária ou baixa (FREITAG et al., 1999).

Além da acidificação do alimento ou do estômago, na forma não dissociada os ácidos orgânicos podem atuar na inibição seletiva de microrganismos patogênicos intestinais, pela capacidade de penetrar a parede da bactéria e dissociar-se internamente prejudicando seu metabolismo vital. Os ácidos orgânicos também podem ser absorvidos ao longo do trato digestório, proporcionando uma fonte de energia adicional para os animais (ROTH; KIRCHGESSNER; EIDELSBURGER, 1993).

Geralmente a resposta à suplementação com ácido orgânico é mais pronunciada em leitões do que em animais de terminação, devido à fisiologia digestiva imatura dos animais mais jovens, embora as respostas variem consideravelmente entre os diferentes ácidos. A variabilidade dos resultados pode estar relacionada às diferenças no tipo e nível de inclusão do ácido utilizado, da composição e da capacidade de tamponamento da dieta, idade e a genética dos animais (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993).

2.2 Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos

O modo de ação dos ácidos individuais ou seus sais no metabolismo animal é de natureza específica (PARTANEN, 2001). Nos tópicos a seguir serão abordados os principais mecanismos de ação dos ácidos orgânicos, tendo esses mecanismos efeitos diretos no desempenho dos animais de uma forma geral.

2.2.1 Ação sobre pH estomacal

A maioria dos ácidos orgânicos e os seus sais suplementares atuam principalmente na parte proximal do trato gastrointestinal. Em suínos, uma atividade importante dos acidificantes é a redução do pH do estômago (DESAI; RANADE, 2007), podendo resultar em maior atividade de enzimas digestivas, como a pepsina e lipase.

Nos monogástricos, a digestão das proteínas começa no estômago com a ação da pepsina, onde seu precursor, o pepsinogênio é secretado pela mucosa do estômago e é ativado pelo ácido clorídrico (HCl). A conversão de pepsinogênio em pepsina ocorre rapidamente a um pH 2,0 e mais lentamente a um pH entre 5,0 e 6,0. Por sua vez, a pepsina apresenta maior atividade em um ambiente ácido: pH 2,0 a 3,5 e sua atividade diminui rapidamente acima desse pH (SURYANARAYANA et al., 2012). Com isso, a acidificação do meio gástrico é necessária para a conversão de pepsinogênio em pepsina e a sua atividade. Entretanto, nas primeiras semanas pós-desmame, o pH do conteúdo estomacal é elevado, em função da capacidade insuficiente de secreção de ácido clorídrico pelos leitões. A suplementação com ácidos orgânicos reduz mais rapidamente o pH do conteúdo estomacal, com valores ótimos entre 3 e 4, compensando a

secreção endógena inadequada de HCl no desmame dos suínos, facilitando a ativação do pepsinogênio.

Entretanto, cuidados são necessários, pois a suplementação da dieta com uma fonte de ácido orgânico (formiato de Ca) afetou a morfologia da mucosa oxíntica no estômago, diminuindo o número de células parietais secretoras de HCl e aumentando as células produtoras de somatostatina. A somatostatina tem ação supressora na secreção de HCl, e reduz a expressão do gene $H^+/K^+-ATPase$ (BOSI et al., 2006). Assim, os ácidos orgânicos podem exercer um *feed-back* negativo sobre a secreção de ácido clorídrico. A suplementação na dieta com formiato de cálcio revestido com gordura não reduziu o número de células parietais gástricas de leitões (ROSELLI et al., 2005).

Em função da reduzida capacidade de secreção ácida pelos leitões, um fator determinante no pH do conteúdo gástrico é o poder tamponante da dieta (VIOLA; VIEIRA, 2003). Tampões são caracterizados por terem capacidade de resistir a alterações de pH quando são adicionadas certas quantidades de ácidos ou base na dieta. Os ingredientes utilizados nas formulações possuem capacidade diferente de tamponamento, em que os cereais possuem menor capacidade tamponante, as proteínas possuem um poder médio a alto e as fontes minerais apresentam maior capacidade tamponante, exceto os fosfatos monossódico e bicálcico (JASAITIS; WOHLT; EVANS, 1987). Dietas com alto poder tamponante resistem à acidificação estomacal, causando redução da digestibilidade ileal aparente da proteína bruta e dos aminoácidos dietéticos (BLANK et al., 1999). Assim, à medida que os ácidos orgânicos reduzem o pH gástrico e da dieta, podem melhorar a digestibilidade das proteínas e também de outros nutrientes, especialmente nos leitões recém-desmamados.

Como feito da melhora da digestibilidade, o tempo de retenção gástrica pode ser aumentado e, devido à menor taxa de esvaziamento gástrico, as proteínas sofrem melhor hidrólise, aumentam a digestão das proteínas, absorção

e retenção dos aminoácidos (GABERT; SAUER, 1995). Além disso, a redução no pH do conteúdo do intestino delgado proporcionada pelos ácidos orgânicos pode melhorar a absorção de minerais, tais como cálcio, fósforo, magnésio e zinco (KIRCHGESSNER; ROTH, 1988). Seus efeitos na utilização de fósforo do fitato pode resultar de uma alteração no pH do conteúdo trato gastrintestinal para um pH mais favorável para ação da fitase (LIEM; PESTI; EDWARDS JÚNIOR, 2008), além de uma maior solubilização do fósforo presente na dieta. Com isso, os ácidos orgânicos podem promover melhor absorção dos minerais, reduzindo a excreção de nutrientes nos dejetos e a poluição ambiental.

2.2.2 Ação antimicrobiana

Os efeitos dos acidificantes sobre a microbiota intestinal dependem do tipo e nível de inclusão do ácido utilizado, da capacidade de tamponamento da dieta, do pKa do ácido e da idade dos animais (METZLER et al., 2007). O efeito sobre a microflora é geralmente semelhante no estômago e no intestino delgado (CANIBE; STEIEN, 2001).

Com a mudança de dieta dos leitões ao desmame (líquida para sólida) o pH estomacal se mantém elevado devido à insuficiente produção de ácido clorídrico no estômago nas primeiras semanas pós-desmame, facilitando a entrada e aumento na proliferação de microrganismos patogênicos como *Salmonella spp.* e *E. coli*. Um pH elevado favorece o crescimento de bactérias patogênicas, por outro lado, meios com pH reduzidos favorecem o desenvolvimento de microrganismos benéficos, como *Lactobacilli ssp.* e *Bifidobacterium* (BLANCHARD, 2000; WALSH et al., 2003) e redução da população de *Clostridium perfringens*, *E. coli* e *Salmonella ssp.* Dessa forma, a melhor acidificação do meio, proporcionada por alguns ácidos orgânicos, auxilia

no controle da população microbiana no intestino, mantendo o equilíbrio e o controle de microrganismos patogênicos.

Além do controle proporcionado pela alteração do pH, os ácidos orgânicos na forma não dissociada são lipofílicos e podem difundir-se livremente através da membrana semipermeável de bactérias *gram*-negativas. Uma vez dentro da célula, em que o pH é mantido por volta de 7,0, o ácido se dissocia em cátions e ânions. Na tentativa de reestabelacer a homeostase celular o microrganismo inicia um processo de retirada dos prótons (H^+) acumulados em seu interior pela ação da bomba Na^+/K^+ , que, por ser um processo ativo, promove o esgotamento e morte da bactéria. Além disso, a redução do pH citoplasmático causa a morte da bactéria pela desnaturação da proteína e do DNA, além de comprometerem outros processos vitais, como o transporte de substrato e o desacoplamento da fosforilação oxidativa com o sistema de transporte de elétrons (SILVA, 2002; VIOLA; VIEIRA, 2003).

O efeito pode ser mais forte em algumas bactérias que em outras (PATANEN, 2001). A parede celular de bactéria *gram*-positiva é espessa, 10 a 50 μm , chegando até a 80 μm , composta quase que completamente por peptidoglicano. As bactérias *gram*-negativas possuem parede menos espessa, 7,5 a 10 μm , com uma camada única de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente; lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo (SLOTS; TAUBMAN, 1992). Devido ao fato de os ácidos orgânicos na forma não dissociada difundirem-se livremente através da membrana semipermeável de bactérias *gram*-negativas pela sua capacidade lipofílica, ácidos com menor poder dissociativo atuam contra bactérias *gram*-negativas de forma mais eficiente. Entretanto, os ácidos orgânicos também podem ter efeitos fortes na inibição de bactérias *gram*-positivas (SURYANARAYANA et al., 2012).

Com isso, os ácidos orgânicos atuam tanto no controle de bactérias *gram*-positivas e negativas, proporcionando melhor homeostase da microbiota no intestino dos animais. Concentrações mínimas inibitórias dos ácidos orgânicos são específicas para cada ácido (STRAUSS; HAYLER, 2001), sendo que as bactérias *gram*-negativas são mais sensíveis aos ácidos com menos de oito ácidos de carbono e as bactérias *gram*-positivas são mais sensíveis aos ácidos orgânicos de cadeia longa (PARTANEN, 2001).

Knarreborg et al. (2001) investigaram os efeitos dos ácidos fórmico, propiônico, butírico, láctico, benzoico e ácidos fumárico, bem como diformiato de potássio sobre as alterações de população de coliformes e de bactérias do ácido láctico na digesta *in vitro*. Os autores estabeleceram a seguinte ordem na capacidade bactericida contra coliformes e bactérias do ácido láctico: propiônico < fórmico < butírico < láctico < fumárico < benzoico, independentemente da do pH da digesta (ácido ou neutro). Em outro estudo, Naughton e Jensen (2001) demonstraram que a potência desses ácidos contra *Salmonella typhimurium* na digesta a pH 4 foi: acético < fórmico < propiônico < láctico < sórbico < benzoico.

O melhor controle do crescimento da população de bactérias presentes no trato gastrointestinal reduz as necessidades metabólicas dos microrganismos, aumentando a disponibilidade e a absorção de nutrientes, principalmente aminoácidos (ØVERLAND et al., 2000).

2.2.3 Aumento da atividade enzimática e estimulação das secreções

Pouca informação está disponível relacionada aos efeitos dos ácidos orgânicos na atividade enzimática e estimulação das secreções pancreáticas. O ácido clorídrico no estômago mantém o pH em torno de 1,3 e o ácido láctico produzido pela digestão do leite da porca no estômago do leitão é capaz de

manter o pH próximo a 3,8 (HARADA et al., 1988). Acima desses valores de pH, os níveis séricos de secretina são reduzidos e com isso, a redução do pH estomacal pelos ácidos orgânicos favorecem o aumento na secretina sérica. As secreções pancreáticas e biliares são estimuladas pela liberação de secretina (HARADA et al., 1988). Com isso, o aumento da atividade enzimática no estômago e das secreções pancreáticas é favorecido pela redução do pH gastrintestinal.

Além dos efeitos proporcionados pela secretina, os produtos resultantes da digestão proteica pela pepsina, ao chegarem ao duodeno, também favorecem a estimulação da secreção de bicarbonato, de enzimas pancreáticas e também secreção biliar, resultando no aumento da digestibilidade aparente total das dietas (PARTANEN, 2001).

2.2.4 Ação sobre epitélio intestinal

No período de desmame ocorrem mudanças morfológicas no intestino que são decorrentes do estresse pós-desmame, tais como encurtamento das vilosidades, o que indica destruição dos enterócitos e causa perda de enzimas digestivas reduzindo a área absorptiva do trato digestório dos leitões. Estudos demonstram que os ácidos orgânicos podem influenciar no metabolismo das células da mucosa intestinal (DIAO et al., 2014; GALFI; BOKORI 1990; SAKATA et al., 1995).

Ácidos graxos de cadeia curta, como acético, propiônico e butírico produzidos pela fermentação microbiana da fibra da dieta no intestino grosso, aumentam a proliferação de células epiteliais (SAKATA et al., 1995). Galfi e Bokori (1990) demonstraram aumento no comprimento da microvilosidade no íleo e da profundidade de criptas do ceco em suínos em crescimento recebendo dietas suplementadas com ácido butírico, sendo considerada a principal fonte de

energia para as células epiteliais do intestino grosso e eficaz para promover o crescimento epitelial.

Além de servir como fonte de energia para o epitélio intestinal, os ácidos orgânicos podem alterar o perfil de fermentação do intestino grosso pela modulação da microbiota, aumentando a síntese de ácidos graxos de cadeia curta por fermentação.

Assim, os ácidos orgânicos podem atuar sobre as vilosidades, influenciam a morfologia da mucosa mantendo sua integridade e altura, além de aumentar o número de células epiteliais, por servirem como substrato no metabolismo intermediário.

2.3 Utilização de ácido benzoico em rações para leitões

O maior grupo dos ácidos orgânicos é o dos carboxílicos, que são caracterizados pela presença do grupo funcional carboxila (COOH) (SNYDER, 1995). O ácido benzoico ($C_6H_5C(O)OH$) é o mais simples ácido carboxílico aromático, e forma cristais que variam de branco a incolor. Esse ácido foi obtido pela primeira vez no começo do Século XVI, por meio da sublimação da goma de benjoim do Benjoeiro (*Styrax benzoin*).

O ácido benzoico foi um dos primeiros conservantes de alimentos permitidos pelo “*Food and Drugs Administration*”. Por causa de sua atividade antibacteriana e antifúngica, tem sido utilizado na preservação de vários tipos de alimentos, bem como subprodutos de frigoríficos utilizados para a alimentação de animais (PÖLÖNEN; TOIVONEN; MÄKELÄ, 1998). O ácido benzoico e seus sais (Na e K) são os conservantes de alimentos mais utilizados, entretanto, seu uso como aditivo na alimentação de leitões é recente (KLUGE; BROZ; EDER, 2006).

Na nutrição de leitões o ácido benzoico tem demonstrado uma vasta gama de resultados na melhoria do desempenho, controle da microbiota intestinal, melhoria da morfologia intestinal e digestibilidade de nutrientes (ALVARADO et al. 2013; DIAO et al., 2013, 2014; GRÄBER et al., 2012; PAPATSIROS et al., 2011). Um dos primeiros estudos avaliando o uso de ácido benzoico para leitões demonstrou melhor ganho de peso para os animais nas dosagens de 5 e 10 Kg/ton, maior retenção de nitrogênio e redução do número de bactérias aeróbias, anaeróbias e bactérias produtoras de ácido láctico no estômago de uma maneira dose-dependente. No duodeno, por outro lado, principalmente, o ácido benzoico reduziu o número de bactérias *gram*-negativas, e no íleo reduziu a quantidade total de bactérias aeróbias (KLUGE; BROZ;

EDER, 2006). Esses efeitos estão associados diretamente ao mecanismo de ação do ácido benzoico no controle de bactérias.

O ácido benzoico é um ácido fraco com uma constante de dissociação relativamente alta ($pK_a=4,21$) e baixa solubilidade em água. Com isso, o ácido benzoico se encontra em grande parte no estômago na forma não dissociada. Os ácidos orgânicos na forma não dissociada podem passivamente difundir através da parede celular bacteriana, após internalizar a bactéria o ácido se dissocia. Essa dissociação ocorre pois o pH da bactéria é superior ao pK_a do ácido. Com sua dissociação o pH interno diminui, o que é incompatível com certos tipos de bactérias que não toleram um gradiente acentuado no pH transmembrana. Nesse caso, um mecanismo de resistência que reage a esse tipo de estresse celular irá ser ativado e os prótons serão bombeados para fora da bactéria pela bomba Na^+/K^+ . Os ânions irão acumular-se na célula, modificar a pressão osmótica interna e tornar-se tóxico para a bactéria (cessação da glicólise e de síntese de ácidos nucleicos, reações enzimáticas bloqueadas, perturbação no transporte de membranas, etc.) (JENSEN, 2001), além de provocar morte bacteriana por exaustão pelo excesso da ativação da bomba Na^+/K^+ na tentativa de controlar o pH interno.

Posteriormente, Guggenbuhl et al. (2007) observaram que o nível de 5Kg/ton de ácido benzoico melhorou o desempenho zootécnico, aumentou a digestibilidade íleal total de energia e nitrogênio e também reduziu a quantidade de bactérias produtoras de ácido lático e de *E. Coli* no ceco dos leitões.

Outros estudos demonstram que o grau de biodiversidade da microbiota gastrintestinal foi superior no íleo dos leitões suplementados com ácido benzoico (5 Kg/ton) (TORRALLARDONA et al., 2007). Esse resultado, associado com o melhor desempenho observado no estudo poderia ser uma indicação de que um grau mais elevado de biodiversidade está associado à microbiota saudável no intestino dos animais.

Gheler et al. (2009) analisaram os efeitos da inclusão de diferentes níveis de ácido benzoico na dieta sobre o desempenho e a morfologia intestinal do duodeno de leitões. Esses autores concluíram que os níveis de 5,0 até 7,5 Kg/ton melhoraram as variáveis de desempenho para leitões na fase de creche e reduziram a incidência de diarreia. Os resultados ainda demonstraram maior altura de vilosidade e menor profundidade de criptas no intestino dos leitões independente do nível de ácido utilizado. Porém, a relação entre altura de vilosidade e profundidade de criptas não foi influenciada.

Leitões desmamados aos 21 dias e desafiados com *E.coli* enterotoxigênica não foi possível observar redução na incidência de diarreia e na excreção de *E.coli* e conseqüentemente nenhuma melhoria sobre o desempenho dos animais (HALAS et al., 2009). Os leitões apresentaram redução do peso vivo na primeira semana deste estudo, o que pode ter influenciado nos resultados do trabalho.

Posteriormente Halas et al. (2010), observaram melhoria do desempenho, da morfologia intestinal e da diversidade de bactérias no ceco de leitões suplementados com ácido benzoico (5 Kg/ton) sem a realização do desafio experimental.

Papatsiros et al. (2011) avaliaram a eficácia de um probiótico contendo *Bacillus cereus* var. *toyoi* e ácido benzoico no desempenho produtivo e diarreia em leitões na fase inicial. Os autores observaram que suplementando 5Kg/Ton de ácido benzoico, *Bacillus cereus* 1×10^9 /Kg ou a associação desses produtos ocorre melhora no desempenho e redução na severidade da diarreia em leitões na fase de creche. Apesar de seus efeitos antimicrobianos, o ácido benzoico não apresenta antagonismo aos probióticos quando utilizado em associação.

Ao comparar os efeitos do ácido benzoico (3,5 e 5Kg/ton) e seu sal benzoato de sódio (4 Kg/ton), foi possível observar que diferentemente do seu sal, apenas o ácido benzoico foi efetivo na redução do pH urinário de leitões na

fase de creche. Para o desempenho, a suplementação do ácido benzoico demonstrou melhores resultados durante todo o período experimental e para a retenção de nitrogênio, apenas o nível de 5 Kg/ton de ácido benzoico foi efetivo (GRÄBER et al., 2012).

Recentemente, efeitos sinérgicos na retenção de nitrogênio pela suplementação do ácido benzoico com probiótico à base de *Bacillus* foram demonstrados. Neste mesmo estudo foram observados melhoria do desempenho e redução na contagem de coliformes para os animais suplementados com ácido benzoico (5 Kg/ton) (ALVARADO et al., 2013). Novamente a associação desses aditivos não interferiu no desenvolvimento do probiótico no intestino dos animais, entretanto não foi demonstrado como ocorre à modulação seletiva de microrganismos no trato gastrintestinal. Sendo que o efeito do ácido benzoico e prebiótico é aditivo sobre o desempenho dos animais.

A suplementação dietética de ácido benzoico 5Kg/Ton melhorou a conversão alimentar e aumentou a digestibilidade de nutrientes, conjuntamente com o aumento das atividades de tripsina, amilase, maltase, lipase, lactase e sacarase no jejuno em leitões desmamados (DIAO et al., 2013). Isso significa que o ácido benzoico pode aprimorar o desempenho de leitões por meio de melhoria na digestão e absorção de nutrientes.

Além disso, os suínos alimentados com a dieta suplementada com 5 Kg/ton de ácido benzoico se mostraram propensos a reduzir a diarreia (DIAO et al., 2013). Portanto, propõe-se que o ácido benzoico melhora a saúde do trato gastrintestinal e conseqüentemente o desempenho, uma vez que a diminuição da diarreia pode ser provocada pela inibição das bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* (KLUGE; BROZ; EDER, 2006; LI et al., 2012).

Em estudo posterior, para avaliar os efeitos diretos sobre a população microbiana e alterações do trato gastrintestinal, Diao et al. (2014) observaram que a suplementação dietética de 5 Kg/ton de ácido benzoico melhorou a saúde

intestinal dos leitões através da diminuição dos valores de pH da digesta no ceco e cólon, mantendo o equilíbrio da microbiota intestinal e o desenvolvimento da morfologia intestinal em leitões desmamados.

Além de seus efeitos antimicrobianos, o ácido benzoico também pode reduzir o pH urinário dos suínos (KLUGE; BROZ; EDER, 2006; PLITZNER et al., 2006). Depois da absorção a partir do intestino delgado, o ácido benzoico é transportado para o fígado, onde se conjuga com o aminoácido glicina formando o ácido hipúrico. Nessa forma, entre 90 a 100% o ácido benzoico é então excretado através da urina em aproximadamente 24 horas (BRIDGES et al., 1970). A diminuição do pH urinário pode reduzir significativamente as emissões de amoníaco (HANSEN; SORENSEN; LYNGBYE, 2007; MROZ et al., 2000). Esses resultados possuem grande importância na emissão de poluentes pela suinocultura, principalmente em animais em crescimento e terminação.

Um resumo dos principais resultados do uso de ácido benzoico para leitões pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 Resumo com resultados dos trabalhos realizados utilizando ácido benzoico para leitões

| Autores | Dose utilizada | Principais resultados |
|------------------------|-----------------------|--|
| Diao et al. (2014) | 5 Kg/ton | → Aumento de <i>Bifidobacterium</i> no íleo e <i>Bacillus</i> no ceco. Redução de <i>E.coli</i> no íleo e ceco. Aumento relação vilosidades/criptas no intestino delgado. Aumento de ácidos graxos voláteis no ceco. Diminuição pH no cólon. |
| Diao et al. (2013) | 5 Kg/ton | → Melhora do desempenho dos leitões, aumento da digestibilidade de nutrientes e da atividade das enzimas tripsina, lipase, amilase, maltase, sucrase e lactase no jejuno. |
| Alvarado et al. (2013) | 5 Kg/ton | → Melhora do desempenho dos leitões, redução do pH e contagem de coliformes nos dejetos. |
| Gräber et al. (2012) | 3,5 e 5,0 Kg/ton | → Dois níveis melhoraram o desempenho dos leitões. Apenas 5 Kg/ton aumentou retenção de |

| | | |
|-----------------------------|-----------------------|--|
| | | nitrogênio. Sem diferença na absorção e excreção de Ca e P. |
| Papatsiros et al. (2011) | 5 Kg/ton | → Melhoria no desempenho e redução na incidência de diarreia em leitões. |
| Halas et al. (2010) | 5 Kg/ton | → Melhoria no desempenho, aumento da digestibilidade total de nitrogênio e aumento da diversidade bacteriana no ceco. |
| Halas et al. (2009) | 5 Kg/ton | → Não foi eficiente na redução de diarreia, controle da população de ETEC e melhoria no desempenho de animais desafiados com ETEC. |
| Gheler et al. (2009) | 2,5; 5,0 e 7,5 Kg/ton | → Melhoria no desempenho e redução da incidência de diarreia em leitões para doses de 5 e 7,5 Kg/ton. |
| Torrallardona et al. (2007) | 5 Kg/ ton | → Melhorou o desempenho e aumentou a diversidade da microbiota no íleo de leitões. |
| Guggenbuhl et al. (2007) | 5 Kg/ton | → Melhoria no desempenho e redução da <i>E. coli</i> e bactérias do ácido lático no ceco de leitões. |
| Kluge, Broz e Eder (2006) | 5 e 10 Kg/ton | → Melhoria do desempenho, maior retenção de nitrogênio, redução de bactérias no intestino e estômago, com melhores resultados com 10 Kg/ton. |

Dessa forma, o ácido benzoico é um eficiente melhorador de crescimento de leitões, sendo seus principais mecanismos de ação relacionados ao controle de bactérias patogênicas, melhoria das características morfofisiológicas do epitélio intestinal, melhoria na retenção de nitrogênio e modulação da microbiota no íleo e ceco.

No entanto, dentre os trabalhos presentes na literatura, não é possível avaliar as diferenças entre os efeitos do ácido benzoico em animais desafiados e não desafiados de uma forma dose dependente. Além de não existir informações sobre seu possível efeito na resposta sobre a expressão gênica do epitélio intestinal dos suínos.

2.4 Importância da expressão gênica intestinal de suínos

O desenvolvimento intestinal é profundamente influenciado por fatores ambientais como microrganismos, alimentos e aditivos nas rações. Diversas alterações na expressão gênica podem ocorrer durante o desmame dos leitões, tendo em vista que é a fase que possui maior alteração no ambiente dos animais. Com isso, diversos genes intestinais vêm sendo recentemente utilizados para caracterizar o estado de saúde e desenvolvimento dos animais.

O período pós-parto compreende importantes modificações no trato digestório dos leitões (WANG; QIAU; LI, 2009). A primeira ingestão de colostro causa aceleração no crescimento do intestino delgado, que dobra de tamanho e aumenta seu comprimento em 30% em três dias após o nascimento (XU et al., 1992). Além dos fatores nutritivos do colostro, outras substâncias como as imunoglobulinas e fatores de crescimento como o IGF-1, estimulam a proliferação celular (ZHANG et al., 1998).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-2) constituem um sistema endócrino/autócrino/parácrino que media o crescimento, diferenciação e a apoptose das células (SIMMEN et al., 1998). Uma vez que o tecido intestinal pode expressar proteínas de IGF e seus receptores, é possível que esses hormônios possam contribuir para o desenvolvimento pós-natal e a maturação gastrintestinal dos leitões durante toda sua vida produtiva (SHEN; XU, 2000).

O desmame provoca um aumento na expressão de citocinas inflamatórias e respostas inflamatórias de fase aguda no intestino dos leitões (PIÉ et al., 2004). Além das citocinas sabe-se que a expressão gênica da lactoferrina no duodeno de leitões diminui com o aumento da idade (WANG; HAN; XU, 2006).

A absorção de glicose no intestino delgado depende de dois tipos de mecanismos de transporte. Uma é transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2) e a outra é o transportador de glicose dependente de Na^+ do tipo 1 (SGLT1). A expressão gênica destes transportadores é crucial para a absorção e transporte adequados de glicose no intestino delgado (RODRIGUEZ et al., 2004). Esses podem ser importantes indicadores da resposta intestinal dos leitões ao ambiente.

Dessa forma, identificar as variações da resposta de diferentes genes intestinais aos aditivos da dieta pode ser um novo parâmetro para avaliar a respostas da utilização dos melhoradores de desempenho para os leitões, com intuito de verificar novos mecanismos de ação na resposta trófica e desenvolvimento intestinal dos suínos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dietas com ácidos orgânicos e seus sais possuem capacidade de reduzir o pH gástrico, com estímulo na secreção de enzimas digestivas pelo pâncreas. Além disso, reduzem a capacidade tamponante da dieta e exercem funções antimicrobianas, inibindo a proliferação e/ou colonização de microrganismos indesejáveis tanto nas matérias-primas e rações, quanto no trato gastrintestinal dos animais. Estas ações têm influência direta na morfofisiologia da mucosa intestinal, que resulta em melhora no desempenho e na saúde dos animais, especialmente nos leitões desmamados.

O ácido benzoico é um eficiente melhorador de crescimento de leitões. Entretanto, dentre os trabalhos presentes na literatura, não é possível avaliar as diferenças entre os efeitos do ácido benzoico em animais desafiados e não desafiados. Além de não existir informações sobre seu possível efeito na expressão gênica do epitélio intestinal dos suínos.

REFERÊNCIAS

ALVARADO, P. et al. Ácido benzoico y un producto basado en especies de *Bacillus* para proteger la productividad de los lechones y al ambiente **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, Mérida, v. 4, n. 4, p. 447-468, 2013.

BLANCHARD, P. Less buffering more enzymes and organic acids. **Pig Progress**, Doetinchen, v. 16, n. 3, p. 23-25, 2000.

BLANK, R. et al. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 2974-2984, 1999.

BOSI, P. et al. Continuous dietary supply of free calcium formate negatively affects parietal cell population and gastric RNA expression for H⁺/K⁺-ATPase in weaning pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, p. 1229-1235, 2006.

BRIDGES, J. W. The fate of benzoic acid in various species. **The Biochemical Journal**, London, v. 118, p. 47-51, 1970.

CANIBE, N.; STEIEN, S. H. Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p. 2123-2133, 2001.

DESAI, D. P.; RANADE, A. Acidifiers in poultry diets and poultry production. In: Acidifiers in animal nutrition. In: LUCKSTADT, C. (Ed.). **A guide for feed preservation and acidification to promote animal performance**. Nottingham: Nottingham University, 2007. p. 63-69.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid on growth performance, serum biochemical parameters, nutrient digestibility and digestive enzymes activities of jejuna digesta in weaner piglets. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, Beijing, v. 25, p. 768-777, 2013.

DIAO, H. et al. Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 167, p. 249–256, 2014.

FRANK, K. Measures to preserve food and feeds from bacterial damage. **Übersichten zur Tierernährung**, Frankfurt, v. 22, p. 149-163, 1994.

FREITAG, M. et al. Biologische effekte konventioneller und alternativer Leistungsförderer. **Feed Magazine/Kraftfutter**, Frankfurt, v. 2, p. 49-57, 1999.

FREITAS, L. S.; LOPES, D. C. Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days old. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 35, p. 1711-1719, 2006.

GABERT, V. M.; SAUER, W. C. The effects of supplementing diets for weanling pigs with organic acids: a review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 3, p. 73-87, 1994 ou 1995.

GALFI, P.; BOKORI, J. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.38, n.1-2, p.3–17, 1990.

GHELER et al. Uso de ácido benzoico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 11, p. 2182-2187, 2009.

GRÄBER, T. et al. Effects of dietary benzoic acid and sodium-benzoate on performance, nitrogen and mineral balance and hippuric acid excretion of piglets. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 66, n. 3, p. 227–236, 2012.

GUGGENBUHL, A. et al. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 108, p. 218–221, 2007.

HALAS, T. et al. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, p. 137-147, 2009.

HALAS, D. et al. Effects of benzoic acid and inulin on ammonia-nitrogen excretion, plasma urea levels, and the pH in faeces and urine of weaner pigs. **Livestock Science**. Amsterdam, v.134, p. 243–245, 2010.

HANSEN, C. F.; SORENSEN, G.; LYNGBYE, M. Reduced diet crude protein level, benzoic acid and inulin reduced ammonia, but failed to influence odour emission from finishing pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 109, p. 228-231, 2007.

HARADA, E. et al. Postnatal development of biliary and pancreatic exocrine secretion in piglets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 91, p. 43-51, 1988.

JASAITIS, D. K.; WOHLT, J. E.; EVANS, J. L. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 7, p. 1391-1403, 1987.

JENSEN, B. B. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in gut. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERG, J. E. (Ed.). **Gut environment of pigs**. Nottingham: Nottingham University, 2001. p. 181–200.

KNARREBORG, A. et al. In vitro methodology to evaluate the effect of various additives on the microflora in gastrointestinal tract of pigs. In: LINDBERG, J. E.; OGLE, B. (Ed.). **Digestive physiology in pigs**. Uppsala: Oxford University, 2001. p. 302-304.

KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 90, p. 316–324, 2006.

LALLÈS, J. P. Nutrition and gut health of the young pig around weaning: what news? **Archiva Zootechnica**, Erie, v. 11, n. 1, p. 5-15, 2008

LIEM, A.; PESTI, G. M.; EDWARDS JÚNIOR, H. M. The effect of several organic acids on phytate phosphorus hydrolysis in Broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 689-693, 2008.

MROZ, Z. et al. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p. 2622-2632, 2000.

MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. **Advances in Pork Production**, Netherlands, v. 16, p. 169, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine**. 11th ed. Washington, 2012.

NAUGHTON, P. J.; JENSEN, B. B. A bioreactor system to study survival of *Salmonella typhimurium* in pig gut content. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 114, p. 1-4, 2001.

ØVERLAND, M. et al. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 7, p. 1875-1884, July 2000.

PAPATSIROS, V.G. et al. Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus Cereus* var. *toyoi* in weaned pig nutrition. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 14, n. 1, p. 117-125, 2011

PARTANEN, K.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 12, p. 117-145, 1999.

PARTANEN, K. Organic acids: their efficacy and modes of action in pigs. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERG, J. E. **Gut environment of pigs**. Nottingham: Nottingham University, 2001. p. 201-218.

PARTANEN, K.; SILJANDER-RASI, H. Performance of growing-finishing pigs fed medium- or high-fibre diets supplemented with avilamycin, formic acid or formic acid-sorbate blend. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 73, p. 139-152, 2002.

PIÉ, S. et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 641-647, 2004.

PLITZNER, C. et al. Influence of adding 0.5 % or 1.0% of benzoic acid on growth performance and urinary parameters of fattening pigs. **Slovakian Journal of Animal Science**, Champaign, v. 39, p. 69-73, 2006.

PÖLÖNEN, I.; TOIVONEN, V.; MÄKELÄ, J. Different combinations of formic, propionic and benzoic acids in slaughter offal preservation for feeding to fur animals. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 71, p. 197-202, 1998.

RAVIDRAN, V.; KORNEGAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 62, p. 313-322, 1993.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 632-639, 2003.

ROSELLI, M. et al. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. **Animal Research**, Les Ulis, v. 54, p. 203–218, 2005.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M.; EIDELSBURGER, U. Nutritive value of lactic acid in piglet rearing. **Agribiological Research**, Berlin, v. 46, p. 229-239, 1993.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 7, p. 25-33, 1998.

SAKATA, T. et al. Effect of n-butyric acid on epithelial cell proliferation of pig colonic mucosa in short-term culture. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Zurich, v. 102, p. 163-164, 1995.

SHEN, W. H., XU, R. J. Stability of insulin-like growth factor I in the gastrointestinal lumen in neonatal pigs. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 30, p. 299-304, 2000.

SIMMEN, F. A. et al. The porcine Insulin-like growth factor system: At the interface of Nutrition, growth and reproduction. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 3155-3205, 1998.

SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby, 1992, 649 p.

SNYDER, C. H. **The extraordinary chemistry of ordinary things**. 2nd ed. Nova Iorque: J. Wiley & Sons, 1995. p. 242-245.

SNYDER, C. H. **The extraordinary chemistry of ordinary things**. 2nd ed. Nova Iorque: J. Wiley & Sons, 1995. p. 574-575.

STRAUSS, G.; HAYLER, T. Effects of organic acids on microorganisms. **Feed Magazine/Kraftfutter**, Frankfurt, v. 4, p. 147-151, 2001.

SURYANAYARA, M. V. A. N. et al. Organic acids in swine feeding: a review. **Agricultural Science Research Journals**, Ghana, v. 2, n. 9, p. 523-533, Sept. 2012.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Ácidos orgânicos e suas misturas em dietas de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2., 2003, Cascavel. **Anais...** Cascavel: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003. p. 153-182.

WALSH, M. et al. **The effects of supplementing weanling pigs diets with organic and inorganic acids on growth performance and microbial shedding**. West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 89-98.

WANG, Y.; HAN, F.; XU, Z. Developmental gene expression of lactoferrin in the duodenum and effect of weaning age on gene expression of lactoferrin in piglets. **Archives of Animal Nutrition**, Lausanne, v. 60, p. 1-9, 2006.

WANG, W. W.; QIAO, S. Y.; LI, D. F. Amino acids and gut function. **Amino acids**, Wien, v. 37, p. 105-110, 2009.

XU, R. J. et al. Growth and morphological changes in the small intestine in piglets during the first three days after birth. **Journal of Developmental Physiology**, Oxford, v. 18, p. 161-172, 1992.

ZHANG, H. Z. et al. Diet influences development of the pig (*Sus scrofa*) intestine during 6 hour after birth. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p.1302-1310, 1998.

CAPÍTULO 2: Pigs show differences in gene expression in the jejunum for the GLUT2, SGLT1, IGF-1 and p65/RelA in response to exposure to benzoic acid, L-glutamine, yeast culture and organo oil using an *ex-vivo* model

INTESTINAL GENE EXPRESSION OF PIGLETS

Pigs show differences in gene expression in the jejunum for the GLUT2, SGLT1, IGF-1 and p65/RelA in response to exposure to benzoic acid, L-glutamine, yeast culture and organo oil using an *ex-vivo* model

H. Silveira^{a1}, V.S. Cantarelli^a, A.D.B. Melo^b, C. Bortoluzzi^c, M.H. Rostagno^d

^a Department of Animal Science, Federal University of Lavras, Zip Code: 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

^b Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, PR, Brazil.

^c Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil.

^d Purdue University and Elanco Animal Health, West Lafayette, Zip Code: 47906, IN, United States.

Abbreviations: PBS, phosphate buffer solution; LPS, lipopolysaccharide; USDA, united states department of agriculture; DMEM, dulbecco's modified eagle medium; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NF-KB, nuclear factor kappa B; MHC, major histocompatibility complex; TNF, tumor necrosis factor; IL-1, interleukin-1.

¹ Corresponding author: mobile: +55 35 88779554.

E-mail addresses: hebertsilveira@yahoo.com.br (H. Silveira), vinicius@dzo.ufla.br (V.S. Cantarelli), bortoluzzi.c@gmail.com (C. Bortoluzzi), diegobmelo@hotmail.com (A.D.B. Melo), rostagno@purdue.edu (M.H. Rostagno)

Abstract

The objective of this study was to evaluate intestinal gene expression in response to exposure to feed additives using an *ex-vivo* model. We hypothesized that the piglets intestine could show a variable gene expression of glucose transporter 2 (GLUT2), Na⁺/dependent glucose transporter 1 (SGLT1), Insulin Growth Factor 1 (IGF-1) and Nuclear Factor Kappa B (p65/RelA) genes in response to L-glutamine, yeast culture, benzoic acid and oregano essential oil. To evaluate intestinal gene expression, six piglets at 20 kg bodyweight were slaughtered and the intestinal tissue was collected 30 cm from the stomach (jejunum) of each pig. Five 2 cm intestinal samples were collected from each pig. Then, tissues were immersed in a buffer solution with antibiotic for 15 minutes, then rinsed, followed by sample immersion for 60 minutes in cellular culture media (Dulbecco's Modified Eagle Medium - high glucose HEPES modification). The media included additives according to the following treatments: control (without additive); 1% of L-Glutamine; 1% yeast culture; 0.5% benzoic acid and 0.015% oregano essential oil. The samples were rinsed with PBS and stored at -80°C for subsequent RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression of GLUT2, SGLT1, p65/RelA and IGF-1 using real qPCR. Supplementation of oregano

essential oil, yeast culture and L-glutamine increased GLUT2 gene expression in comparison to the control ($P < 0.001$). Also, 0.5% benzoic acid had no impact on GLUT2 gene expression compared to yeast culture, L-glutamine and control. Exposure to oregano essential oil and yeast culture increased intestinal SGLT1 gene expression of piglets' jejunum compared to the control ($P = 0.0008$). Benzoic acid reduced the expression of SGLT1 compared to other additives. The addition of yeast culture and L-glutamine increased p65/RelA gene expression in comparison to the control ($P < 0.001$). Exposure to yeast culture increased IGF-1 gene expression compared to the control ($P < 0.001$). In conclusion, the piglets' jejunum can express the different profile of GLUT2, SGLT1, p65/RelA and IGF-1, in response to additive exposure.

Keywords: Swine, intestine, gut markers, glucose transporter, nuclear factor, real time PCR.

INTRODUCTION

The gastrointestinal tract has a large number of functions, including the absorption of nutrients and selective protection against harmful antigens and pathogens. Feed additives are a critical determinant in the functional development and growth of the intestine (Domeneghini et al., 2006). After the European Union prohibited the antibiotics use as growth promoters many alternative feed additives have been evaluated to control the piglet post-weaning diarrhea. However, little attention has been directed towards understanding the mechanisms action of these additives on intestinal function and development.

Acidifiers were identified early as one of the most promising alternative additives due their positive effects against pathogenic bacteria (Partanen and Mroz, 1999; Kluge et al., 2006; Kommera et al., 2006). Also, some organic acids as butyric acid have demonstrated other effects as a nutrient and trophic factor of the intestinal epithelium (Knudsen et al., 2003). Yeast culture is another class of additives that can be used against pathogenic bacteria (Van Der Peet-Schwering et al., 2007; Shen et al., 2009). Beta-glucans work by activation of macrophages increasing the phagocytosis and cytokine synthesis (Williams et al., 1996; Majtán et al., 2005). Essential oils have demonstrated a wide range of effects including

antimicrobial efficacy (Kroismayr et al., 2007; Michiels et al., 2009), antiviral (García et al., 2003), antioxidant (Botsoglou et al., 2004), and are able to stimulate enzyme activity (Lee et al., 2003; Jang et al., 2007), glucose absorption (Kreydiyyeh et al., 2003), immune function (Jamroz et al., 2006), analgesic and anti-inflammatory activity (Hajhashemi et al., 2004). Also, the use of some amino acids has demonstrated beneficial effects on the gastrointestinal health (Carver, 1999; Rhoads et al., 2004; Jiang et al., 2009). L-glutamine can decrease the incidence of bacteria translocation by reducing the adherence of bacteria to enterocyte (Souba et al., 1990).

Not only is bacterial control important to the swine, the host response has a great importance to manipulate the gastrointestinal development. Understanding the major effects of benzoic acid, yeast culture, oregano essential oil and L-glutamine on intestinal gene expression are important to optimize their use in the animal feed. It is possible but unknown if benzoic acid has a direct trophic effect in the intestinal epithelium. Yeast culture may also act as nonspecific stimulators of the intestinal membrane via their Beta-glucan, amino acid and nucleotide content. Due the many effects of L-glutamine and oregano

essential oil, understanding of their specific mechanisms in the gene expression are important to improve their results and possible association with other feed additives. Therefore, knowledge of mechanisms involved in the structural and functional intestinal response to nutrients and additives in the diet need to be better understood. The intestinal gene expression associated to additives used could be an approach to achieve better additive effects and piglet performance.

The *ex-vivo* technique has been recently used to evaluate the effect of some additives on immune response in the swine tissue challenged by LPS (Smith et al., 2011; Bahar et al., 2012; Leonard et al., 2012). The use of *ex-vivo* model in response to exposure to feed additives on the intestine tissue function has not been evaluated. The main goal of this study was to evaluate intestinal gene expression in response to exposure to feed additives using an *ex-vivo* model of porcine intestine tissue. Through the gene expression in the jejunum in response to benzoic acid, yeast culture, oregano essential oil and L-glutamine, using the Real Time PCR technique.

MATERIAL AND METHODS

Ex-vivo model

All animal care and use procedures were approved by Purdue Animal Care and Use Committee. Intestinal samples of six piglets of approximately 20 kg BW harvested at the Purdue University meats laboratory were collected. Intestinal tissues were collected 30 cm from the stomach (jejunum). Five intestinal samples were collected of each pig for assignment to the treatments. The samples were washed with Phosphate Buffer Solution (PBS) using *pisset* until there were no more contents immediately post-harvest. Then, the samples were immersed individually in 50ml polypropylene tubes containing a buffer solution (50 mM / L mannitol, 2 mM / L tris-HCL, ph 7.4) with antibiotics per 15 minutes, kept in an insulated box with ice and transported to USDA laboratory located in Purdue University. The buffer solution was made using a ultra-pure water containing an antibiotic mixture of penicillin, neomycin and streptomycin, 1% (0.1 ml / ml of solution, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) to eliminate a microbial presence in the samples.

Then the tissues were rinsed with PBS and immersed for 60 minutes in cellular culture media (Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose HEPES modification, with 4500 mg / L glucose, 25 mM

HEPES, and sodium bicarbonate, without L-glutamine and sodium pyruvate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture - DMEM). Feed additives were added according to the following treatments: control (without additives); 1% of L-Glutamine ($\geq 99\%$; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA); 1% of yeast culture (Varied Industries Corporation, Mason, IO, EUA); 0.5% of benzoic acid ($\geq 99.5\%$; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) and 0.015% of oregano essential oil (100%; NOW Foods, Bloomingdale, IL, EUA). The tissues were incubated at 37°C in a closed Falcon tube, without air or gas supplementation. Some additives are not soluble in the medium, thus the plates were placed on a rocking platform to keep the tissue in contact with additive.

After the incubation, the tissues were rinsed with PBS and stored at -80°C in a cryovial tube with 0.5 ml of TRIzol[®] reagent (Invitrogen, China) for subsequent RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression analyses.

Real-Time PCR (qPCR)

Total RNA was isolated from approximately 50 mg jejunum tissue samples using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, China) according to the manufacturer's instruction. Precipitated RNA was suspended in 20 μ L of RNasefree water and treated with DNase (Invitrogen, China), then stored at -80°C. RNA quantity was assessed by UV spectrophotometer. To synthesize the cDNA, the same RNA quantity per sample was used which was produced by diluting the higher RNA concentration with RNase free water. First-strand cDNA was synthesized from 5 μ L of total RNA using oligodT primers and Superscript II reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, China). Synthesized cDNA was diluted five times with sterile water and stored at -20°C before use.

The gene expression analyses were performed to the following gut markers: glucose transporter 2 (GLUT2), Na⁺-dependent glucose transporter 1 (SGLT1), Nuclear Factor Kappa B (p65 / RelA) and Insulin Growth Factor 1 (IGF-1) using real time PCR (qPCR) with primers shown in Table 1.

Real-time PCR amplification was performed in 25 μ L of reaction mixture containing 5 μ L of diluted cDNA, 12.5 μ L of 2x SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Switzerland), 2.5 μ L of each primer, and 3 μ L

of PCR-grade water. The PCR procedure for GLUT2 consisted by heating the reaction mixture to 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 30s and 51°C for 30s and 72°C for 40s. The SGLT1 procedure consisted of heating the reaction mixture to 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 30s and 53°C for 30s and 72°C for 40s. The p65/RelA procedure consisted of heating the reaction mixture to 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 30s, 54°C for 30s and 72°C for 40s and IGF-1 consisted of heating the reaction mixture to 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 30s, 56°C for 30s and 72°C for 40s.

A dissociation curve was run for each plate to confirm the production of single product. PCR data obtained from the ABI 7500 Real-time PCR System were automatically analyzed by Applied Bio systems Software. The relative standard-curve method was used to quantify the mRNA concentrations of each gene in relation to the reference gene (GAPDH). The mRNA relative abundance was calculated according to the method of Pfaffl (Pfaffl, 2001). All samples were analyzed in quadruplicate.

Statistical analyses

One pig from each repetition was used as the experimental unit (n = 6) for statistical analysis of gene expression. The Shapiro-Wilk test was used to analyze the normality of the data. If the variable was not normally distributed, a transformation of the variable was done using PROC RANK (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2009). Effects were analyzed as a randomized complete block design analysis of all data using the PROC MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2009). The animal was the blocking factor, and the jejunum segment was the experimental unit. The effect of treatments on gene expression levels in piglets was assessed using Tukey test. Differences among means were considered significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

The gene expression results are presented in the Table 2. Supplementation of 0.015% oregano essential oil, 1% yeast culture and 1% L-glutamine increased intestinal GLUT2 gene expression compared to the control treatment ($P < 0.001$, Fig. 1). Also, 0.5% benzoic acid had no effect on the GLUT2 gene expression compared to yeast culture, L-glutamine and control.

The addition of 0.015% oregano essential oil and 1% yeast culture increased intestinal SGLT1 gene expression compared to the control ($P=0.0008$, Fig. 2). Benzoic acid (0.5%) reduced the expression of SGLT1 compared to the oregano essential oil, yeast culture, L-glutamine and control treatments. The exposure of the jejunum to 1% of yeast culture increased intestinal IGF-1 gene expression compared to the control ($P<0.001$, Fig. 3).

The addition of 1% yeast culture and 1% L-glutamine increased intestinal p65/RelA gene expression compared to the control ($P<0.001$, Fig. 4). The increased gene expression in response to the yeast culture may be due to the greater concentration of betaglacans which result in an activation of NF-KB and subsequent stimuli of cytokine secretion.

DISCUSSION

Some feed additives may have direct effects on the intestinal function. Understanding at the molecular level how some additives can modulate the intestinal development and health could be a new approach to achieve better additive responses in commercial production. The *ex-vivo* technique has been recently used to evaluate the effect of some additives on immune response in the swine tissue challenged by LPS

(Smith et al., 2011; Bahar et al., 2012; Leonard et al., 2012). For this, biotechnological tools are available to study the relation between nutrition and tissue gene expression. In this study we used an *ex-vivo* model and qPCR techniques to evaluate the gene expression of gut markers related to digestive, immune and intestinal development function in piglets. It is important to validate the methodology for other genes not related with the immune system.

Glucose absorption in the small intestine depends on two types of transport mechanisms, the glucose transporter 2 (GLUT2) and the Na⁺-dependent glucose transporter 1 (SGLT1). The expression of glucose transport genes such as GLUT2 and SGLT1 is crucial to the absorption and transport competence of glucose in the small intestine (Rodriguez et al., 2004).

The glucose transporter 2 serves as a facilitated glucose diffusion system through lipid bilayers, in the basolateral membrane, transports both glucose and fructose, providing a common exit pathway into the blood (Cheeseman, 1993; Breves et al., 2007). The second system, SGLT1 mediates Na⁺ / glucose co-transport function both in kidney and intestine as a secondary active transporter (Breves et al., 2007). The high

affinity, low capacity SGLT1 has a saturation response. The saturation does not affect the transporter expression in the intestinal mucosa. The otherwise, low-affinity, high-capacity GLUT2, however, does not become saturated and gradually accounted for the major part of absorption as high glucose concentrations (Kellett and Brot-Laroche, 2005).

Plasma glucose is maintained at approximately 5mM / L. Any glucose is rapidly captured by SGLT1, and this transporters are the only ones able to transports glucose against concentration gradient (Kellett and Brot-Laroche, 2005). Otherwise, apical GLUT2 can provide a major route of sugar absorption by which absorptive capacity is rapidly and precisely up regulated to match the dietary intake of sugars during assimilation of a meal. Apical GLUT2 is not only regulated by long and short-term supply of dietary sugars, but also by local and endocrine hormones, cellular energy status, stress, and diabetes; regulation occurs through a network of intracellular signaling pathways (Kellett and Brot-Laroche, 2005). Stress releases glucocorticoids which rapidly inhibit apical GLUT2 insertion as part of the body's emergency response that enable's peripheral mobilization of energy stores (Shepherd et al., 2004).

Maternal piglets' separation results in elevated cortisol levels in piglets at weaning (Klemcke and Pond, 1991). Weaning anorexia contributes to small intestine inflammation due an increase in inflammatory T-cell numbers and local expression of the matrix metalloproteinase stromelysin while jejunal villus height, crypt depth and major histocompatibility complex (MHC) class I RNA expression decreased (McCracken et al., 1998).

In this study, the feed additives have an effect to increase intestinal GLUT2 (oregano essential oil, yeast culture and L-glutamine) and intestinal SGLT1 (oregano essential oil and yeast culture) gene expression. The increase in the glucose receptor in the piglets' jejunum could optimize glucose uptake. These results have a great importance to the weaning piglets that have a higher stress in the weaning process associated a glucocorticoid release and a decrease in the feed consumption who contributes to a reduction in GLUT2 gene expression, reduction in the intestinal villus height and crypt depth and increase the intestinal inflammatory response.

Song et al. (2010) demonstrated up-regulation of SGLT1 and GLUT2 mRNA expression in the small intestine of pigs submitted to a

heat stress in response to receiving feed containing four herbs, including *Cortex Phellodendron*, *Rhizome Atractylodes*, *Agastacherugosa* and *Gypsum Fibrosum*. Therefore, we expected that feed additives may be able to regulate GLUT2 and SGLT1 gene expression. The correct use of these compounds can optimize the glucose absorption, especially in stress conditions as the weaning.

Wang et al. (2008) reported coordinated alterations of gene expression in response to dietary glutamine supplementation to improve nutrition status in piglets. This amino acid is required for the synthesis of purine and pyrimidine nucleotides that are essential for the proliferation of cells, including intestinal mucosal cells and intraepithelial lymphocytes (Wu, 1998). Consequently use of 1% of glutamine to weaning piglets enhanced intestinal oxidative-defense capacity, prevented jejunal atrophy, promoted small intestine growth and body weight gain in weaned piglets. In this study, the GLUT2 gene expression in the piglets' jejunum was increased by exposure to 1% L-glutamine.

The reduction in the gene expression for GLUT2 and SGLT1 following exposure to benzoic acid exposure could be due a reduction in the pH. These reductions in pH were observed by changes in the medium

color with the addition of benzoic acid. However, additional studies are necessary to understand these results.

In vivo, IGF-I has a wide range of biological actions, including stimulation of proliferation and differentiation in many tissues (Jones and Clemmons, 1995) and plays a vital role in the modulation of piglet intestinal post-natal growth. Enteral supplementation of IGF-1 increased the intestinal growth of newborn piglets (Burrin et al., 1996).

In vitro, IGF-I can stimulate a number of cellular transport processes, including facilitated glucose uptake (Prosser et al., 1987). Alexander and Carey (1999) verified an increase in SGLT1 gene expression and increased proliferation of enterocytes in IGF-I-treated piglets. In this study we observed the increase in IGF-1, SGLT1 and GLUT2 gene expression to the yeast culture, these results could have a correlation between these variables. Which a higher IGF-1 gene expression could have an effect to increase the SGLT1 and GLUT2 gene expression as suggested by Prosser et al. (1987).

Kroismayr et al. (2008), did not find a response on the piglets IGF-1 gene expression to an essential oil blend that contained oregano essential oil. The antioxidant and antimicrobial effects of oregano

(*Origanum acutidens*) are commonly attributed to carvacrol (Goze et al., 2010). In these study, only oregano essential oil was used. The tendency for increased IGF-1 gene expression may have been due to a greater concentration of carvacrol.

The molecule of NF- κ B is comprised of one or two proteins. Five subunits of proteins are used to form the NF- κ B. The predominant form is composed of p50 and p65/RelA subunits (Ghosh et al., 1998). Response to a wide range of stress signals (e.g., lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL-1), and virus infection), leads to the activation of NF- κ B, which then allows NF- κ B to enter the nucleus and activate transcription of wide range of target genes related to cytokine production (May and Ghosh, 1998). The modulation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines must be considered as important property of feed additives (Gao et al., 2012). The increase in the p65/RelA could be related to cytokine secretion and these responses are important to prevent pathogenic bacteria action in the piglet's intestine. The presence of NF- κ B can enhances the transcription of a variety of genes despite cytokines, including growth factors, adhesion

molecules, immunoreceptors, and acute-phase proteins (Timothy et al., 1997).

The increase in the p65/RelA may be related to changes in cytokines or growth factors production produced by the feed additives. Broussard et al. (2001) reported that pro-inflammatory cytokines induce resistance of hepatic GH receptors, leading to a significant reduction in plasma IGF-I. It has been observed increase effects in IGF1 gene expression in these findings. Therefore, the greater p65/RelA gene expression could be related to intestinal growth factors stimuli. However more studies are necessary to understand these results.

Even with a significant difference for all gut markers, we suggest when using the *ex-vivo* model, an increased number of repetitions in order to have a better separation of results due to the amount of variation in the variables measured.

In conclusion, the piglets show different rates gene expression in the jejunum of GLUT2, SGLT1, p65/RelA and IGF-1 according to the additives used following *ex-vivo* model. The *ex-vivo* model can be used to evaluate the effects of additives in the response a wide range of intestinal markers involved in the digestible, hormonal or immune function in

piglets. In addition, the gene expression profile determination in the gut markers involved in an intestinal development and piglet health may have great impact to understand how some additives affect the host response. These findings can contribute to a better use the additives and nutrients in the diets to optimize the performance response of the animals and to provide a better intestinal function and health in challenge in the production system as weaning or high pressure of pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Allan Paul Schinckel, Professor of Animal Sciences at Purdue University, for a critical reading and careful editing of this manuscript.

REFERENCES

Alexander, A.N., Carey, H.V., 1999. Oral IGF-I enhances nutrient and electrolyte absorption in neonatal piglet intestine. *Am. J. Physiol.* 277, 619-625.

Bahar, B., O'Doherty, J.V., Hayes, M., Sweeney, T., 2012. Extracts of brown seaweeds can attenuate the bacterial lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in the porcine colon ex vivo. *J. Anim. Sci.* 90, 46-48.

Botsoglou, N.A., Christaki, E., Florou-Paneri, P., Giannenas, I., Papageorgiou, G., Spais, A.B., 2004. The effect of a mixture of herbal essential oils or tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 52–61.

Breves, G., Kock, J., Schröder, B., 2007. Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs. *Livest. Sci.* 109, 4–13.

Broussard, S.R., Zhou, J.H., Venters, H.D., Bluthé, R.M., Freund, G.G., Johnson, R.W., Dantzer, R., Kelley, K.W., 2001. At the interface of environment-immune interactions: Cytokine and growth-factor receptors. *J. Anim. Sci.* 79, 268–284.

Burrin, D.G., Wester, T.J., Davis, T.A., Amick, S., Heath, J.P., 1996. Orally administered IGF-I increases intestinal mucosal growth in formula-fed neonatal pigs. *Am. J. Physiol.* 270, 1085–1091.

Carver, J.D., 1999. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediatr.* 430, 83-88.

Cheeseman, C.I., 1993. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 105, 1050–1056.

Domeneghini, C., Di Giancamillo, A., Arrighi, S., Bosi, G., 2006. Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. State of the art in the pig, and perspectives towards humans. *Histol. Histopathol.* 21, 273-283.

Gao, Y.Y., Xie, Q.M., Jin, L., Sun, B.L., Ji, J., Chen, F., Ma, J.Y., Bi, Y.Z., 2012. Supplementation of xanthophylls decreased proinflammatory and increased anti-inflammatory cytokines in hens and chicks. *Brit. J. Nutr.* 108, 1746-1755.

García, C.C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., Damonte, E.B., 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytother. Res.* 17, 1073–1075.

Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260.

Goze, I., Alim, A., Cetinus, S.A., Cetin, A., Durmus, N., Atas, A.T., Vural, N., 2010. *In vitro* antimicrobial, antioxidant, and antispasmodic activities and the composition of the essential oil of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letsvaart. *J. Med. Food* 13, 705-709.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Jafarabadi, H., 2004. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytother. Res.* 18, 195–199.

Jamroz, D., Wertelecki, T., Houszka, M., Kamel, C., 2006. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90, 255–268.

Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y., Lee, C.Y., 2007. Effect of commercial essential oils on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134, 304–315.

Jiang, Z.Y.L.H., Sun, Y.C., Lin, X.Y., Ma, C.T., Zheng, G.L., Zhou, F.C., Zou, S.T., 2009. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 87, 4050-4056.

Jones, J.I., Clemmons, D.R., 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3–34.

Kellett, G.L., Brot-Laroche, E., 2005. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 54, 3056-3062.

Klemcke, H.G., Pond, W.G., 1991. Porcine adrenal adrenocorticotrophic hormone receptors: characterization, changes during neonatal development, and response to a stressor. *Endocrinology* 128, 2476–2488.

Kluge, H., Broz, J., Eder, K., 2006. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90, 316–324.

Knudsen, B., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K.S., 2003. New insight into butyrate metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 81–86.

Kommerer, S.K., Mateo, R.D., Neher, F.J., Kim, S.W., 2006. Phytobiotics and organic acids as potential alternatives to the use of antibiotics in nursery pig diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19, 1784–1789.

Kreydiyyeh, S.I., Usta, J., Knio, K., Markossian, S., Dagher, S., 2003. Aniseed oil increases glucose absorption and reduces urine output in the rat. *Life Sci.* 74, 663–673.

Kroismayr, A., Sehm, J., Pfaffl, M.W., Schedle, K., Plitzner, C., Windisch, W., 2008. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. *Czech J. Anim. Sci.* 53, 377–387.

Kroismayr, A., Sehm, J., Pfaffl, M., Plitzner, C., Foissy, H., Etle, T., Mayer, H., Schreiner, M., Windisch, W., 2007. Effects of essential oils or avilamycin on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets. *Czech J. Anim. Sci.* 53, 377-387.

Lee, K.W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R., Beynen, A.C., 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 44, 450–457.

Leonard, S.S., Sweeney, T., Bahar, B., O'Doherty, J.V., 2012. Effect of maternal seaweed extract supplementation on suckling piglet growth, humoral immunity, selected microflora, and immune response after an ex vivo lipopolysaccharide challenge. *J. Anim. Sci.* 90, 505-514.

Majtán, J., Kogan, G., Kováčová, E., Bíliková, K., Šimúth, J., 2005. Stimulation of TNF- α release by fungal cell wall polysaccharides. *Z. Naturforsch. C*, 60, 921–926.

May, M.J., Ghosh, S., 1998. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol. Today* 19, 80–88.

McCracken, B.A., Michael, E., Spurlock, Mark, A., Roos, F., Zuckermann, A., Gaskins, H.R., 1999. Weaning Anorexia May Contribute to Local Inflammation in the Piglet Small Intestine. *J. Nutr.* 129, 613-619.

Michiels, J., Missotten, J.A.M., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N.A., 2009. In vitro characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. *Anim. Feed Sci. Tech.* 151, 111–127.

Partanen, K.H., Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12, 117–145.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Ac. Res.* 29, 2003–2007.

Prosser, C.G., Sankaran L., Henninghausen L., Topper Y.J., 1987. Comparison of the roles of insulin and insulin-like growth factor-I in casein gene expression and in the development of alpha-lactalbumin and glucose transport in the mouse mammary epithelial cell. *Endocrinology* 120, 1411–1416.

Rhoads, J.M., Chen, W., Gookin, J., Wu, G.Y., Fu, Q., Blikslager, A.T., Rippe, R.A., Argenzio, R.A., Cance, W.G., Weaver, E.M., Romer, L.H., 2004. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. *Gut* 53, 514–522.

Rodriguez, S.M., Guimarães, K.C., Matthews, J.C., McLeod, K.R., Baldwin, R.L., Harmon, D.L., 2004. Influence of abomasal carbohydrates on small intestinal sodium-dependent glucose cotransporter activity and abundance in steers. *J. Anim. Sci.* 82, 3015–3023.

Santos, T. de los, Segundo, F.D.S., Grubman, M.J., 2007. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J. Virol.* 81, 12803–12815.

SAS Institute. 2009. SAS User's Guide. Statistics. Version 9.3 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Shen, Y.B.X.S., Piao, S.W., Kim, L., Wang, P., Liu, I., Yoon, Y., Zhen, Y.G., 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 87, 2614-2624.

Shepherd, E.J., Helliwell, P.A., Lister, N., Mace, O.J., Morgan, E.L., Patel, N., Kellett, G.L., 2004. Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. *J. Physiol.* 560, 281–290.

Smith, A.G., O'Doherty, J.V., Reilly, P., Ryan, M.T., Bahar, B., Sweeney, T., 2011. The effects of laminarin derived from *Laminaria digitata* on measurements of gut health: Selected bacterial populations, intestinal fermentation, mucin gene expression and cytokine gene expression in the pig. *Br. J. Nutr.* 105, 669–677.

Song, X., Xu, J., Wanga, T., Liu, F., 2010. Traditional Chinese medicine decoction enhances growth performance and intestinal glucose absorption

in heat stressed pigs by up-regulating the expressions of SGLT1 and GLUT2 mRNA. *Livest. Sci.* 128, 75–81.

Souba, W.W., Herskowitz, K., Salloum, R.M., Chen, M.K., Austgen, T.R., 1990. Gut glutamine metabolism. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 14, 45–50.

Timothy, S., Blackwell, W., Christman, J.W., 1997. The role of nuclear factor-KB in cytokine gene regulation. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 17, 3-9.

Van Der Peet-Schwering, C.M.C., Jansman, A.J.M., Smidt, H., Yoon, I., 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *Anim. Sci.* 85, 3099-3109.

Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y., Wu, G., 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J. Nutr.* 138, 1025–1032.

Williams, D.L., Mueller, A., Browder, W., 1996. Glucan-based macrophage stimulators. A review of their anti-infective potential. *Clin. Immunother.* 5, 392–399.

Wu, G., 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.* 128, 1249–1252.

Yin, J., Li, X., Li, D., Yue, T., Fang, Q., Ni, J., Zhou, X., Wu, G., 2009. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. *J. Nutr. Biochem.* 20, 783–790.

Figures

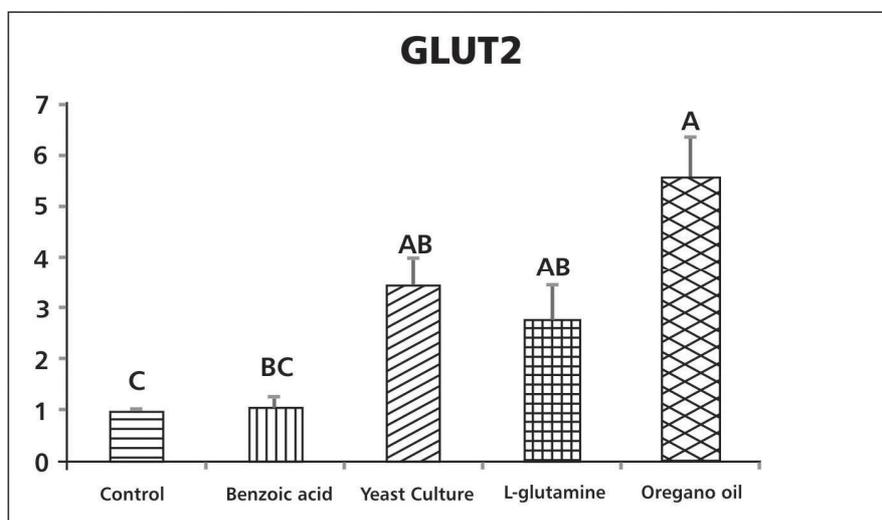


Figure 1 mRNA relative abundance of GLUT2 in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. $P < 0.0001$.

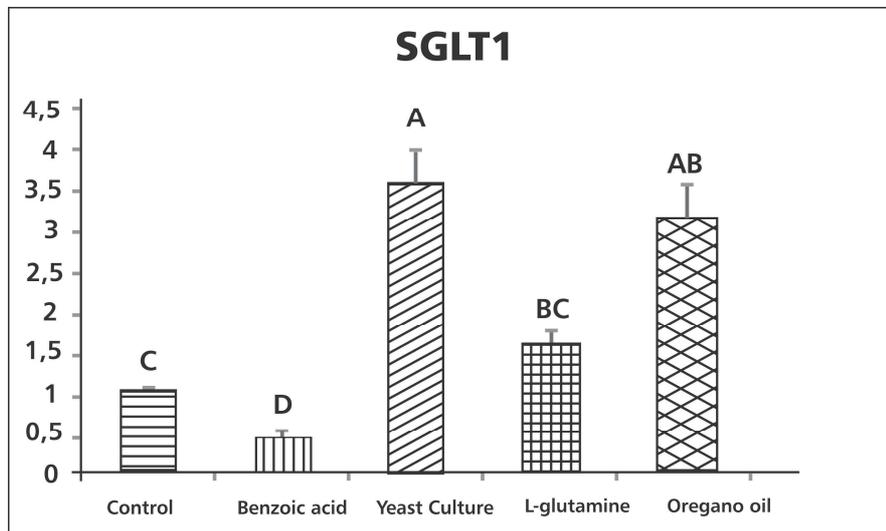


Figure 2 mRNA relative abundance of SGLT1 in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. P=0.0008.

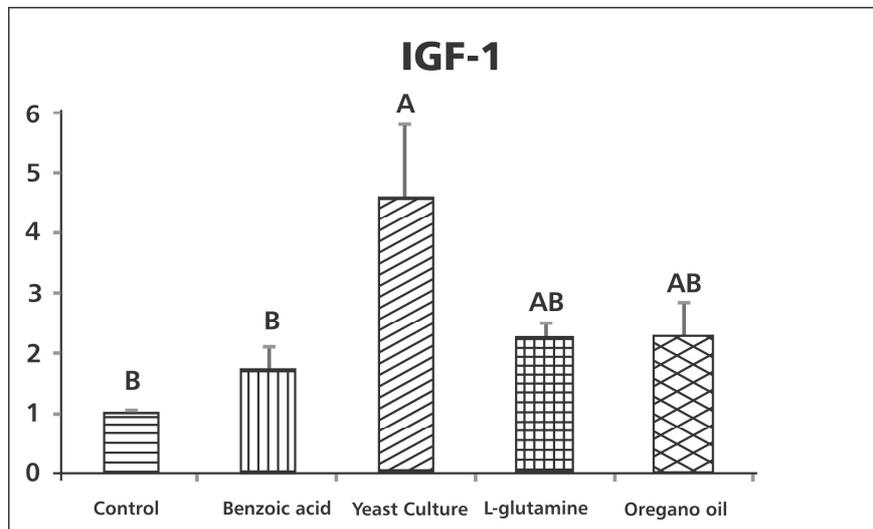


Figure 3 mRNA relative abundance of IGF-1 in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, $n = 6$. $P < 0.0001$.

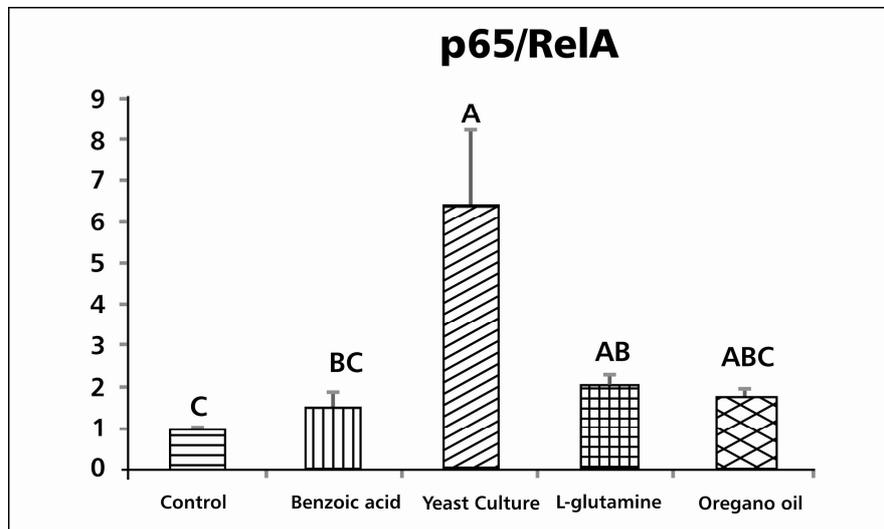


Figure 4 mRNA relative abundance of p65/RelA in piglets' jejunum received benzoic acid, yeast culture, L-glutamine or oregano essential oil in an ex-vivo model. Values are means with their standard errors represented by vertical bars, n = 6. P<0.0001.

Tables

Table 1 Gut markers and sequence of primers to real time PCR.

| Gut marker | Primer | Sequence (5'-3') | Reference |
|-------------------|----------------|---------------------------|----------------------|
| GAPDH | <i>Forward</i> | CAGCAATGCCTCCTGTACCA | Smith et al. (2011) |
| | <i>Reverse</i> | ACGATGCCGAAGTTGTCATG | |
| GLUT2 | <i>Forward</i> | CAGGGGTGCTATTGGTGC | Song et al. (2010) |
| | <i>Reverse</i> | TTCCTTGCTTTGGCTTCC | |
| SGLT1 | <i>Forward</i> | CATCATCGTCCTGGTCGTC | Song et al. (2010) |
| | <i>Reverse</i> | TGCCTCCTCTTCCTTGGT | |
| p65 / RelA | <i>Forward</i> | GGAACACGATGGCCACTTG | Santos et al. (2007) |
| | <i>Reverse</i> | AAGAGGACATCGAGGTGTATTTCAC | |
| IGF-1 | <i>Forward</i> | CTGTAACCATGAGGCTGAGA | Yin et al. (2009) |
| | <i>Reverse</i> | CTCCATACTTCCTGTACTCC | |

Table 2 mRNA relative abundance of GLUT2, SGLT1, p65/RelA and IGF-1 to piglets received different additives and nutrient¹.

| | C | BA | YC | G | OO | SEM | P |
|-------------------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|----------|
| GLUT2 | 1.00 C | 1.09 BC | 3.47 AB | 2.82 AB | 5.62 A | 0.57 | < 0.0001 |
| SGLT1 | 1.00 C | 0.44 D | 3.58 A | 1.58 BC | 3.16 AB | 0.29 | = 0.0008 |
| p65 / RelA | 1.00 C | 1.51 BC | 6.36 A | 2.05AB | 1.78 ABC | 0.95 | < 0.0001 |
| IGF-1 | 1.00 B | 1.71 B | 4.58 A | 2.25 AB | 2.28 AB | 0.57 | < 0.0001 |

¹C: Control; BA: Benzoic acid; YC: Yeast culture; G: L-glutamine; OO: Oregano oil;

* Line letters differ by Tukey test P<0.05.

CAPÍTULO 3: Efeitos do ácido benzoico sobre o desempenho, incidência de diarreia, morfologia intestinal e produção de ácidos graxos voláteis no ceco de leitões inoculados com *E. coli* K88+

RESUMO

Os leitões durante o desmame são expostos a estressores nutricionais, imunológicos e psicológicos, e esses eventos aumentam a susceptibilidade do trato gastrointestinal aos patógenos. Nesse sentido, objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos de níveis crescentes de ácido benzoico para leitões desmamados inoculados via oral com *Escherichia coli* (K88⁺), sobre o desempenho, incidência de diarreia, pH intestinal, morfologia intestinal, população de *Lactobacillus* e Bifidobactéria no ceco e a produção de ácidos graxos voláteis no ceco (AGV) na fase de creche, e o desempenho posterior durante o crescimento e terminação. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, em Minas Gerais. Um total de 224 leitões machos castrados desmamados aos 21 dias foi obtido a partir de um rebanho suíno comercial (Fêmeas DanBred - DB90 x Machos PIC-AGPIC337). Os animais foram alojados nas instalações de creche em baias suspensas. A temperatura foi controlada e adequada para a fase de creche. Foi utilizado um delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 × 2, quatro níveis de ácido benzoico 0,00; 0,25; 0,50 e 0,75% para os leitões inoculados ou não inoculados com *E. coli*, com sete repetições e quatro animais por baia. As dietas foram formuladas sem antibióticos e/ou promotores de crescimento para atender às exigências do National Research Council - NRC (2012), sendo fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental. As variáveis avaliadas foram desempenho de leitões em fase de creche até a terminação, incidência de diarreia, pH dos segmentos intestinais, características morfológicas do intestino, produção de ácidos graxos voláteis no ceco e contagem de *lactobacilli* spp. e *bifidobacterium* no ceco. O ácido benzoico influenciou de forma cúbica o pH na porção terminal do íleo (P<0,05). Houve aumento linear (P<0,05) sobre a altura de vilosidade do íleo e redução linear na profundidade de cripta do íleo e cólon de leitões. No ceco foi observado aumento numérico para a produção de ácido butírico (P=0,0708). Houve redução linear (P<0,05) para a incidência de diarreia em resposta a suplementação do ácido benzoico. Entretanto, não foi observado efeito (P>0,05) sobre a contagem de *Lactobacilli* spp. e *Bifidobacterium* no ceco. Com isso, a utilização do ácido benzoico demonstrou efeito linear significativo sobre o peso vivo dos animais, ganho de peso médio diário, consumo de ração médio diário e conversão alimentar aos 63 dias de vida (P<0,05) e para o peso vivo e ganho de peso aos 147 dias (p<0,05). A dose de 0,75% apresenta melhor efeito sobre a redução do índice de diarreia, melhoria das características morfológicas do intestino e consequentemente o desempenho de leitões na fase de creche até a terminação.

Palavras-chave: Suínos. Ácidos graxos. Morfologia intestinal. Diarreia.

ABSTRACT

Piglets during weaning are exposed to nutritional, immunological and psychological stressors and these events increase susceptibility of the gastrointestinal tract to pathogens. In this sense, the aim of this study was to evaluate the effects of increasing levels of benzoic acid to weaning pigs inoculated orally with *Escherichia coli* (K88⁺), on performance, diarrhea incidence, intestinal pH, intestinal morphology, population of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* in the cecum and the volatile fatty acids production in the cecum (AGV) in the nursery phase, and subsequent performance during the growing and termination. The experiment was conducted at the Federal University of Lavras, Minas Gerais. A total of 224 barrows weaned at 21 days obtained from a commercial swine herd (Females DanBred - DB90 x Male PIC-AGPIC337). The animals were housed in nursery in suspended bays. The temperature was controlled and suitable for the nursery phase. An experimental design of randomized blocks, in 4 × 2 factorial design, four levels of benzoic acid 0.00; 0.25; 0.50 and 0.75% for the inoculated or not inoculated piglets with *E. coli*, with seven replicates and four animals per pen. Diets were formulated without antibiotics and/or growth promoters to meet the NRC (2012), and provided *ad libitum* throughout the experimental period. The variables evaluated were performance of piglets in the nursery phase until termination, diarrhea incidence, pH of the intestinal segments, morphological characteristics of the intestine, production of volatile fatty acids in the cecum and counting *lactobacilli* spp. and *bifidobacterium* in the cecum. The benzoic acid influenced cubically the pH in the terminal portion of the ileum (P<0.05). There was a linearly increased (P<0.05) on the ileal villus height and linear decrease in crypt depth of the ileum and colon of piglets. In the cecum numerical increase for the production of butyric acid (P=0.0708) was observed. There was a linear decrease (P<0.05) for the diarrhea incidence in response to supplementation of benzoic acid. However, no effect (P>0.05) was observed on the counting of *Lactobacilli* spp. and *Bifidobacterium* in the cecum. Thus, the benzoic acid use showed a significant linear effect on live weight, average daily weight gain, daily feed intake and feed conversion at 63 days of life (P<0.05) and for live weight and weight gain at 147 days (p<0.05). The dosage of 0.75% has a better effect on, reducing the diarrhea index, improvement in the morphological characteristics of the intestine and consequently the piglets performance at nursery phase until termination.

Keywords: Swine. Fatty acids. Intestinal morphology. Diarrhea.

1 INTRODUÇÃO

Leitões durante o desmame são expostos a vários estressores nutricionais, imunológicos e psicológicos. Esses eventos aumentam a susceptibilidade do trato gastrointestinal para patógenos, provocando doenças que são, na maioria das vezes, associadas à diarreia. A *Escherichia coli* é uma das causas mais importantes de diarreia pós-desmame em suínos (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

Dentre as alternativas para controle dessa diarreia, os ácidos orgânicos foram identificados como uma das mais promissoras, por causa dos seus efeitos positivos contra bactérias patogênicas (PARTANEN; MROZ, 1999; ROTH; KIRCHGESSNER, 1998). O ácido benzoico apresenta característica de não alterar o pH do estômago, duodeno e jejuno de leitões (KLUGE; BROZ; EDER, 2006; NATIONAL COMMITTEE FOR SWINE PRODUCTION, 2000). Entretanto, tem demonstrado efeitos positivos no desempenho de leitões em situações de baixo desafio (ALVARADO et al., 2013; DIAO et al., 2013, 2014; GHELER et al., 2009; GRÄBER et al., 2012; HALAS et al., 2010; PAPATSIROS et al., 2011). Por outro lado, em situações de desafio experimental, não foi observado efeito do ácido benzoico no controle bacteriano e na melhoria de desempenho (HALAS et al., 2009). Dessa forma, as diferenças associadas no mecanismo de ação do ácido benzoico, em situações de alto e baixo desafiado em leitões, não foram bem elucidadas.

Com isso, objetivou-se neste estudo avaliar os efeitos de níveis de ácido benzoico para leitões recém-desmamados inoculados ou não inoculados com *Escherichia coli* (K88⁺), sobre o desempenho, incidência de diarreia, pH intestinal, morfologia intestinal, população de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no ceco, a produção de ácidos graxos voláteis no ceco na fase de creche, e o desempenho nas fases de crescimento e terminação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado no Protocolo n ° 092 /12 de junho/2013, de acordo com os princípios de ética em experimentação animal adotados pela Comissão de Ética no Uso Animais - CEUA da Universidade Federal de Lavras.

2.1 Animais e instalações

O experimento foi conduzido no Centro Experimental de Suínos (CES) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais. Um total de 224 leitões machos castrados foi obtido a partir de um rebanho suíno comercial (cruzamento de fêmeas DanBred - DB90 x machos PIC- AGPIC337). Os leitões foram desmamados aos 21 dias de idade com peso inicial de $6,37 \pm 0,34$ kg. Os animais foram alojados na unidade de creche em baias suspensas, cobertas por piso totalmente ripado (1,5 x 1,5 metros), com comedouro tipo calha e bebedor tipo *nipple*. A temperatura foi controlada pela administração de janelas e altura de lâmpadas de aquecimento para manter o ambiente adequado de acordo com a idade dos animais.

2.2 Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2, com quatro níveis (0,00; 0,25 ; 0,50 e 0,75%) de ácido benzoico (Vevovital[®] 99,5%, *DSM Nutritional products*), para os leitões inoculados ou não inoculados com *E. coli* K88⁺, totalizando oito tratamentos, com sete repetições cada e quatro animais por baia. O peso inicial foi utilizado como fator para bloco e a baia como unidade experimental. Os animais

inoculados foram alojados em sala separada dos não inoculados, para evitar a contaminação cruzada.

As dietas não tinham em sua composição nenhum tipo de antibiótico. A dieta basal foi formulada para atender às especificações nutricionais sugeridas pelo NRC (2012) para suínos com peso de 5 a 10 kg da primeira à terceira semana (pré-inicial 1 e pré-inicial 2) e de 10 a 20 kg nas últimas três semanas (Inicial) (Tabela 1). No entanto, para o controle do complexo de doenças respiratórias dos suínos, os animais receberam no primeiro dia experimental uma dose de antibióticos com base de tulatromicina (Draxxin[®], Zoetis; 0,15 ml por animal). A tulatromicina concentra-se principalmente no pulmão, e objetivou-se com seu uso evitar fatores não associados ao desafio entérico que poderia prejudicar o desempenho dos animais e o confundimento nos resultados do estudo.

Tabela 1 Composição das dietas experimentais

| Ingrediente | Pré-inicial 1 | Pré-inicial 2 | Inicial |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------|
| Milho | 14,825 | 45,266 | 53,539 |
| Milho pré-gelatinizado | 15,000 | - | - |
| Farelo de Soja 46% | 29,180 | 32,250 | 27,400 |
| Farelo de bolacha ¹ | 20,000 | 6,000 | 10,800 |
| Açúcar | - | 2,000 | 3,000 |
| Dextrose | 5,000 | 2,000 | - |
| Óleo de soja | - | 0,400 | 1,000 |
| Start-pro 20 ² | 5,090 | - | - |
| Prius L-72 ³ | 6,000 | 8,000 | - |
| Sal | 0,350 | 0,354 | 0,500 |
| Calcário | - | 0,070 | 1,000 |
| Fosfato Bicálcico | 1,610 | 1,520 | 0,923 |
| Caolin ⁴ | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| L-Lisina-HCL 99% | 0,600 | 0,400 | 0,280 |
| MHA-Metionina 84% | 0,310 | 0,110 | 0,095 |
| L-Treonina 98.5% | 0,230 | 0,070 | 0,076 |
| L-Triptofano 98% | 0,030 | - | - |
| L-Valina 96.5% | 0,200 | 0,020 | - |
| Colina 60% | 0,010 | - | 0,037 |
| Bicarbonato de sódio | 0,200 | 0,200 | - |
| Premix vitamínico ⁵ | 0,100 | 0,100 | 0,100 |
| Premix mineral ⁶ | 0,200 | 0,200 | 0,250 |
| Palatabilizante | 0,065 | 0,045 | - |
| Total | 100 | 100 | 100 |
| EM Kcal/Kg | 3550 | 3350 | 3319 |
| PB (%) | 19,98 | 20,10 | 17,93 |
| Lis. dig. (%) | 1,45 | 1,34 | 1,05 |
| Met+Cist dig. (%) | 0,82 | 0,67 | 0,59 |
| Treo. dig. (%) | 0,90 | 0,77 | 0,67 |
| Lactose equivalente (%) | 12,13 | 9,94 | 3,46 |
| Fósforo total (%) | 0,66 | 0,66 | 0,49 |
| Cálcio (%) | 0,85 | 0,70 | 0,74 |

¹5% de lactose; ²Produto comercial com 40,5% lactose; ³Produto comercial com 72% lactose; ⁴Material inerte composto por silicatos hidratados de alumínio; ⁵Suplemento vitamínico contendo por kg de produto: Vitamina A: 8.000,000 UI; Vitamina D3: 1.200,000 UI; Vitamina E: 20.000 mg; Vitamina K3: 2.500 mg; Vitamina B1: 1.000 mg; Riboflavina (B2): 4.000 mg; Piridoxina (B6): 2.000 mg; Vitamina B12: 20.000 mcg; Niacina: 25.000 mg; Ácido Pantotênico: 10.000 mg; Ácido Fólico: 600 mg; Biotina: 50 mg; Vitamina C: 50.000 mg; Antioxidante: 125 mg; ⁶Suplemento mineral contendo por kg de produto: Selênio, 500 mg; Ferro, 70.000 mg; Cobre, 20.000 mg; Manganês, 40.000 mg; Zinco, 80.000 mg; Iodo, 800 mg; Cobalto, 500 mg.

2.3 Procedimento experimental

As dietas experimentais foram fornecidas durante 42 dias na fase de creche. O consumo de ração e peso corporal foram registrados aos 21, 42, 49 e 63 dias de vida. As sobras de ração foram avaliadas diariamente. Com base nesses dados, o ganho de peso diário, consumo de ração e conversão alimentar foram calculados.

Para a análise de escore fecal, as fezes eram avaliadas diariamente e classificadas na baia como fezes normais (ausência de diarreia) ou como fezes líquidas e pastosas (presença de diarreia), seguindo a metodologia de Casey et al. (2007). No final do ensaio calculou-se a ocorrência de diarreia em percentagem relacionada aos dias de estudo.

No décimo primeiro e décimo segundo dia do experimento, os animais dos tratamentos inoculados receberam oralmente 1ml de solução contendo 10^6 CFU/mL de *Escherichia coli*. Os animais não inoculados receberam, nos mesmos períodos, 1ml de solução salina, para padronizar o manejo realizado em todos os animais.

O inóculo bacteriano utilizado foi preparado a partir da cepa bacteriana de *Escherichia coli* K88⁺ (LT⁺, STa⁺ e STb⁺). A cepa foi cultivada em meio de cultura durante 18 horas e separada por centrifugação. Lavou-se sequencialmente em PBS três vezes, até uma concentração de 10^6 bactérias/ml de acordo com a metodologia de Halas et al. (2009).

Aos 42 dias de vida um animal por repetição foi abatido (peso vivo mais próximo à média da baia), totalizando 56 leitões, sete por tratamento. O abate foi realizado por electronarcole, seguido por exsanguinação. Os abates foram realizados em um frigorífico municipal localizado em Lavras/MG.

O abate foi realizado a fim de avaliar o pH do estômago, duodeno, íleo e ceco, coletar segmentos intestinais (jejuno, íleo e cólon) para mensuração da

morfologia do epitélio intestinal (altura de vilosidades, profundidade de cripta, relação vilus:cripta dos segmentos do intestino delgado; avaliação das criptas no cólon), coleta do conteúdo cecal para análise da produção de ácidos graxos (propiónico, butírico e láctico) e contagem de *Lactobacilli spp* e *Bifidobacterium* no ceco.

O pH dos diferentes segmentos intestinais foi mensurado logo após o abate e evisceração, utilizando pHmetro Testo 205 (Testo do Brasil, Campinas-SP).

Logo após a avaliação do pH, as amostras do conteúdo cecal foram coletadas em frasco estéril para as análises de ácido graxos voláteis e microbiologia. Para extrair e conservar os ácidos graxos presentes no conteúdo cecal, em uma amostra de dois gramas de conteúdo adicionou-se 4 ml de ácido fórmico 17% e realizou-se centrifugação a 2500 RPM. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C até a análise de ácidos acético, propiónico e butírico por cromatografia gasosa como descrito por Playne (1985).

As análises da população de *Lactobacilli spp.* e *Bifidobacterium* foram realizadas pelo método de cultura com meio seletivo específico. As amostras do conteúdo do ceco foram homogeneizadas e uma sub-amostra de 1 grama foi retirada. Em seguida adicionou-se 9ml de PBS (solução tampão de fosfato) estéril. Diluições em série (1:10) foram preparadas em PBS e as amostras diluídas foram semeadas em meio Rogosa (100 µL/poço) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas em aeróbiose a 37 °C durante 24h para contagem de *Lactobacilli spp.*, e em meio BSM (100 µL/poço) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas em anaeróbiose a 37°C durante 48h para contagem de *Bifidobacterium*, de acordo com os métodos descritos por Huang et al. (2004). Contagens das colônias (ufc/g) foram submetidas à transformação logarítmica (\log_{10}) antes da análise estatística.

Em seguida realizou-se a coleta das amostras de jejuno, íleo e cólon para análises morfológicas. Os segmentos foram previamente lavados com soro fisiológico, e fixados em formol a 10% por 48 horas e coradas de acordo com a metodologia de Pluske, Williams e Aherne (1996b). Duas lâminas foram confeccionadas com três cortes cada por tratamento. O jejuno e íleo foram amostrados por corte com dez vilosidades intestinais, para avaliação de altura de vilosidade, e dez criptas para profundidade de cripta, o cólon foi amostrado em dez criptas. Todas as lâminas foram avaliadas através de Microscópio ótico *Leica Leitz DM RXE*, com Câmera *Leica DC-100* associada e software analisador de imagens “*Leica QWIN ProV.23*” (*Leica Microsystems Imaging Solutions*).

Após a fase de creche os animais foram transferidos para o crescimento e terminação para avaliar o efeito residual da suplementação do ácido benzoico sobre desempenho. Durante essas fases os animais receberam dieta à base de milho e soja seguindo as recomendações do NRC (2012), dos 64 aos 147 dias de vida, sem nenhuma suplementação de aditivos, exceto após a saída de creche, onde todos os animais foram submetidos ao tratamento terapêutico à base de neomicina (140 ppm neomicina base, 5 dias), para evitar disseminação da *E. coli* dentro dos galpões.

O consumo de ração e peso corporal foi registrado aos 147 dias de vida. As sobras de ração foram avaliadas diariamente. Com base nesses dados, o ganho de peso diário, o consumo de ração e a conversão alimentar foram calculados.

2.3 Análises estatísticas

A baía foi utilizada como a unidade experimental ($n = 56$) para a análise estatística. O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Se os dados não apresentassem essa distribuição, era realizada a transformação usando PROC RANK (SAS INSTITUTE INC, 2009). Efeitos foram analisados em fatorial, com análise de blocos casualizados para todos os dados utilizando a análise ANOVA através do PROC GLM (SAS, 2009). O efeito dos tratamentos foi avaliado através do PROC REG. E os efeitos do inoculo foi avaliado através do teste F. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas em $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Temperatura ambiental

As temperaturas máxima e mínima durante a fase de creche do experimento podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 Temperatura máxima e mínima durante a fase de creche do estudo

| Idade em dias | Temperatura sala inoculados | | Temperatura sala não inoculada | |
|---------------|-----------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| | Máxima | Mínima | Máxima | Mínima |
| 21-28 | 31,9 ± 1,0 | 24,8 ± 1,6 | 31,5 ± 0,9 | 23,1 ± 1,9 |
| 29-35 | 31,7 ± 2,2 | 25,4 ± 1,8 | 31,0 ± 1,9 | 24,4 ± 0,9 |
| 36-42 | 28,8 ± 0,8 | 22,8 ± 0,5 | 28,0 ± 0,9 | 22,5 ± 0,8 |
| 43-49 | 28,3 ± 1,2 | 22,3 ± 0,5 | 27,7 ± 1,1 | 21,9 ± 1,0 |
| 50-57 | 30,7 ± 0,9 | 22,3 ± 0,4 | 30,1 ± 1,0 | 21,9 ± 0,3 |
| 58-63 | 31,3 ± 1,4 | 22,6 ± 0,7 | 30,9 ± 0,8 | 22,5 ± 0,8 |

À medida que os suínos crescem, suas exigências térmicas variam. É importante monitorar e ajustar a temperatura da instalação de acordo com essas exigências, pois a temperatura interfere diretamente no comportamento dos animais como consumo de ração e conseqüentemente seu desempenho.

Muitas vezes as instalações não propiciam um controle ideal da temperatura, com isso avaliar a temperatura máxima e mínima durante a realização de estudos nos sistemas de produção de suínos é importante, pois auxilia na interpretação dos resultados obtidos.

Pode-se observar que as temperaturas máximas durante a fase de creche do experimento atingiram a zona crítica para a produção de leitões durante toda a fase de creche. De acordo com Le Diviche et al. (1980), a temperatura crítica de leitões desmamados precocemente é perto de 28°C durante os primeiros 12 dias após o desmame. A temperatura preferencial dos leitões entre 21 e 35 dias de vida é em torno de 25,7°C (BENCH; GONYOU, 2007).

Já a temperatura mínima crítica para leitões gira em torno de 19°C (BENCH; GONYOU, 2007), as temperaturas mínimas do estudo não atingiram valores prejudiciais ao desenvolvimento dos leitões e ficaram dentro do valor ideal para a fase.

3.2 Incidência de diarreia

Houve efeito linear ($y=-2,66+25,43x$; $R^2=0,85$) dos níveis de ácido benzoico sobre a incidência de diarreia ($P=0,027$; Tabela 3). Quando se compara o nível de 0,75% ao controle, pode ser observada redução de 38,3% da diarreia.

Foi observada maior incidência de diarreia para os animais inoculados ($P<0,05$). Entretanto, a suplementação de ácido benzoico não foi capaz de proporcionar redução de diarreia ao nível de um ambiente sem desafio. Com isso, a inoculação dos animais com a cepa de *E. coli* proporcionou maior desafio entérico pelo aumento na incidência de diarreia.

Da mesma forma, Gheler et al. (2009) concluíram que os níveis de 0,5 até 0,75% de ácido benzoico reduzem a incidência de diarreia em leitões na fase de creche.

Tabela 3 Efeitos dos níveis de ácido benzoico sobre a ocorrência de diarreia em leitões inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média* | SEM | P= | | |
|-------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------|------|-----------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| | Diarreia (%) | | | | | 1,32 | 0,0275 | <0,0001 | 0,2094 |
| Inocul. | 32,90 | 24,67 | 20,34 | 19,05 | 24,24A | | | | |
| Não inocul. | 19,05 | 15,15 | 12,12 | 12,99 | 14,83B | | | | |
| Média # | 25,98 | 19,91 | 16,23 | 16,02 | | | | | |

Efeito linear, $R^2=0,85$. * Letras na coluna são diferentes pelo teste F ($P<0,05$).

A dissociação dos ácidos orgânicos fornece a capacidade de tamponamento, que reduz o pH do estômago, aumenta a digestão proteolítica e controla o crescimento de bactérias patogênicas. Entretanto, o ácido benzoico não altera o pH do estômago e do intestino delgado de leitões, devido à sua baixa capacidade de dissociar-se no lúmen intestinal (KLUGE; BROZ; EDER, 2006; NATIONAL COMMITTEE FOR SWINE PRODUCTION, 2000). O ácido benzoico é um ácido fraco com uma constante de dissociação relativamente alta ($pK_a=4,21$) e baixa solubilidade, essas características dificultam sua dissociação no lúmen intestinal.

Os ácidos orgânicos na forma não dissociada podem passivamente difundir através da parede celular bacteriana, após internalizar na bactéria o ácido se dissocia devido o pH no interior da bactéria ser superior ao pK do ácido. Com sua dissociação o pH interno diminui, o que é incompatível com certos tipos de bactérias que não toleram um gradiente acentuado no pH transmembrana. Nesse caso, um mecanismo de resistência que reage a esse tipo de estresse celular irá ligar e os prótons serão bombeados para fora da bactéria pela bomba Na^+/K^+ .

Esse mecanismo de defesa das bactérias utiliza muita energia, e tem dificuldade de controlar o pH interno devido. Os ânions irão acumular-se na célula, modificar a pressão osmótica interna e tornar-se tóxico para a bactéria (cessação da glicólise e de síntese de ácidos nucleicos, reações enzimáticas bloqueadas, perturbação de transporte membranosa, etc.); além de provocar morte bacteriana por exaustão (JENSEN, 2001).

Dessa forma o ácido benzoico apresenta maior atividade antibacteriana o que pode ter contribuído para a redução da incidência de diarreia neste trabalho.

3.3 pH e morfologia intestinal

Animais inoculados apresentaram maior valor de pH para o jejuno e íleo quando comparado a animais não inoculados ($P < 0,05$). Foi observado um efeito cúbico dos níveis de ácido benzoico sobre o pH do íleo ($P < 0,05$; Tabela 4).

Meios com pH na faixa de 3,5 a 4,0 favorece desenvolvimento de microrganismos benéficos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BLANCHARD, 2000; WALSH et al., 2004) e a redução na população de *Clostridium perfringens*, *E. coli* e *Salmonella* ssp. Com isso, o desafio pode ter favorecido o desenvolvimento de bactérias patogênicas reduzindo a quantidade de bactérias benéficas no intestino, podendo ser responsável pelo maior pH em animais inoculados no jejuno e no íleo, devido a redução dos metabólitos capazes de alterar o pH intestinal produzido por bactérias benéficas, como os ácidos graxos.

Tabela 4 pH dos segmentos intestinais de leitões aos 42 dias de vida, recebendo diferentes níveis de ácido benzoico inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média* | SEM | P= | | |
|--------------------|--------------------------|------|------|------|--------|------|-----------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| pH estômago | | | | | | | | | |
| Inoculados | 3,61 | 2,99 | 2,66 | 2,79 | 3,01 | 0,36 | 0,2861 | 0,6077 | 0,745 |
| Não inoculados | 3,16 | 2,67 | 2,96 | 2,72 | 2,88 | | | | |
| Média | 3,38 | 2,83 | 2,81 | 2,75 | | | | | |
| pH duodeno | | | | | | | | | |
| Inoculados | 5,95 | 5,97 | 5,41 | 5,61 | 5,74 | 0,23 | 0,4733 | 0,6166 | 0,487 |
| Não inoculados | 5,59 | 5,65 | 5,54 | 5,83 | 5,65 | | | | |
| Média | 5,77 | 5,81 | 5,47 | 5,72 | | | | | |
| pH jejuno | | | | | | | | | |
| Inoculados | 6,38 | 6,37 | 6,03 | 6,33 | 6,27 A | 0,12 | 0,0717 | 0,0064 | 0,344 |
| Não inoculados | 6,24 | 6,04 | 5,98 | 5,89 | 6,04 B | | | | |
| Média | 6,31 | 6,20 | 6,00 | 6,11 | | | | | |
| pH íleo | | | | | | | | | |
| Inoculados | 6,77 | 6,63 | 6,63 | 6,67 | 6,68 A | 0,13 | 0,037 | 0,0341 | 0,246 |
| Não inoculados | 6,80 | 6,18 | 6,57 | 6,36 | 6,48 B | | | | |
| Média # | 6,78 | 6,40 | 6,60 | 6,51 | | | | | |

Efeito cúbico, $R^2 = 1$; * Letras na coluna são diferentes pelo teste F ($P < 0,05$).

O ácido benzoico possui baixa capacidade de acidificação do meio. A influência do ácido benzoico sobre o pH na porção final do trato gastrintestinal está relacionada à redução na concentração de nitrogênio amoniacal e maiores concentrações de ácidos graxos voláteis (DIAO et al., 2014). Da mesma forma, Diao et al. (2014) observaram que a suplementação dietética com 0,5% de ácido benzoico diminuiu os valores de pH da digesta no ceco e cólon. Com isso, parece que o ácido benzoico favoreceu acidificação da porção final do intestino delgado e o início do intestino grosso.

Dessa forma, a influencia do pH nessas regiões do intestino está relacionada à produção de metabólitos microbianos e o nível de ácido benzoico utilizado.

Os resultados de morfologia do jejuno estão representados na tabela 5. Pode-se observar interação significativa da suplementação do ácido benzoico sobre a altura de vilosidades no jejuno de leitões aos 42 dias de vida, sendo que a suplementação com 0,5% de ácido benzoico proporciona maior altura de vilosidades para animais inoculados, quando comparado à mesma dose para animais não inoculados ($P < 0,05$). Esses resultados podem estar associados ao melhor controle da população microbiana, o que favorece o desenvolvimento do epitélio intestinal. Os animais inoculados apresentaram um pH no jejuno de 2,66 quando suplementados com 0,5% de ácido benzoico e os não inoculados um pH de 2,96. Essa diferença apesar de não significativa pode ter influenciado os resultados de altura de vilosidades no jejuno. Segundo Lupton e Javobs (1987) o valor de pH pode afetar o crescimento de células e a divisão celular, sendo que a acidez pode favorecer o desenvolvimento do epitélio intestinal.

Para a profundidade de criptas no jejuno houve interação significativa ($P < 0,05$), sendo que para os animais inoculados pode-se observar um efeito quadrático da suplementação do ácido benzoico (Figura 1), sendo que o nível de 0,25% de ácido benzoico proporcionou maior profundidade de criptas.

Para relação vilo:cripta no jejuno houve efeito quadrático independente do desafio ($P = 0,0008$), sendo que o nível de 0,32% de ácido benzoico resultou em menor relação (Figura 2). O desafio proporcionou uma maior relação vilo:cripta ($P < 0,0001$) quando comparado aos animais não inoculados.

Diao et al. (2014) demonstraram que a suplementação com 0,5% com ácido benzoico melhora a morfologia intestinal, sendo observado aumento na altura de vilosidade e na relação vilo:cripta no jejuno de leitões. Da mesma forma pode ser observado que em animais inoculados o aumento na altura de

vilosidades no jejuno teve um efeito quadrático, independente do desafio na relação vilo:cripta. Essas alterações podem favorecer no aumento da absorção de nutrientes e com isso melhora no desempenho.

Tabela 5 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo/cripta do jejuno de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média** | SEM | P= | | |
|--|--------------------------|--------|---------|---------|---------|-------|------------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz.. | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| Vilo (μm) | | | | | | 56,45 | 0,2298 | 0,2166 | 0,0098 |
| Inoculado | 359,06 | 331,83 | 366,42A | 320,76 | 344,52 | | | | |
| Não inoculado | 332,85 | 332,59 | 331,67B | 345,70 | 335,70 | | | | |
| Média | 345,95 | 332,21 | 349,04 | 333,23 | | | | | |
| Cripta (μm) | | | | | | 47,30 | 0,0005 | <0,0001 | 0,0005 |
| Inoculado* | 283,24 | 309,22 | 279,29 | 239,86B | 278,03B | | | | |
| Não inoculado | 293,26 | 322,97 | 302,55 | 318,78A | 309,39A | | | | |
| Média | 288,25 | 316,09 | 290,92 | 279,32 | | | | | |
| Relação Vilo/Cripta | | | | | | 0,27 | 0,0008 | <0,0001 | 0,1101 |
| Inoculado | 1,27 | 1,07 | 1,31 | 1,34 | 1,27A | | | | |
| Não inoculado | 1,14 | 1,03 | 1,10 | 1,08 | 1,10B | | | | |
| Média # | 1,20 | 1,05 | 1,21 | 1,21 | | | | | |

* Efeito quadrático, $R^2 = 0,9474$; # Efeito quadrático, $R^2 = 0,3708$; ** Letras na coluna são diferentes pelo teste F ($P < 0,05$).

O desmame proporciona diversas alterações sobre a vilosidade e a profundidade de criptas dos leitões. A altura da vilosidade e a profundidade de criptas possuem uma correlação significativa com o número e a taxa de maturação das células epiteliais das vilosidades intestinais (PLUSKE; WILLIAMS; AHERNE, 1996a). Dessa forma, aditivos utilizados na dieta

podem influenciar no desenvolvimento do epitélio intestinal, pelo controle de microrganismos patogênicos, como fonte de energia ou como estímulo trófico.

Os leitões ao desmame apresentam uma diminuição da ingestão de energia e devido a isso a quantidade de mucosa no intestino delgado diminui. A quantidade de mucosa no intestino está diretamente relacionada ao consumo de energia, que irá fornecer mais substrato para o crescimento da mucosa (PEKAS, 1986). Com isso, o controle da população microbiana no intestino de leitões pode favorecer a maior disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento da mucosa intestinal.

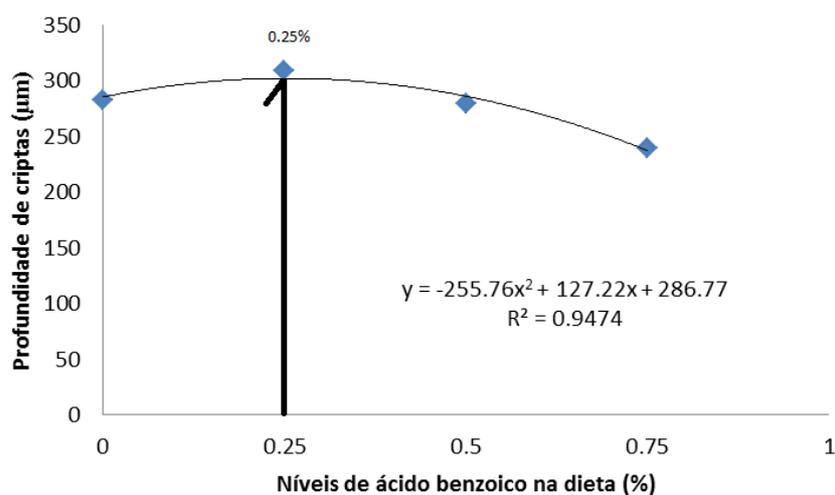


Figura 1 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a profundidade de criptas do jejuno de leitões inoculados

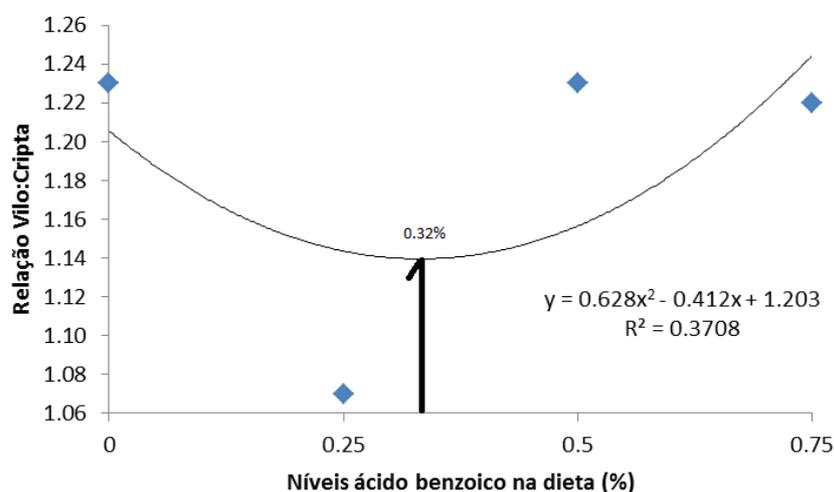


Figura 2 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a relação vilo:cripta do jejuno de leitões recebendo diferentes níveis de ácido benzoico

Os resultados de morfologia do íleo estão representados na tabela 6. Houve efeito linear ($y=51,808x+25,43$; $R^2=0,56$) dos níveis de ácido benzoico sobre a altura de vilosidades ($P=0,0011$). O desafio influenciou a altura de vilosidades no íleo ($P<0,0001$), sendo que os animais não inoculados apresentaram maior altura de vilosidade comparada aos animais inoculados. Maior altura de vilosidades favorece maior absorção de nutrientes pelo sistema digestório dos animais, esses resultados estão de acordo com os observados para o desempenho dos animais neste estudo sobre a fase total de creche.

Entretanto, houve efeito linear ($y=49,62x+280,42$; $R^2=0,93$) sobre a profundidade de criptas ($P=0,0108$), em que a suplementação com ácido benzoico proporcionou aumento da profundidade. Com isso, não foi possível observar aumento na relação vilo:cripta no íleo ($P>0,05$).

O aumento na profundidade das criptas é geralmente acompanhado de incremento na população celular (TEIXEIRA et al., 2003). Com isso, o aumento

na profundidade de criptas influenciou diretamente na altura de vilosidades pelo maior estímulo de desenvolvimento celular.

Segundo Pluske, Williams e Aherne (1996a), a profundidade das criptas e a altura das vilosidades estão mais frequentemente relacionadas com o consumo de alimento, embora possam também resultar de algum efeito antigênico. Por isso, animais não inoculados apresentaram maior relação vilo:cripta no íleo ($P=0,0163$).

Tabela 6 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo/cripta do íleo de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média* | SEM | P= | | |
|--|--------------------------|--------|--------|--------|---------------------|-------|-----------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| Vilo (μm) | | | | | | 70,82 | 0,0011 | <0,0001 | 0,2061 |
| Inoculado | 250,07 | 268,31 | 267,23 | 269,66 | 263,82B | | | | |
| Não inoculado | 259,34 | 331,62 | 298,69 | 337,42 | 306,76 ^a | | | | |
| Média # | 254,70 | 299,96 | 282,96 | 303,54 | | | | | |
| Cripta (μm) | | | | | | 62,95 | 0,0108 | 0,1024 | 0,0748 |
| Inoculado | 276,88 | 297,05 | 296,67 | 293,10 | 290,92 | | | | |
| Não inoculado | 286,16 | 291,71 | 301,50 | 349,67 | 307,26 | | | | |
| Média ## | 281,52 | 294,38 | 299,08 | 321,38 | | | | | |
| Relação Vilo/Cripta | | | | | | 0,27 | 0,3912 | 0,0163 | 0,2924 |
| Inoculado | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,92 | 0,91B | | | | |
| Não inoculado | 0,91 | 1,14 | 0,99 | 0,97 | 1,00A | | | | |
| Média | 0,91 | 1,02 | 0,95 | 0,95 | | | | | |

Efeito linear, $R^2 = 0,56$; ## Efeito linear, $R^2 = 0,93$; * Letras na coluna são diferentes pelo teste F ($P < 0,05$).

Pode-se observar interação significativa ($P = 0,0083$; Tabela 7) entre os níveis de ácido benzoico e o desafio sobre as criptas do cólon (Figura 19), sendo que o nível de 0,59% de ácido benzoico resulta em menor profundidade de criptas para os animais não inoculados.

Tabela 7 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a profundidade de criptas no cólon de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média | SEM | P= | | |
|--|--------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-----------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| Cripta (μm) | | | | | | 70,50 | 0,0042 | 0,0989 | 0,0083 |
| Inoculado | 467,74 | 473,73 | 465,44 | 459,44 | 466,59 | | | | |
| Não inoculado* | 536,35 | 499,41 | 439,79 | 465,88 | 485,36 | | | | |
| Média | 502,04 | 486,57 | 452,61 | 462,66 | | | | | |

* Efeito quadrático, $R^2 = 0,8882$.

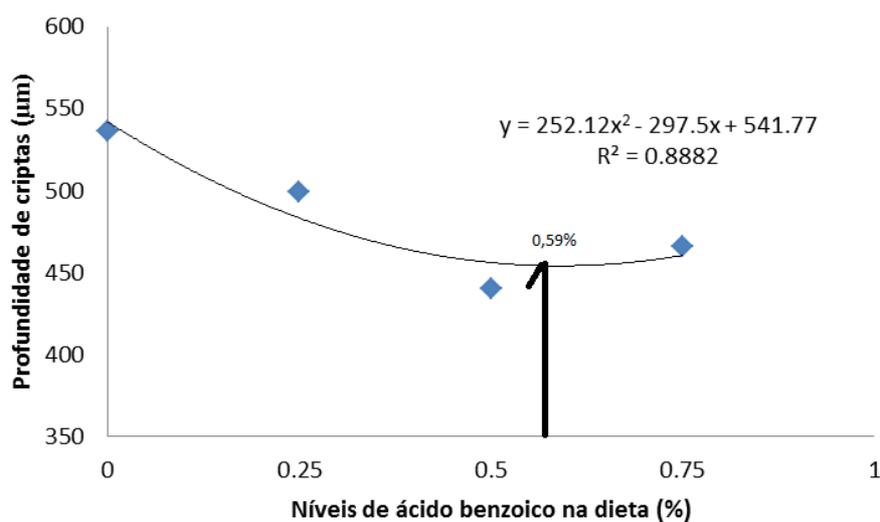


Figura 3 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a profundidade de criptas do cólon de leitões não inoculados

As características metabólicas das células epiteliais do cólon estão intimamente relacionadas aos eventos digestórios do intestino grosso. O amido resistente, polissacarídeos não amiláceos e proteína residual são utilizados pela microflora do cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta. Os produtos

principais são o ácido acético, propiônico e butírico que são rapidamente absorvidos através da mucosa do cólon (MACFARLANE; CUMMINGS, 1991). Dessa forma a utilização de ácido benzoico na dieta de leitões favorece menor renovação celular no cólon de leitões, redução da profundidade de cripta pode estar relacionada ao menor gasto energético dos animais para essa finalidade.

3.4 Microbiologia e AGVs

Nas condições do presente experimento não houve diferença na população dessas bactérias no ceco de leitões suplementados com ácido benzoico (Tabela 8).

Tabela 8 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a população de *Bifidobacterium* e *Lactobacilli* spp no ceco de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média | SEM | P= | | |
|---|--------------------------|------|------|------|-------|------|----------------|-----------|-------------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ácido benzoico | Inoculado | Ácido X Inoculado |
| <i>Bifidobacterium</i> (log₁₀ ufc/g) | | | | | | 0,10 | 0,8135 | 0,6948 | 0,1699 |
| Inoculado | 4,44 | 4,54 | 3,84 | 3,99 | 4,20 | | | | |
| Não inoculado | 4,52 | 3,78 | 4,48 | 4,15 | 4,23 | | | | |
| Média | 4,48 | 4,16 | 4,16 | 4,07 | | | | | |
| <i>Lactobacilli</i> spp (log₁₀ ufc/g) | | | | | | 0,11 | 0,5485 | 0,2659 | 0,9371 |
| Inoculado | 4,07 | 3,95 | 3,47 | 3,62 | 3,78 | | | | |
| Não inoculado | 4,36 | 3,96 | 3,83 | 3,92 | 4,02 | | | | |
| Média | 4,22 | 3,96 | 3,65 | 3,77 | | | | | |

Populações microbianas no trato gastrointestinal desempenham um papel complexo na nutrição e saúde dos suínos. Entretanto, a microbiota e suas relações com hospedeiro não são completamente compreendidas, apesar de muitos anos de pesquisa (DIBNER; BUTTIN, 2002). Alguns estudos

demonstram que o uso de ácidos orgânicos reduz a sobrecarga de coliformes e bactérias patogênicas ao longo do trato gastrointestinal (BOULDUAN et al., 1988), diminuindo a diarreia e mortalidade em leitões.

Diao et al. (2014) verificaram que o ácido benzoico aumentou o número de *Bifidobacterium* e *Bacillus*, e diminuiu o número de *E. coli* e *Enterococcus* no íleo e ceco de leitões. Entretanto, não foi observado efeito significativo sobre a população de *Bifidobacterium* e *Lactobacilli* spp. Como o ambiente intestinal é muito complexo, a variação na população bacteriana depende de diversos fatores, como tipo de ração, idade dos animais e ambiente de criação.

Não foram observadas diferenças sobre a produção de ácido acético e propiônico no conteúdo cecal dos leitões ($P>0,05$; Tabela 9). Entretanto, houve redução na produção de ácido butírico no ceco de leitões inoculados ($P<0,05$).

Tabela 9 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a produção de ácidos graxos voláteis no ceco de leitões aos 42 dias de vida, inoculados com *E. coli* K88+

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média* | SEM | P= | | |
|----------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------|------|----------------|-----------|-------------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ácido benzoico | Inoculado | Ácido X Inoculado |
| Acético (mMol/g) | | | | | | 32,4 | 0,4143 | 0,8161 | 0,3867 |
| Inoculado | 650,6 | 635,8 | 561,8 | 792,3 | 660,1 | | | | |
| Não inoculado | 619,2 | 725,6 | 646,5 | 612,2 | 650,9 | | | | |
| Média | 635,0 | 680,7 | 604,1 | 702,3 | | | | | |
| Propiônico (mMol/g) | | | | | | 14,6 | 0,5286 | 0,9422 | 0,1011 |
| Inoculado | 331,5 | 256,8 | 250,3 | 332,8 | 292,9 | | | | |
| Não inoculado | 250,0 | 334,5 | 286,5 | 303,1 | 293,5 | | | | |
| Média | 290,8 | 295,6 | 268,4 | 317,9 | | | | | |
| Butírico (mMol/g) | | | | | | 8,0 | 0,0708 | 0,0212 | 0,1929 |
| Inoculado | 113,2 | 117,0 | 126,6 | 167,5 | 131,1B | | | | |
| Não inoculado | 134,4 | 187,6 | 170,5 | 162,0 | 163,6A | | | | |
| Média | 123,8 | 152,3 | 148,5 | 164,7 | | | | | |

* Letras na coluna são diferentes pelo teste F (P<0,05).

Conforme demonstrado por Sakata et al. (1995), ácidos graxos de cadeia curta, como acético, propiônico e butírico produzidos pela fermentação microbiana da fibra da dieta no intestino grosso aumentam a proliferação de células epiteliais. Os ácidos orgânicos se destacam como componentes importantes para essa finalidade. Ainda, antes de serem acidificantes da dieta, são conhecidos como efetivos conservantes. Sua ação bacteriostática primária ocorre pela redução do pH da dieta (FOEGEDING; BUSTA,1991).

O ácido butírico é metabolizado pelos colonócitos e é responsável por aproximadamente 70% do seu consumo total de energia, e tem efeito sobre o

crescimento da parede do trato gastrointestinal (WILLIAMS; VERSTEGEN; TAMMINGA, 2001).

Houve aumento numérico de ácido butírico no ceco à medida que se aumenta a suplementação de ácido butírico na dieta, para os animais inoculados o nível de 0,75% modulou a produção no mesmo nível de animais não inoculados. Com isso, a utilização de ácido benzoico modula a produção de metabolitos pela microbiota cecal e resulta em melhor morfologia dos diferentes segmentos intestinais. Esse aumento pode estar relacionado à modulação da população microbiana no ceco. Esses resultados sugerem que a redução na profundidade de criptas no cólon desses animais está relacionada à maior produção de ácido butírico.

3.5 Desempenho

Houve efeito linear dos níveis de ácido benzoico na dieta ($P < 0,05$) sobre o peso dos animais ($y = 0,95x + 10,62$; $R^2 = 0,72$), ganho de peso diário ($y = 0,044x + 0,2037$; $R^2 = 0,70$) e conversão alimentar ($y = -0,332x + 1,968$; $R^2 = 0,74$) dos 21 aos 42 dias de vida (Tabela 10). Dessa forma, do desmame aos 42 dias de vida a suplementação com 0,75% de ácido benzoico proporcionou melhores resultados de desempenho.

Tabela 10 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o desempenho de leitões inoculados com *E. coli* K88+ dos 21 aos 42 dias de vida

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média | SEM | P= | | |
|--------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|--------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inoc. | Ác. x Inocul. |
| Peso 21-42 dias (Kg) | | | | | | 0,27 | 0,0211 | 0,6065 | 0,444 |
| Inoculado | 10,55 | 10,80 | 11,16 | 11,20 | 10,93 | | | | |
| Não inoculado | 10,33 | 11,42 | 11,10 | 11,25 | 11,03 | | | | |
| Média # | 10,44 | 11,11 | 11,13 | 11,23 | | | | | |
| GPD 21-42 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,013 | 0,024 | 0,627 | 0,412 |
| Inoculado | 0,199 | 0,210 | 0,228 | 0,230 | 0,217 | | | | |
| Não inoculado | 0,188 | 0,240 | 0,225 | 0,232 | 0,221 | | | | |
| Média ## | 0,193 | 0,225 | 0,226 | 0,231 | | | | | |
| CRD 21-42 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,019 | 0,265 | 0,898 | 0,069 |
| Inoculado | 0,289 | 0,293 | 0,310 | 0,309 | 0,300 | | | | |
| Não inoculado | 0,288 | 0,335 | 0,272 | 0,301 | 0,299 | | | | |
| Média | 0,288 | 0,314 | 0,291 | 0,305 | | | | | |
| CA 21-42 dias | | | | | | 0,07 | 0,0009 | 0,426 | 0,161 |
| Inoculado | 1,45 | 1,40 | 1,36 | 1,34 | 1,39 | | | | |
| Não inoculado | 1,53 | 1,40 | 1,21 | 1,30 | 1,36 | | | | |
| Média ### | 1,49 | 1,40 | 1,29 | 1,32 | | | | | |

Efeito linear, $R^2 = 0,72$; ## Efeito linear, $R^2 = 0,70$; ### Efeito linear, $R^2 = 0,74$.

Houve efeito quadrático dos níveis de ácido benzoico na dieta ($P < 0,05$) para o peso dos animais (Figura 4), o ganho de peso diário (Figura 5) e a conversão alimentar (Figura 6) dos 21 aos 49 dias de vida (Tabela 11), sendo a suplementação de 0,51% de ácido benzoico o melhor resultado para peso aos 49 dias, o nível de 0,49% o melhor nível para ganho de peso diário e o nível de 0,47% apresentou menor conversão alimentar.

Tabela 11 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o desempenho de leitões inoculados com *E. coli* K88+ dos 21 aos 49 dias de vida

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média | SEM | Ác. benz. | P= | |
|--------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| Peso 21-49 dias (Kg) | | | | | | 0,38 | 0,0249 | 0,93 | 0,320 |
| Inoculado | 13,31 | 13,68 | 14,04 | 14,25 | 13,82 | | | | |
| Não inoculado | 12,88 | 14,48 | 14,17 | 13,84 | 13,84 | | | | |
| Média # | 13,09 | 1,08 | 14,11 | 14,05 | | | | | |
| GPD 21-49 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,013 | 0,0278 | 0,9494 | 0,312 |
| Inoculado | 0,248 | 0,260 | 0,274 | 0,281 | 0,266 | | | | |
| Não inoculado | 0,232 | 0,289 | 0,278 | 0,266 | 0,267 | | | | |
| Média ## | 0,240 | 0,274 | 0,276 | 0,273 | | | | | |
| CRD 21-49 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,022 | 0,2677 | 0,7408 | 0,151 |
| Inoculado | 0,389 | 0,388 | 0,410 | 0,416 | 0,401 | | | | |
| Não inoculado | 0,371 | 0,433 | 0,378 | 0,404 | 0,396 | | | | |
| Média | 0,380 | 0,410 | 0,394 | 0,410 | | | | | |
| CA 21-49 dias | | | | | | 0,06 | 0,0113 | 0,629 | 0,270 |
| Inoculado | 1,57 | 1,49 | 1,50 | 1,48 | 1,51 | | | | |
| Não inoculado | 1,60 | 1,50 | 1,36 | 1,52 | 1,50 | | | | |
| Média### | 1,59 | 1,50 | 1,43 | 1,50 | | | | | |

Efeito quadrático, $R^2 = 0,95$; ## Efeito quadrático, $R^2 = 0,94$; ### Efeito quadrático, $R^2 = 0,95$.

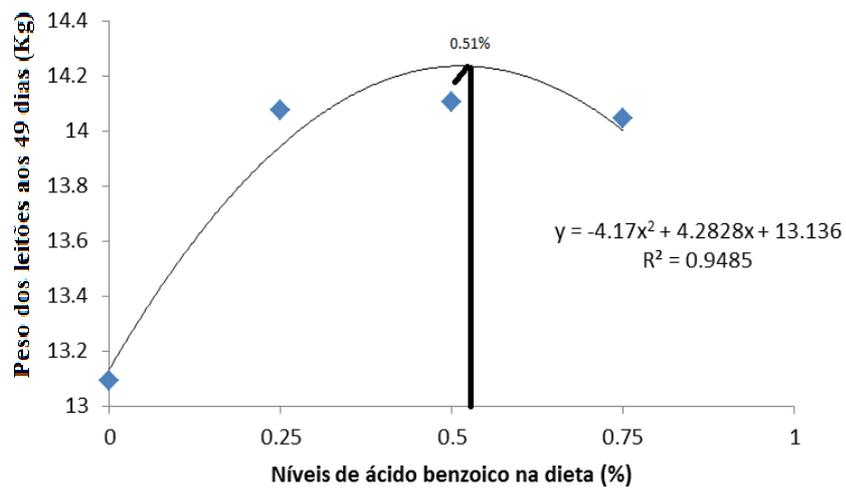


Figura 4 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o peso de leitões aos 49 dias de vida

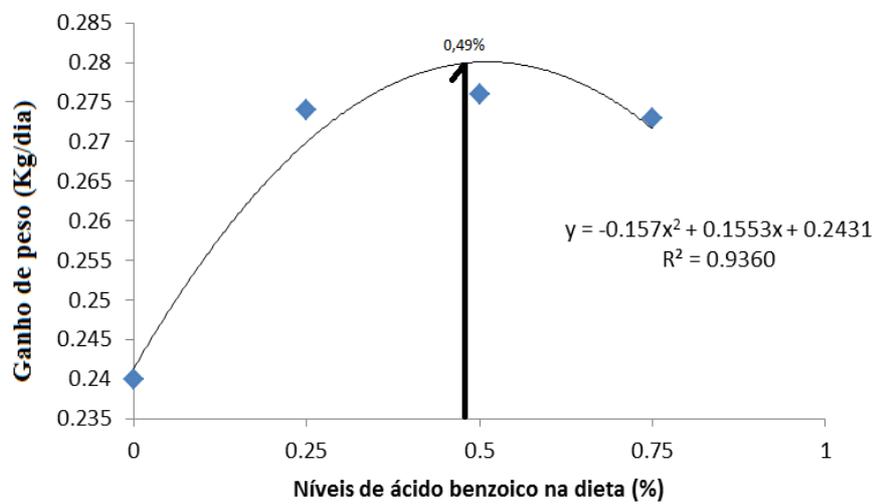


Figura 5 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o ganho de peso diário de leitões aos 49 dias de vida

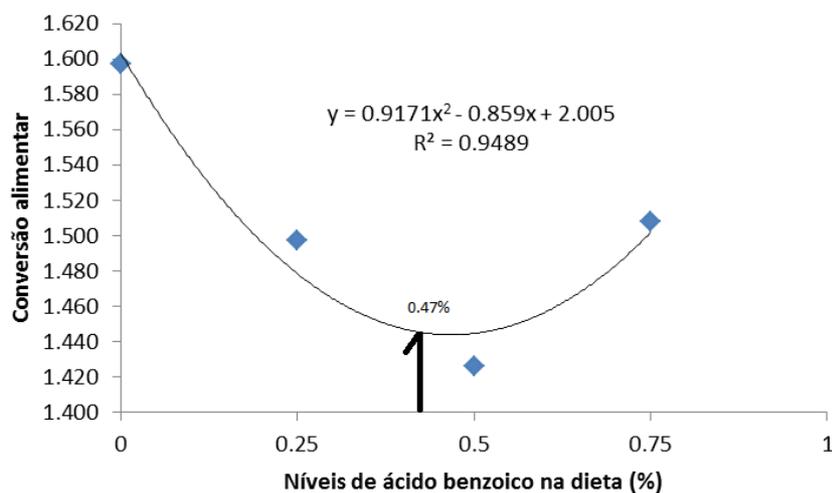


Figura 6 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre a conversão alimentar de leitões aos 49 dias de vida

Houve efeito linear dos níveis de ácido benzoico na dieta ($P < 0,05$) para o peso dos animais ($y = 1,7531x + 19,316$; $R^2 = 0,46$), ganho de peso diário ($y = 0,06114x + 0,301$; $R^2 = 0,59$) e conversão alimentar ($y = -0,188x + 2,0451$; $R^2 = 0,76$) dos 21 aos 63 dias de vida (Tabela 12). Em que, o nível de 0,75% apresentou melhores resultados de desempenho para os animais durante toda a fase de creche. Nessa mesma fase foi observado efeito cúbico para o consumo de ração diário ($P < 0,05$).

Tabela 12 Efeito dos níveis de ácido benzoico sobre o desempenho de leitões inoculados com *E. coli* K88+ dos 21 aos 63 dias de vida

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média | SEM | P= | | |
|--------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|---------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inocul. | Ác. x Inocul. |
| Peso 21-63 dias (Kg) | | | | | | 0,65 | 0,0281 | 0,1582 | 0,430 |
| Inoculado | 18,66 | 19,66 | 19,83 | 20,43 | 19,65 | | | | |
| Não inoculado | 18,93 | 21,64 | 20,10 | 20,54 | 20,30 | | | | |
| Média # | 18,80 | 20,65 | 19,97 | 20,49 | | | | | |
| GPD 21-63 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,014 | 0,0008 | 0,2288 | 0,200 |
| Inoculado | 0,293 | 0,316 | 0,321 | 0,343 | 0,318 | | | | |
| Não inoculado | 0,284 | 0,363 | 0,327 | 0,346 | 0,330 | | | | |
| Média ## | 0,288 | 0,339 | 0,324 | 0,344 | | | | | |
| CRD 21-63 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,023 | 0,0184 | 0,8225 | 0,159 |
| Inoculado | 0,515 | 0,539 | 0,548 | 0,574 | 0,544 | | | | |
| Não inoculado | 0,508 | 0,598 | 0,526 | 0,557 | 0,547 | | | | |
| Média * | 0,511 | 0,568 | 0,537 | 0,565 | | | | | |
| CA 21-63 dias | | | | | | 0,05 | 0,011 | 0,08 | 0,622 |
| Inoculado | 1,76 | 1,71 | 1,71 | 1,67 | 1,71 | | | | |
| Não inoculado | 1,79 | 1,65 | 1,61 | 1,61 | 1,67 | | | | |
| Média### | 1,78 | 1,68 | 1,66 | 1,64 | | | | | |

Efeito linear, $R^2 = 0,46$; ## Regressão linear, $R^2 = 0,59$; ### Efeito linear, $R^2 = 0,75$; * Efeito cubico $R^2 = 1$.

Diversos trabalhos têm demonstrado efeitos positivos no ganho de peso de leitões, consumo de ração e na conversão alimentar da suplementação do ácido benzoico nas dietas de leitões (ALVARADO et al. 2013; DIAO et al., 2013, 2014; GHELER et al., 2009; GRÄBER et al., 2012; GUGGENBUHL et al., 2007; HALAS et al., 2010; KLUGE; BROZ; EDER, 2006; PAPATSIROS et al., 2011; TORRALLARDONA et al., 2007).

Esses estudos documentaram melhoria no ganho de peso diário, variando de 8,5 até 40,4%, o aumento no consumo de ração variando de 6,7 até 9,7% e redução na conversão alimentar variando de 2 até 7,5% para animais

recebendo a suplementação de 0,5% de ácido benzoico em comparação com a dieta de controle.

Na literatura, os efeitos da inclusão de níveis de 0; 0,25; 0,50 e 0,75% de ácido benzoico na dieta de leitões também apresentaram efeito linear sobre os parâmetros de desempenho (GHELER et al., 2009). Dessa forma, o nível de 0,75% de ácido benzoico resulta em melhor desempenho para leitões.

A melhora no desempenho pode estar relacionada à redução de bactérias do trato digestório. Guggenbuhl et al. (2007) observaram redução no número de bactérias produtoras de ácido lático e de *E.Coli* no ceco dos leitões suplementados com ácido benzoico na fase de creche.

Além disso, a suplementação com ácido benzoico aumenta a digestibilidade da matéria seca, da proteína bruta, extrato étereo, Ca, P, cinzas e a utilização de energia, conjuntamente com o aumento das atividades de tripsina, amilase, maltase, a lipase, a lactase e sacarase de digesta no jejuno em leitões desmamados (DIAO et al., 2013), o que significa que o ácido benzoico pode melhorar o desempenho dos leitões através de aumento da digestão e absorção de nutrientes.

No presente estudo houve redução significativa da incidência de diarreia durante a fase de creche e melhoria dos aspectos morfológicos do íleo e do cólon, com a utilização do ácido benzoico. Esses resultados podem estar diretamente relacionados com a melhoria dos animais durante a fase de creche.

A utilização do ácido benzoico na fase de creche influenciou de forma linear o peso final ($y=8,36x+85,1401$; $R^2=0,64$) e o ganho de peso ($y=0,0582x+0,6237$; $R^2=0,63$) diário dos suínos dos 21 aos 147 dias ($P<0,05$; Tabela 13). Esse efeito pode estar relacionado a um estímulo sobre o consumo diário de ração.

Tabela 13 Efeito residual dos níveis de ácido benzoico na creche em leitões inoculados com *E. coli* K88+ sobre o desempenho dos 21 aos 147 dias de vida.

| | Níveis de ácido benzoico | | | | Média | SEM | P= | | |
|---------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|--------|---------------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | | | Ác. benz. | Inoc. | Ác. x Inocul. |
| Peso 21-147 dias (Kg) | | | | | | 0,69 | 0,0076 | 0,2323 | 0,9292 |
| Inoculado | 82,61 | 88,51 | 89,16 | 88,96 | 87,31 | | | | |
| Não inoc. | 83,90 | 91,56 | 89,60 | 91,92 | 89,25 | | | | |
| Média * | 83,26 | 90,04 | 89,38 | 90,44 | | | | | |
| GPD 21-147 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,007 | 0,0529 | 0,6520 | 0,9982 |
| Inoculado | 0,605 | 0,652 | 0,657 | 0,655 | 0,642 | | | | |
| Não inoc. | 0,615 | 0,660 | 0,661 | 0,660 | 0,649 | | | | |
| Média ** | 0,610 | 0,656 | 0,659 | 0,658 | | | | | |
| CRD 21-147 dias (Kg/dia) | | | | | | 0,018 | 0,0959 | 0,6317 | 0,6992 |
| Inoculado | 1,452 | 1,517 | 1,481 | 1,520 | 1,493 | | | | |
| Não inoc. | 1,392 | 1,575 | 1,514 | 1,563 | 1,511 | | | | |
| Média*** | 1,422 | 1,546 | 1,498 | 1,542 | | | | | |
| CA 21-147 dias | | | | | | 0,02 | 0,5766 | 0,8499 | 0,4184 |
| Inoculado | 2,40 | 2,33 | 2,25 | 2,32 | 2,33 | | | | |
| Não inc. | 2,26 | 2,39 | 2,29 | 2,37 | 2,33 | | | | |
| Média | 2,33 | 2,36 | 2,27 | 2,35 | | | | | |

* Regressão linear, $R^2 = 0,64$; ** Regressão linear, $R^2 = 0,63$.

De acordo com Mahan e Lepine (1991) o peso pós a desmama e o programa de alimentação na creche podem afetar o desempenho tanto na creche como no período de crescimento e terminação.

Atualmente, diversos aditivos estão disponíveis para a fase de creche no sistema de criação de suínos e diversos programas de alimentação com diferentes aditivos têm sido utilizados. Entretanto, o efeito residual desses aditivos nas fases posteriores é pouco estudado. O desempenho final dos animais é de grande importância para compreender se os aditivos utilizados na fase de creche realmente resultam em melhor desempenho durante toda a vida do

animal. Com esses resultados o produtor pode avaliar se o retorno do investimento da utilização do aditivo é vantajoso.

Com isso, os trabalhos realizados em leitões na fase de creche, deveriam acompanhar o desempenho até a sua fase de terminação de modo a garantir maiores informações para a utilização de aditivos.

4 CONCLUSÃO

O nível de 0,75% de ácido benzoico é o que apresenta melhores resultados para o desempenho de leitões na fase de creche, sendo que esses efeitos estendem-se até a terminação. A melhoria do desempenho desses animais está relacionada à melhoria nos parâmetros morfológicos do íleo e do cólon dos leitões e à redução da incidência de diarreia durante a fase de creche.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, P. et al. Ácido benzoico y un producto basado en especies de *Bacillus* para proteger la productividad de los lechones y al ambiente **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, Mérida, v. 4, n. 4, p. 447-468, 2013.
- BENCH, C. J.; GONYOU, H. W. Temperature preference in piglets weaned at 12–14 days of age. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, p. 299–302, 2007.
- BOULDUAN, G. et al. Recent advances in the nutrition of weaning piglets. **Pig News and Information**, Farnham, v. 9, p. 381-385, 1988.
- CASEY, P. G. et al. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with salmonella enterica serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1858, Jan. 2007.
- DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid on growth performance, serum biochemical parameters, nutrient digestibility and digestive enzymes activities of jejuna digesta in weaner piglets. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, Beijing, v. 25, p. 768–777, 2013.
- DIAO, H. et al. Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 167, p. 249–256, 2014.
- DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of the microbiota on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 11, p. 453-463, 2002.

FAIRBROTHER, J. M., E.; NADEAU, É.; GYLES, D. C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: An update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Review**, Cambridge, v. 6, p. 17–39, 2005.

FOEGEDING, P. M.; BUSTA, F. F. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 802-832.

GHELER, T. R. et al. Uso de ácido benzoico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 11, p. 2182-2187, 2009.

GRÄBER, T. et al. Effects of dietary benzoic acid and sodium-benzoate on performance, nitrogen and mineral balance and hippuric acid excretion of piglets. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 66, n. 3, p. 227–236, 2012.

GUGGENBUHL, A. et al. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 108, p. 218–221, 2007.

HALAS, D. et al. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, p. 137-147, 2009.

HALAS, D. et al. Effects of benzoic acid and inulin on ammonia-nitrogen excretion, plasma urea levels, and the pH in faeces and urine of weaner pigs. **Livestock Science**. Amsterdam, v. 134, p. 243–245, 2010.

HUANG, C. et al. Effects of Lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. **Science**, Washington, v. 17, n. 3, p. 401-409, 2004.

JENSEN, B. B. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in gut. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERG, J. E. (Ed.). **Gut environment of pigs**. Nottingham: Nottingham University, 2001. p. 181–200.

KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 90, p. 316–324, 2006.

LE DIVICH, J. et al. Effects of environmental temperature on heat production, energy retention, protein and fat gain in early weaned piglets. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 44, n. 3, p. 313-323, 1980.

LUPTON, J. R.; JAVOBS, L. R. Fiber supplementation results in expanded Proliferative zones in rat Gastric mucosa. **American Journal Clinical of Nutrition**, Bethesda, v. 46, p. 980–984, 1987.

MAC FARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function. In: PHILLIPS, S. F.; PEMBERTON, J. H.; MAHAN, D.C.; LEPINE, A.J. Effect of pig weaning weight and associated feeding programs on subsequent performance to 105 kilograms body weight. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 1370-1378, 1991.

NATIONAL COMMITTEE FOR PIG PRODUCTION. **Products for weaners: benzoic acid or the combination of lactic acid and formic acid**. Copenhagen, 2000. Report n. 490.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine**. 11th ed. Washington, 2012.

PAPATSIROS, V.G. et al. Effect of benzoic acid and combination of benzoic acid with a probiotic containing *Bacillus Cereus* var. *toyoi* in weaned pig nutrition. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 14, n. 1, p. 117-125, 2011.

PARTANEN, K.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 12, p. 117-145, 1999.

PEKAS, J. C. Morphometry of the intestine of the pig. II. Circumsection response to feeding schedules. **Digestive Diseases and Sciences**, Heidelberg, v. 31, p. 90-96, 1986.

PLAYNE, M. J. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic acid, and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 36, p. 638-644, 1985.

PLUSKE, J. R.; WILLIAMS, I. H.; AHERNE, F. X. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. **Animal Science**, Penicuik, v. 62, p. 131-144, 1996a.

PLUSKE, J. R.; WILLIAMS, I. H.; AHERNE, F. X. Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cow's milk after weaning. **Animal Science**, Penicuik, v. 62, p. 145-158, 1996b.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 7, p. 25-33, 1998.

SAKATA, T. et al. Effect of n-butyric acid on epithelial-cell proliferation of pig colonic mucosa in short-term culture. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Göttingen, v. 102, n. 4, p. 163-164, 1995.

SAS INSTITUTE INC. **SAS user's guide**: statistics. Cary, 2009. (Version 9.3).

SHORTER, R. G. (Ed.). **The large intestine, physiology, pathophysiology and disease**. New York: Raven, 1991. p. 51-92.

TEIXEIRA, A. O. et al. Efeito de dietas simples e complexas sobre a morfo-fisiologia gastrintestinal de leitões até 35 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 4, p. 926 – 934, 2003.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 14, p. 207–227, 2001.