



**LETICIA MENDONÇA RODRIGUES**

**ÁCIDO BENZOICO E ÓLEOS ESSENCIAIS EM  
RAÇÕES DE LEITÕES DESAFIADOS  
COM *E. coli* K88<sup>+</sup>**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**LETICIA MENDONÇA RODRIGUES**

**ÁCIDO BENZOICO E ÓLEOS ESSENCIAIS EM RAÇÕES DE LEITÕES  
DESAFIADOS COM *E. coli* K88<sup>+</sup>**

Dissertação 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 Não Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Vinicius de Souza Cantarelli

Coorientador

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

Coorientador

Dr. Rony Antonio Ferreira

**LAVRAS – MG  
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rodrigues, Leticia Mendonça.

Ácido benzoico e óleos essenciais em rações de leitões desafiados  
com *E. coli* K88+ / Leticia Mendonça Rodrigues. – Lavras: UFLA, 2016.  
71 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras,  
2016.

Orientador(a): Vinícius de Souza Cantarelli.

Bibliografia.

1. Desmame. 2. Aditivo. 3. Antimicrobiano. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

**LETICIA MENDONÇA RODRIGUES**

**ÁCIDO BENZOICO E ÓLEOS ESSENCIAIS EM RAÇÕES DE LEITÕES  
DESAFIADOS COM *E. coli* K88<sup>+</sup>**

Dissertação 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 não Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de julho de 2016.

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu UFLA

Dr. Rony Antonio Ferreira UFLA

Dr. Rafael Gustavo Hermes DSM

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

*À Deus por ser a luz que me guia.*

*À minha família pelo amor incondicional.*

*Aos grandes amigos que conquistei nesta caminhada.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças e discernimento nos momentos difíceis desta importante etapa.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Vinícius de Souza Cantarelli, pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho e durante minha vida acadêmica.

Aos Professores Márvio Lobão Teixeira de Abreu, Rony Antonio Ferreira e Roberto Maciel de Oliveira pela colaboração e suporte.

À AnimalNutri pelo apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Cesar Garbossa, Hebert Silveira e Letícia Amaral pela amizade e ensinamentos durante esse trabalho e minha vida acadêmica.

À Empresa DSM pela oportunidade de realização deste projeto, em especial à Cláudia Silva e Rafael Hermes pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, do Centro Experimental de Suínos e do Laboratório de Pesquisa Animal por me ajudarem na condução do experimento e nas análises laboratoriais.

À minha família pelo amor e apoio incondicional.

Ao Túlio pelo companheirismo, por me dar força e atuar em todas as etapas deste trabalho.

Ao Núcleo de Estudos em Suinocultura (NESUI), pelos aprendizados e grandes experiências profissionais e pessoais. Em especial a todos os amigos que se dedicaram a esse projeto.

## RESUMO GERAL

Estudos que avaliam o modo de ação de aditivos, como o ácido benzoico e óleos essenciais, são uma busca para minimizar os desgastes das funções gastrointestinais de leitões recém-desmamados, assim como substituir os antibióticos promotores de crescimento. Objetivou-se avaliar o efeito da associação de ácido benzoico (AB) e óleos essenciais (OE) sobre o desempenho e saúde intestinal de leitões recém-desmamados, desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>. O experimento foi realizado no Centro Experimental de Suínos, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram utilizados 270 leitões, desmamados aos 21 dias de idade e com peso inicial de  $5,76 \pm 0,52$  kg, em um delineamento experimental em blocos casualizados com seis tratamentos: 1) Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); 2) Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); 3) Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); 4) Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); 5) Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); 6) Controle negativo + 4g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4), distribuídos em nove repetições e cinco leitões por parcela experimental. No sétimo e oitavo dia de experimento, todos os animais foram desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> (1 ml a cada dia,  $10^6$  UFC/ml). Os animais foram pesados ao início, aos 14, 21, 28 e 42 dias de experimento para avaliação do desempenho e duas vezes ao dia foi realizada a avaliação do escore fecal para determinar a incidência de diarreia. Quatro dias após a inoculação, foram coletadas amostras de fezes para análise microbiológica. Foi realizado o abate de um animal por parcela, quatorze dias após a inoculação, para as avaliações do pH, produção de ácidos graxos voláteis, população microbiana, morfologia intestinal, contagem de colecistoquinina e de células em proliferação e pesagem de órgãos. O experimento teve duração de 42 dias e ao final foi realizada a avaliação de viabilidade econômica. A associação de AB e OE na inclusão 3g/kg resultou em melhor desempenho nas duas primeiras semanas de creche comparado ao CN. No período total, o ácido benzoico e as associações nas inclusões 3g/kg e 4g/kg foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao CP e superiores ( $P < 0,05$ ) ao CN para os resultados de ganho de peso diário e peso final. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) sobre a incidência de diarreia, população microbiana, produção de ácidos graxos voláteis, pH, peso de órgãos, proliferação celular e contagem de colecistoquinina. O CN e AB+OE4 apresentaram maior altura de vilosidade ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo AB+OE3. A renda líquida foi superior ( $P < 0,05$ ) para AB, AB+OE3 e AB+OE4 em relação ao CN e semelhante ( $P > 0,05$ ) ao CP. Desta forma, a associação dos aditivos em 3g/kg de ração proporciona melhora do desempenho pós-desmame, além de ser uma alternativa economicamente viável para substituição de Colistina.

Palavras-chave: Desmame. Aditivo. Antimicrobiano.

## GENERAL ABSTRACT

Studies evaluating the additive action mechanism, such as benzoic acid and essential oils are a quest to minimize the wear of bowel function of weanling pigs, and replace antibiotic growth promoters. The object of this study was to evaluate the effect of association of benzoic acid (AB) and essential oils (OE) on the performance and intestinal health of weanling pigs challenged with *E. coli* K88<sup>+</sup>. The experiment was conducted in the Swine Experimental Centre of Department of Animal Science, at the Federal University of Lavras. 270 piglets weaned at 21 days of age, with initial weight of  $5.76 \pm 0.52$  kg, were used in a randomized blocks and distributed in six treatments: 1) Positive control receiving Colistin 40ppm (CP); 2) Negative control without additive (CN); 3) Negative control + 5g/kg of benzoic acid (AB); 4) Negative control + 2g/kg of benzoic acid and essential oils (AB+OE2); 5) Negative control + 3g/kg of benzoic acid and essential oils (AB+OE3); 6) Negative control + 4g/kg of benzoic acid and essential oils (AB+OE4). There were nine replications and five piglets per experimental plot. In the seventh and eighth day of the experiment all the animals were challenged with *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> (1 ml,  $10^6$  CFU/ml). The animals were weighed at the beginning, at 14, 21, 28 and 42 days experiment for performance evaluation. The fecal score evaluation was conducted twice a day to determine the incidence of diarrhea. Four days after challenge, stool samples were collected for microbial analysis. Fourteen days after the inoculation one animal for pen was slaughtered to evaluate pH, volatile fatty acids production, microbial population, intestinal morphology, cholecystokinin count, proliferating cells count and weight organs. The experiment lasted 42 days and at the end was evaluated the economic viability. The association of AB and OE in the 3g/kg inclusion resulted in better performance in the first two weeks compared to CN. In total period benzoic acid and associations in the 3g/kg and 4g/kg inclusions were similar ( $P > 0,05$ ) to CP and above ( $P < 0,05$ ) to CN for daily gain and final weight results. There was no difference ( $P > 0,05$ ) on the incidence of diarrhea, microbial population, volatile fatty acids production, pH, organ weights, cell proliferation count and cholecystokinin count. The CN and AB+OE4 had higher villus height ( $P < 0,05$ ) than the AB+OE3 group. The net revenue was higher ( $P < 0,05$ ) for AB, AB+OE3 and AB+OE4 than CN and was similar ( $P > 0,05$ ) CP. use of benzoic acid and associations in medium and high levels resulted in higher economic returns than the use of basal diet, enabling the inclusion of these. Thus, the combination of additives in the 3g/kg inclusions provides improved post weaning performance, and is an economically viable alternative to Colistin replacement.

Keywords: Weaning. Additive. Antimicrobial.

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO

- Tabela 1 - Composição centesimal e valores nutricionais calculados das dietas utilizadas nas diferentes fases do experimento. ....48
- Tabela 2 - Efeitos das dietas experimentais sobre o consumo de ração diário – CRD (kg), ganho de peso diário – GPD (kg), conversão alimentar – CA e peso final PF (kg) de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....55
- Tabela 3 - Efeitos das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia – ID (%) de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....58
- Tabela 4 - Efeito das dietas experimentais sobre a concentração microbiana (UFC/g) e relação entre bactérias, nas fezes coletadas pré-abate e no conteúdo cecal coletado pós-abate de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....59
- Tabela 5 - Efeitos das dietas experimentais sobre a produção de ácidos graxos voláteis (mMol/g) no ceco de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....60
- Tabela 6 - Efeitos das dietas experimentais sobre o pH de segmentos do trato gastrointestinal de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....61
- Tabela 7 - Efeito das dietas experimentais sobre a altura de vilosidade – AV (µm), profundidade de cripta – PC (µm) e relação altura de vilosidade/profundidade de cripta – AV:PC de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....63
- Tabela 8 - Efeitos das dietas experimentais sobre o peso relativo de órgãos de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....64
- Tabela 9 - Efeitos dos tratamentos sobre a receita bruta da venda de leitões – RBVL (U\$), custo bruto da ração – CBR (U\$), outros custos de produção – OCP (U\$), receita líquida – RL (U\$), retorno ao investimento – ROI (%) e custo por quilo de leitão (U\$) em uma avaliação econômica de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> .....65

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Características do leitão recém-desmamado</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>A microbiota intestinal e fatores de virulência da <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Os ácidos orgânicos em rações de suínos</b> .....	16
<b>2.4</b>	<b>O modo de ação dos ácidos orgânicos</b> .....	18
<b>2.4.1</b>	<b>Ação dos ácidos orgânicos sobre o pH</b> .....	18
<b>2.4.2</b>	<b>Ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos</b> .....	19
<b>2.4.3</b>	<b>Ação dos ácidos orgânicos sobre a atividade enzimática e estimulação de secreções</b> .....	20
<b>2.4.4</b>	<b>Ação dos ácidos orgânicos sobre a mucosa intestinal</b> .....	21
<b>2.5</b>	<b>A utilização do ácido benzoico</b> .....	22
<b>2.6</b>	<b>Os óleos essenciais em rações de suínos</b> .....	24
<b>2.7</b>	<b>O modo de ação dos óleos essenciais</b> .....	26
<b>2.7.1</b>	<b>Ação antimicrobiana dos óleos essenciais</b> .....	26
<b>2.7.2</b>	<b>Ação antioxidante dos óleos essenciais</b> .....	28
<b>2.7.3</b>	<b>Efeito dos óleos essenciais sobre secreções e atividades enzimáticas</b> .....	29
<b>2.7.4</b>	<b>Efeito dos óleos essenciais sobre a manutenção do epitélio intestinal</b> .....	30
<b>2.8</b>	<b>A associação de ácido benzoico e óleos essenciais</b> .....	30
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	33
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	42
	<b>ARTIGO Ácido benzoico e óleos essenciais em rações de leitões desafiados com <i>E. coli</i> K88<sup>+</sup></b> .....	42

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

A fase pós-desmame é um período crítico da vida do leitão, pois passam por importantes transformações ambientais, sociais e nutricionais. Nesse momento, o trato gastrointestinal aumenta rapidamente de tamanho e altera suas funções digestivas. São desencadeadas as alterações das funções imunológicas, a diminuição das funções de barreira da mucosa intestinal e o aumento da susceptibilidade a agentes infecciosos, que geram sinais clínicos visíveis como a diarreia e redução no consumo de ração.

Para minimizar a alta incidência de diarreia e a queda no desempenho dos leitões que ocorrem nesse período, por muitos anos foram utilizados antibióticos promotores de crescimento. Porém, sua utilização tem sido questionada devido ao uso indiscriminado na produção animal. Estudos atuais descrevem a resistência de bactérias ao antibiótico colistina, tanto em suínos quanto em humanos, dando fundamento aos receios do surgimento de cepas de patógenos resistentes a antibióticos e da ocorrência de resíduos nos produtos de origem animal.

Sendo assim, uma possível alternativa para a substituição de antibióticos são os ácidos orgânicos, aditivos de poder acidificante e ação antimicrobiana, que possuem efeitos benéficos sobre o desempenho dos leitões. Entre esses ácidos, o ácido benzoico tem se destacado devido à sua capacidade de penetrar na membrana celular de bactérias patogênicas, e diminuir suas funções vitais, mantendo o equilíbrio da microbiota e melhorando a saúde intestinal. Outro aditivo que vem sendo avaliado são os óleos essenciais, compostos voláteis extraídos de diferentes plantas. Muitos de seus componentes conferem a eles alta ação antimicrobiana e antioxidante.

Diante destas características, surge a possibilidade de potencialização do modo de ação do ácido benzoico e óleos essenciais quando utilizados em conjunto.

O objetivo deste estudo é investigar os efeitos da associação do ácido benzoico e óleos essenciais, em diferentes concentrações, sobre o desempenho e a saúde intestinal de leitões recém-desmamados, desafiados com *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Características do leitão recém-desmamado**

O desmame precoce é um momento complexo do sistema de produção de suínos. A separação da fêmea, mudança de instalações e da temperatura do ambiente, interrupção da ingestão do leite materno e início da dieta sólida, são fatores altamente estressantes. Acentuados pelo perfil fisiológico limitado do trato gastrointestinal nesse momento e pela imaturidade do sistema imune, esses fatores estressantes geram como consequência a queda no consumo de ração e perda da eficiência produtiva (LANGE et al., 2010).

O conhecimento de algumas funções fisiológicas do trato gastrointestinal e das alterações ocorridas ao desmame são de grande importância para buscar alternativas que realmente minimizem as debilitações dos leitões.

O estômago tem como funções a mistura e digestão parcial dos nutrientes, além de servir como barreira contra o ambiente externo. Nele, a pepsina é secretada pela enzima precursora pepsinogênio, em condições de baixo pH, de 2,0 a 3,5. Essa condição é alcançada devido à produção de ácido clorídrico (HCl) pelas células parietais do estômago quando estimuladas pela ingestão de nutrientes (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015).

Em leitões recém-desmamados o consumo de ração é muito baixo, o que resulta em baixa produção de HCl. O animal diminuiu a produção de ácido láctico que haveria a partir da fermentação bacteriana da lactose do leite. Ocorre a elevação do pH, diminuição da hidrólise de proteínas e aumento da sobrevivência e colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (CANIBE et al., 2001).

Alterações pós-desmame também ocorrem na estrutura e função do intestino delgado. O epitélio da mucosa intestinal é a primeira barreira que previne a entrada de agentes patogênicos e possui estruturas intercelulares organizadas que mantêm sua integridade. O epitélio se projeta para dentro do lúmen formando vilosidades, que ajudam a aumentar a área de superfície de contato, e na base dessas vilosidades, encontram-se glândulas tubulares chamadas criptas que são responsáveis pela sua repopulação celular (YANG et al., 2016).

A renovação total do epitélio de leitões ocorre de forma rápida, a cada 3 ou 4 dias, exigindo alto fornecimento de energia (DANIEL et al., 2014). Devido à queda do consumo de ração após o desmame, é iniciada a atrofia das vilosidades, o que exige rápida resposta das criptas para manutenção da integridade da mucosa. Segundo Le Dividich e Seve (2000), os requisitos de energia para manutenção só são satisfeitos três dias após o desmame, e o leitão leva de oito a quatorze dias para recuperar seu nível de ingestão de energia pré-desmame. A taxa de renovação acelerada resulta em vilosidades com células imaturas e de atividade enzimática reduzida (PLUSKE; WILLIAMS; AHERNE, 1996). Além disso, o desmame aumenta o índice mitótico das criptas do intestino grosso (CASTILLO et al., 2007), provocando a redução na capacidade de absorção de fluidos e eletrólitos.

Neste momento, as desordens do trato gastrointestinal têm como uma importante consequência a mudança adaptativa da microbiota entérica (KONSTANTINOV et al., 2004). Esta população microbiana é caracterizada por milhões de bactérias comensais e patogênicas, sendo fundamental que ela esteja em equilíbrio ou que o animal tenha uma defesa intestinal preparada. Mas, após o desmame, visto o alto gasto energético para manutenção da mucosa, o baixo consumo e a imunidade ativa pouco eficiente, ocorre um aumento da proliferação de bactérias patogênicas, desencadeando a diarreia em leitões.

A diarreia pós-desmame é, portanto, uma doença multifatorial, caracterizada por fezes aquosas, principalmente nas duas primeiras semanas de creche, causando morbidade ou mortalidade (PLUSKE, 2013).

Sendo assim, todas essas alterações são determinantes para que a fase de creche seja um grande desafio da suinocultura. São buscadas estratégias nutricionais que reforcem a função de barreira na mucosa intestinal, que melhorem a digestibilidade da ração e que apresentem efeitos tróficos sobre o intestino, a fim de melhorar a saúde entérica e o desempenho dos leitões nesse momento.

## **2.2 A microbiota intestinal e fatores de virulência da *Escherichia coli* enterotoxigênica**

O estabelecimento da microbiota intestinal dos suínos é influenciado por vários fatores, tais como: o pH, a disponibilidade de substratos, a secreção de muco, o peristaltismo e o trânsito do alimento no TGI (HAO; LEE, 2004). Todos esses fatores são altamente inconstantes em leitões recém-desmamados, o que faz com que o perfil de sua microbiota se altere nesse momento.

Na colonização pré-desmame, as bactérias classificadas comensais, como *Lactobacillus* spp., são dominantes no estômago devido à capacidade de tolerarem ambientes de baixo pH (JENSEN et al., 2001). Na porção intermediária do TGI, as bactérias apresentam-se em menores quantidades devido ao menor tempo de trânsito da digesta, o que evita sua aderência e proliferação na mucosa (HAO; LEE, 2004). E no intestino grosso está a maior variedade bacteriana, predominando as anaeróbias como *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* e *Clostridium*, devido ao maior tempo de trânsito da digesta (PLUSKE, 2002).

Porém, o perfil da microbiota é restabelecido após o desmame, em consequência às alterações ocorridas ao leitão, principalmente a composição da dieta e elevação do pH gástrico. Neste momento diminui a quantidade de bactérias comensais, enquanto bactérias potencialmente patogênicas aumentam, como a *Escherichia coli* (YIN; ZHENG, 2005).

Entre as bactérias potencialmente patogênicas, a espécie *Escherichia coli*, do gênero *Escherichia*, se destaca como um dos habitantes mais comuns do trato gastrointestinal. Ela pertence à ordem das *Enterobacteriales*, juntamente com gêneros importantes como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. A patogenicidade da *E. coli* é dependente dos fatores de virulência que sua cepa expressar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os leitões adquirem esta bactéria geralmente por via fecal-oral e, para causar a doença, a *E. coli* precisa ser resistente ao peristaltismo e se aderir ao epitélio intestinal. Para esta adesão, ela apresenta fimbrias, estruturas proteicas de superfície, que possuem uma subunidade adesiva (lectina) e interagem com receptores como manose, galactose ou glicoproteínas, presentes no glicocálice das células intestinais (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

Um dos principais agentes infecciosos causadores de diarreia em leitões é a *Escherichia coli* do tipo enterotoxigênica (ETEC) (HEO et al., 2013). As principais fimbrias presentes nas ETEC de suínos são a F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F7 (F41) e F18 (KIM et al., 2010).

Após a adesão, as bactérias ETEC se multiplicam e produzem enterotoxinas. Essas enterotoxinas atuam nos processos hormonais que mediam o transporte de líquidos e eletrólitos entre as células epiteliais e a luz intestinal, aumentando a fluidez no lúmen e diminuindo a capacidade de reabsorção pelo intestino grosso. Os distúrbios gastrointestinais causados aos animais são coletivamente chamados gastroenterites por *E. coli*. Existem dois tipos de enterotoxinas que se destacam como causadoras de diarreia em leitões

desmamados e são classificadas de acordo com a estabilidade térmica, sendo as termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). As enterotoxinas LT são inativadas a 60°C por 15 minutos e as ST resistem a 100°C por 15 minutos (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

Na creche, os leitões podem apresentar sinais clínicos da diarreia por *Escherichia coli* ETEC dentro de três a cinco dias pós-desmame, sendo a diarreia de consistência que varia de pastosa a líquida, de coloração amarelada ou acinzentada. Os animais podem apresentar forte desidratação e apatia, podem ocorrer sinais como falta de coordenação motora e as extremidades do focinho, orelha e abdômen podem estar cianóticas (FAIRBROTHER; GYLES, 2006).

Uma dos sorotipos de *E. coli* ETEC mais frequentemente causadores de diarreia pós-desmame é a *E. coli* K88<sup>+</sup> (KIM et al., 2010) e tem sido muito utilizada para realizar desafio oral em leitões como forma de avaliar a capacidade dos aditivos em reduzir a infecção ou modular a microbiota intestinal. O desafio em condições experimentais é realizado para aproximar a resposta à realidade de um ambiente comercial.

### **2.3 Os ácidos orgânicos em rações de suínos**

Diante das especulações sobre a proibição de antibióticos promotores de crescimento e da busca por aditivos que os substituíssem com satisfação, estudos foram direcionados para avaliar a aplicação de ácidos orgânicos na dieta de suínos e minimizar os problemas existentes na fase pós-desmame. Esse aditivo tem gerado bons resultados e despertado nos nutricionistas o interesse de aprimorar cada vez mais esta intervenção.

Os ácidos orgânicos são compostos caracterizados pela presença do grupamento carboxílico (-COOH). Foram inicialmente estudados como substância para preservação da integridade de grãos armazenados, pois sua

capacidade de reduzir o pH inibe o crescimento de fungos e bactérias (PARTANEN; MROZ, 1999).

Os ácidos orgânicos mais utilizados na nutrição animal, como aditivos melhoradores de desempenho, são os ácidos de cadeia curta, que contém até sete carbonos. São eles os ácidos: benzoico, fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico e sórbico (PARTANEN et al., 2002). Eles são constituintes de plantas ou tecidos animais ou podem ser obtidos por meio de processos fermentativos. Em suínos, alguns são produtos da fermentação microbiana, principalmente no intestino grosso (DIBNER; BUTTIN, 2002).

Na sua forma livre podem ser altamente voláteis e corrosivos, o que dificulta sua manipulação e pode interferir na palatabilidade da ração (PARTANEN; MROZ, 1999). Exemplos de formas líquidas são os ácidos: fórmico, propiônico, láctico, acético e butírico (MROZ, 2005). Entretanto, em menores concentrações podem diminuir este efeito.

Podem ser encontrados na natureza em forma de sais, que são compostos resultantes da associação de formas aniônicas dos ácidos orgânicos ( $\text{RCOO}^-$ ) com cátions, normalmente metálicos. Na forma de sais eles são sólidos, menos voláteis, apresentam menos odores indesejáveis e maior facilidade de utilização em fábricas de ração (CANIBE et al., 2001). Como exemplos de sais estão o acetato de sódio, formiato de amônio, benzoato de cálcio e benzoato de potássio.

Contudo, a ação acidificante dos ácidos orgânicos ocorre através da redução do pH em forma dissociada, e sua ação bactericida ou bacteriostática por ser resultado desta acidificação ou através de sua difusão pela membrana celular bacteriana em sua forma não-dissociada. A eficiência do ácido dependerá do seu tempo de exposição, sua concentração, do tipo de ácido, a composição da dieta basal e da idade do animal (COSTA et al., 2013). Entre os suínos é encontrada uma melhora do desempenho, atribuída ao efeito antimicrobiano e o efeito benéfico na digestibilidade e na absorção de nutrientes (FREITAS;

LOPES, 2006). Porém, a resposta à suplementação é mais pronunciada em leitões devido à fisiologia digestiva imatura desses animais (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015).

## **2.4 O modo de ação dos ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos são vistos como melhoradores de desempenho, uma vez que atuam na acidificação do meio, no aumento da digestibilidade de nutrientes, na modulação da microbiota intestinal, na redução da competição por nutrientes com bactérias patogênicas e na manutenção da integridade intestinal. Porém, o modo de ação desse aditivo é específico para cada tipo de ácido.

### **2.4.1 Ação dos ácidos orgânicos sobre o pH**

Alguns ácidos orgânicos possuem ação sobre o pH do trato gastrointestinal, atuando principalmente frente à dificuldade dos leitões recém-desmamados em manter o pH em valores baixos no estômago. O ácido orgânico se dissocia em meio aquoso, liberando íon  $H^+$  e acidificando o meio. Esse efeito se dá devido à constante de ionização (pKa) do ácido, que é o pH em que 50% do ácido está dissociado (CANIBE et al., 2001). Portanto, quanto menor o valor de pKa maior o seu poder de dissociação.

A redução do pH do estômago pode resultar em maior atividade da enzima pepsina (DESAI; RANADE, 2007). Essa ação é importante, visto a baixa secreção endógena de HCl e redução na produção de ácido lático no momento do desmame.

Outro fator determinante no pH do conteúdo gástrico, é o poder tamponante da dieta, que é capacidade de resistir a alterações de pH (VIOLA; VIEIRA, 2003). Dietas com alto poder tamponante, como ricas em fontes

minerais, resistem à acidificação estomacal e reduzem a digestibilidade ileal aparente da proteína bruta e dos aminoácidos dietéticos (BLANK et al., 1999). Os ácidos orgânicos se destacam, então, como uma alternativa para a redução do pH da dieta, melhorando a digestibilidade, conseqüentemente aumentando o tempo de retenção gástrica, gerando melhor hidrólise das proteínas, absorção e retenção de aminoácidos, principalmente em leitões desmamados (GABERT; SAUER, 1995).

#### **2.4.2 Ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos**

Nas primeiras semanas pós-desmame, a elevação do pH estomacal favorece a proliferação e adesão de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, no trato gastrointestinal (BLANCHARD, 2000). Sendo assim, ao proporcionar uma acidificação do meio em sua forma dissociada, os ácidos orgânicos auxiliam no controle microbiano, mantendo o equilíbrio. Condições ácidas no estômago favorecem a proliferação de bactérias benéficas como *Lactobacillus*, que inibem a colonização de *E. coli* por bloquear sítios de adesão (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015).

Outra atuação dos ácidos orgânicos sobre a microbiota intestinal é quando este se encontra em sua forma não dissociada. Nesta forma, os ácidos orgânicos, que são lipofílicos, podem se difundir através da membrana semipermeável de bactérias. Sua dissociação em cátions e ânions ocorrerá dentro da bactéria, onde o pH é próximo do neutro. O microrganismo inicia uma tentativa de restabelecer a homeostase, realizando a retirada de prótons ( $H^+$ ) através da bomba  $Na^+/K^+$ . Esse é um processo ativo que promove o esgotamento da bactéria, diminuindo a energia destinada à produção de toxinas e comprometendo os processos vitais, podendo causar até mesmo a morte dessas bactérias (VIOLA; VIEIRA, 2003).

Os ácidos orgânicos atuam tanto no controle de bactérias gram-positivas quanto negativas sendo que, as bactérias gram-negativas, são mais sensíveis aos ácidos com menos de oito átomos de carbono e, as bactérias gram-positivas, são mais sensíveis a ácidos orgânicos de cadeia longa (PARTANEN, 2001). É importante atentar para as concentrações mínimas inibitórias que são específicas para cada ácido (STRAUSS; HAYLER, 2001).

Portanto, ao permitir maior controle da população bacteriana no trato gastrointestinal, os ácidos orgânicos aumentam a disponibilidade de nutrientes, principalmente aminoácidos (ØVERLAND et al., 2000).

#### **2.4.3 Ação dos ácidos orgânicos sobre a atividade enzimática e estimulação de secreções**

A ação dos ácidos orgânicos sobre a atividade enzimática e estimulação de secreções, está relacionada à redução do pH do trato gastrointestinal. No estômago, o ácido clorídrico tem capacidade de reduzir o pH para aproximadamente 1,3 e o ácido láctico para 3,8, resultando em um ambiente favorável para que haja um aumento de níveis séricos de secretina. Porém, com o aumento do pH após o desmame, ocorre a redução da secretina e do estímulo que ela oferece sobre as secreções pancreáticas e biliares (HARADA et al., 1988). Desta forma, a redução do pH estomacal estabelecida pela suplementação com ácidos orgânicos é interessante como estímulo para a produção de secreções.

A acidificação favorece também a ação da pepsina, e os produtos resultantes da digestão proteica estimularão a secreção de enzimas pancreáticas e a secreção biliar, podendo resultar em melhora na digestibilidade das dietas (PARTANEN, 2001).

Como resultado da acidificação e da presença de nutrientes ingeridos, a secreção do hormônio colecistoquinina (CCK) também pode ser estimulada. A CCK é um hormônio produzido por células I do duodeno, na região proximal do estômago, secretada mais facilmente em ambientes ácidos (STEINERT et al., 2013). É importante para a digestão e apresenta papel chave na regulação das respostas intestinais. É capaz de promover a constrição do esfíncter pilórico, retardando o esvaziamento gástrico, e é o principal estímulo para a liberação de enzimas pancreáticas e bile no intestino delgado (SAM et al., 2012). Juntas, essas ações podem otimizar a digestão e absorção dos nutrientes.

#### **2.4.4 Ação dos ácidos orgânicos sobre a mucosa intestinal**

As alterações morfológicas, desencadeadas pelo período de transição pós-desmame, é resultado do balanço entre a atividade mitótica das células da cripta e o processo de descamação e desgaste das vilosidades (MANZANILLA et al., 2004). A descamação epitelial pode ser consequência tanto da alteração por uma dieta sólida, com ingredientes pouco digestíveis aos leitões, quanto pela alta incidência de bactérias patogênicas produtoras de toxinas que se aderem à mucosa. A atrofia das vilosidades é potencializada pelo baixo consumo de ração, que gera baixa quantidade de nutrientes destinados à manutenção dos enterócitos, diminuindo a taxa de proliferação celular que renovaria as vilosidades do leitão (DONG; PLUSKE, 2007).

Ao garantir o equilíbrio da microbiota intestinal, os ácidos orgânicos influenciam, também, na morfologia intestinal. Eles agem sobre o perfil das bactérias no intestino grosso, aumentando a síntese de ácidos graxos voláteis que é importante como fonte de energia para as células epiteliais, garantindo, conseqüentemente, a manutenção da integridade da mucosa intestinal (ROSELLI et al., 2005).

O ácido acético é eventualmente oxidado na presença de glicose para produção de energia. O ácido butírico é um precursor importante de corpos cetônicos, além de ser fonte de energia preferencial dos enterócitos (VIEIRA et al., 2005). Desta forma podem favorecer a manutenção da integridade e altura das vilosidades. Os ácidos acético, propiônico e butírico têm ação trófica sobre a estrutura do intestino, podendo aumentar o tamanho dos vilos e sua superfície de absorção (LEESON et al., 2005).

Além disso, a diminuição dos níveis de bactérias patogênicas, como *E. coli* (GUGGENBUHL et al., 2007), significam menor aderência no epitélio, menor produção de toxinas e menor desgaste das vilosidades.

## **2.5 A utilização do ácido benzoico**

Dentro desse grupo dos ácidos orgânicos carboxílicos, o ácido benzoico se destaca como o mais simples ácido carboxílico aromático ( $C_6H_5C(O)OH$ ).

Ele possui uma constante de dissociação relativamente alta ( $pK_a = 4,21$ ), sendo considerado um ácido fraco, de baixa solubilidade e sendo encontrado no estômago na forma não dissociada. Essa condição permite que o ácido benzoico possa passivamente se difundir através da membrana celular da bactéria e, sendo o meio interno desta caracterizado por um pH maior que o  $pK_a$  do ácido, ele se dissocia. Com isso, a bactéria sofre uma diminuição em seu pH interno, necessitando ativar um mecanismo de resistência que reage a esse tipo de estresse celular. Os prótons serão bombeados para fora da bactéria pela bomba  $Na^+/K^+$  e os ânions irão se acumular na célula, modificar a pressão osmótica interna e se tornarem tóxicos para a bactéria. Além disso, o processo pode provocar a morte bacteriana por exaustão pelo excesso da ativação da bomba  $Na^+/K^+$  na tentativa de controlar o pH interno (LUCKSTADT; MELLOR, 2010).

O ácido benzoico e o benzoato de sódio são comumente utilizados como preservantes na indústria de alimentos. Na forma não dissociada, o benzoato de sódio passa facilmente pela parede celular de fungos, liberando prótons que acidificam o meio (KUNG; STOKES; LIN, 2003). Inibir o desenvolvimento de fungos é uma forma de potencializar a disponibilidade de nutrientes na ração.

O ácido benzoico se destaca também entre os acidificantes utilizados no controle de infecções causadas por microrganismos do trato urinário de fêmeas suínas. Segundo Mroz (2005), o ácido benzoico aumenta a digestibilidade de aminoácidos e nitrogênio, aumenta a acidez urinária e reduz a emissão de amônia pelos dejetos. Como a principal via de excreção do ácido benzoico é a urinária, ele promove a diminuição da proliferação bacteriana na bexiga.

O ácido benzoico tem demonstrado também, uma vasta gama de resultados na melhoria de desempenho, controle da microbiota intestinal, melhoria da morfologia intestinal e digestibilidade de nutrientes (ALVARADO et al., 2013; DIAO et al., 2013, 2016; GHELER et al., 2009; GRÄBER et al., 2012; PAPATSIROS et al., 2011).

Segundo Torrallardona, Badiola e Broz (2007), a adição de ácido benzoico a 0,5% na dieta de leitões desmamados, aumentou o consumo de ração e o ganho de peso dos animais, além de observar um maior grau de biodiversidade da microbiota gastrointestinal, que pode ser associado à microbiota saudável. Guggenbuhl et al. (2007) também observaram que o nível de 0,05% de ácido benzoico melhorou o desempenho zootécnico de leitões desmamados, destacando, além disso, um aumento da digestibilidade ileal total de energia e nitrogênio e uma redução da quantidade de *E.coli* no ceco dos leitões.

Ao avaliar diferentes níveis de ácido benzoico na dieta de leitões, Silveira (2014) conclui que os animais suplementados com 0,75% do aditivo apresentam melhores resultados para desempenho na fase de creche, tendo seus

efeitos estendidos até a terminação. Esse efeito positivo ocorreu devido à melhoria de parâmetros morfológicos do íleo e do cólon e à redução da incidência de diarreia nos leitões na fase de creche.

Considerando que o jejuno é o tecido fundamental para a digestão, absorção e transporte de nutrientes, é muito importante que sua estrutura seja íntegra. Diao et al. (2016) destacam que a inclusão de ácido benzoico (0,5%) resultou em diminuição da profundidade de cripta e aumento da relação vilosidade/cripta, em jejuno de leitões jovens. Além disso, aumentou a digestibilidade de nutrientes e o desempenho dos animais.

Sendo assim, o ácido benzoico é um eficiente aditivo para se utilizar no momento pós-desmame. O controle de bactérias patogênicas, melhoria das características morfofisiológicas do epitélio intestinal e melhoria da digestibilidade dos nutrientes, são os principais resultados da inclusão desse ácido, que permite o maior crescimento dos leitões.

## **2.6 Os óleos essenciais em rações de suínos**

Com o grande interesse em desenvolver estratégias que melhorem o desempenho dos leitões desmamados e reduzam a utilização de antibióticos nas rações, os pesquisadores também encontraram nos óleos essenciais componentes benéficos para a saúde intestinal desses animais.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas. Esses compostos são lipofílicos e altamente voláteis, formados em células ou grupos de células encontradas em diversas partes da planta como: folhas, caules, flores, frutos e raízes. São comumente isolados das plantas por processo de destilação a vapor, e suas ações biológicas possibilitam a utilização em áreas medicinais, de higiene, perfumaria e cosméticos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Esses compostos funcionam como um mecanismo de defesa da planta contra estresse fisiológico por falta de água, alterações no clima, proteção contra patógenos, dentre outros. Assim, a composição dos constituintes metabólicos varia de acordo com o tipo de planta, tipo de solo, condições climáticas durante seu desenvolvimento, método de extração e tempo de colheita (TUREK; STINTZING, 2013).

Os componentes pertencem a dois grupos de origem biossintéticas distintas; o principal, composto por terpenos e terpenóides, e o grupo de menor frequência dos compostos aromáticos. Nestes grupos, consistem, por exemplo, os álcoois, éteres, ésteres, aldeídos e fenóis (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006).

Podem ser constituídos por misturas variáveis de 20 a 60 componentes em concentrações distintas, sendo caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações elevadas (BAKKALI et al., 2008). Esses componentes majoritários são isolados e amplamente avaliados. Portanto, os óleos essenciais de uma planta possuem um princípio ativo que corresponde ao composto presente em maior quantidade em sua composição.

Como exemplo, o orégano (*Origanumacutidens*) apresenta efeitos antioxidantes e antimicrobianos atribuídos ao carvacrol (30%) e timol (23%), que são seus dois principais fenóis (BAKKALI et al., 2008). Outro exemplo é o óleo de tomilho (*Thymusvulgaris*), que possui em grande quantidade o timol, carvacrol, p-cimene e  $\gamma$ -terpeno, dando a ele ótima atividade antioxidante (DANDLEN et al., 2010), prevenindo a peroxidação lipídica. O cinamaldeído, encontrado na canela em 90%, e o eugenol, encontrado no cravo em 80% também são bastante estudados (KAMEL, 2000).

Apesar do efeito principal do óleo ser de responsabilidade de seu princípio ativo primário, acredita-se que os princípios secundários atuam como seus potencializadores, ocorrendo um efeito sinérgico (KAMEL, 2000). Sendo

assim, os óleos essenciais podem ter maior ação do que uma mistura que contenha apenas seus principais compostos.

Em revisão, Franz, Baser e Windisch (2010) reportaram que a melhoria média de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar em leitões, induzida por óleos essenciais foi de 2,0, 0,9 e 3,0%, respectivamente. Li et al. (2012), além de observarem melhora no desempenho de leitões, concluíram em seu estudo que, o ganho de peso, conversão alimentar e consistência fecal foram semelhantes aos dos animais que receberam antibiótico. Os óleos essenciais também são reivindicados, pois alguns componentes podem melhorar o sabor e palatabilidade da ração, aumentando o consumo voluntário (ZENG et al., 2015).

## **2.7 O modo de ação dos óleos essenciais**

Diante de tantas variações e interações dos diferentes óleos essenciais, conhecer o modo de ação e entender o efeito deste aditivo sobre o desempenho, desenvolvimento e saúde da mucosa intestinal de leitões é muito importante.

### **2.7.1 Ação antimicrobiana dos óleos essenciais**

Um dos efeitos mais evidentes dos óleos essenciais é sua atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais apresentam característica lipofílica e baixo peso molecular, o que os permite atravessar a membrana plasmática das bactérias, liberar íons ( $H^+$ ) e despolarizar a célula. Ocorre um colapso da bomba de prótons e alto gasto de energia. Os danos na parede celular e membrana plasmática podem resultar em lise e fuga de macromoléculas (LAMBERT et al., 2001; OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006). A diminuição de energia para a produção de toxinas, podem também prejudicar o desenvolvimento dessa bactéria e, conseqüentemente, diminuir sua patogenicidade e a ocorrência de

diarreia em leitões (BAKKALI et al., 2008). A maioria dos estudos que investigam essa ação, concorda que, em geral, ela é mais forte contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas.

Sendo assim, Namkung et al. (2004) encontraram evidências de que os óleos essenciais alteram a microbiota de leitões desmamados de uma forma diferente dos antibióticos. A contagem de lactobacilos e coliformes fecais nas fezes dos animais que receberam antibiótico, foi menor que a do grupo controle, enquanto que os animais que receberam os óleos essenciais apresentaram diminuição apenas na contagem de coliformes. Isso indica que esses extratos selecionaram apenas microrganismos benéficos.

Além dessa seleção de bactérias no trato digestório, os óleos essenciais podem, também, modular a produção de substâncias potencialmente tóxicas ao hospedeiro. Ushida, Maekawa e Arakawa (2002) observaram que a adição de extratos de *Mentheperitta*, *Perillafrutenscens* e *Ajugadecumbens* resultou em uma diminuição da produção de sulfito de hidrogênio, metanetiol e amônia, compostos voláteis de enxofre, no ceco de suínos. Não foi observada queda na quantidade de ácidos graxos de cadeia curta. Como também não foi observada diminuição na quantidade de bactérias produtoras de compostos voláteis de enxofre. Pôde-se concluir que a ação dos óleos essenciais causou alteração no metabolismo bacteriano.

Dessa forma, cada vez mais estudos buscam esclarecer essa ação antimicrobiana desse aditivo.

Li et al. (2012) também avaliaram a possibilidade de modulação da microbiota de leitões desmamados aos vinte e oito dias, realizando a suplementação desses com um produto comercial de óleo essencial, cujos compostos ativos eram o timol e o cinamaldeído. Puderam observar uma redução acentuada da contagem de *E. coli* e um aumento da contagem de *Lactobacillus*, indicando essa modulação. Sendo assim, os animais apresentaram

queda da incidência de diarreia, aumento do consumo de ração e melhora na conversão alimentar.

Com a melhora da saúde intestinal, pode ser promovida uma maior disponibilidade de nutrientes essenciais para a absorção e uma melhora do desempenho do animal.

### **2.7.2 Ação antioxidante dos óleos essenciais**

A utilização de antioxidantes é muito importante para a proteção de alimentos contra a degradação oxidativa por radicais livres, mantendo sua vida útil. Para isso, antioxidantes sintéticos são utilizados para o processamento industrial, como o hidroxitolueno butilado (BHT); porém, essa alternativa tem sido, há tempos, questionada devido à suspeita de efeito carcinogênico desses compostos sintéticos (REISHE; LILLARD; EITENMILLER, 1998). Sendo assim, antioxidantes de origem vegetal têm sido avaliados e as propriedades antioxidantes de plantas aromáticas têm despertado interesse, por se mostrar eficaz no retardamento do processo de peroxidação lipídica.

Segundo Brenes e Roura (2010), a atividade antioxidante se dá devido à estrutura química dos compostos fenólicos existentes nas plantas. Os grupos fenólicos (OH) atuam como doadores de hidrogênio para os radicais peróxidos, produzidos durante o primeiro passo da oxidação de lipídeos, e neutralizam esses radicais impedindo a prorrogação desse processo.

Porém, alguns compostos, como eugenol, carvacrol e timol, garantem aroma acentuado aos óleos essenciais, limitando sua utilização em grandes quantidades e em certos alimentos (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED, 1997). A partir desta questão, pesquisas avaliam possível efeito antioxidante em produtos como a carne, quando ocorre suplementação de óleos essenciais

diretamente na dieta dos animais, ao invés de ser realizada no produto final (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Botsoglou et al. (2002) constataram que a suplementação na dieta de frangos com óleo essencial de orégano melhorou a estabilidade oxidativa da carne. Foi constatado semelhante efeito na carne de coelho (BOTSOGLOU et al., 2004). Em suínos, Janz et al. (2007) observaram redução da oxidação de lipídios em tratamentos que incluíam orégano e alho.

### **2.7.3 Efeito dos óleos essenciais sobre secreções e atividades enzimáticas**

Outra importante ação dos óleos essenciais, alvo de pesquisas, é a capacidade de estimular a produção de saliva, suco gástrico e suco pancreático, associado à presença de taninos ou substâncias pungentes nos extratos vegetais (MELLOR, 2000).

Segundo Jones (2002), o aumento na produção de suco gástrico proporciona a redução do pH estomacal propiciando condições ideais para a atividade das enzimas digestivas do estômago, como a pepsina. Wang, Li e Bourne (1998) observaram que a capsaicina, um princípio ativo da pimenta, aumentou a produção de saliva e a secreção de sacarase e maltase em ratos, além da ação de cinamaldeído, princípio ativo da canela, sobre as enzimas sacarase e maltase.

O estímulo da atividade enzimática irá resultar em uma boa digestão e absorção dos nutrientes e uma modulação da microbiota intestinal, interligando também com alterações positivas na morfologia do epitélio intestinal. As atividades dos óleos essenciais se tornam, portanto, muito interessante para os pesquisadores, como alternativas para o momento do desmame de leitões.

#### **2.7.4 Efeito dos óleos essenciais sobre a manutenção do epitélio intestinal**

A ação antimicrobiana dos componentes de alguns óleos se torna favorável para a manutenção do epitélio, pois, ao reduzir a incidência de bactérias patogênicas ou ao inibi-la, conseqüentemente diminuem a produção de toxinas. Desta forma, as vilosidades comprometidas pelo estresse, pelo baixo consumo de dietas sólidas e pela insuficiência de energia, não sofrerão com um agravante gerado pelo desequilíbrio entre as bactérias comensais e patogênicas.

Ao avaliar a morfologia intestinal de leitões desmamados, desafiados experimentalmente com *E. coli* e suplementados com três produtos naturais (oleosina de pimenta, oleosina de gengibre e extrato de alho), Liu et al. (2013) puderam observar maior altura de vilosidades no jejuno e íleo.

O estímulo de óleos essenciais sobre a morfologia intestinal pode ser uma forma direta de determinar melhora sobre o desempenho e produtividade do animal.

#### **2.8 A associação de ácido benzoico e óleos essenciais**

Diante das estruturas e funcionalidades do ácido benzoico e dos óleos essenciais, alguns pesquisadores têm buscado avaliar a associação desses dois aditivos para obter resultados ainda mais interessantes sobre o desempenho e saúde intestinal de leitões recém-desmamados. Surge a possibilidade de diminuir a inclusão de cada aditivo, visto que, haverá um efeito sinérgico que potencializará os resultados.

Considerando que o ácido benzoico não-dissociado e os óleos essenciais são lipofílicos, eles atravessam facilmente a membrana celular das bactérias (SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015). Uma vez que os óleos essenciais agem sobre a parede celular da bactéria, isto a deixará mais permeável e o ácido

poderá entrar mais facilmente para realizar sua dissociação no interior da célula (VONDRUSKOVA et al., 2010).

Segundo Zhang, Rolando e Kim (2016), leitões que receberam em sua dieta a associação nas inclusões 5g/kg de ácido benzoico + 0,1g/kg de óleos essenciais, apresentaram maior ganho de peso diário e melhor eficiência alimentar na segunda semana de creche em relação a animais que receberam ração basal sem aditivo. Além disso, apresentaram maior contagem de *Lactobacillus* e menor contagem de *Escherichia coli* nas fezes em comparação ao grupo controle negativo.

Ao avaliarem uma alta inclusão de óleos essenciais, Huang et al. (2010) observaram que leitões que receberam a inclusão de 1g/kg de óleos essenciais apresentaram ganho de peso igual aos que receberam ração basal. O aumento do ganho de peso em relação ao grupo de ração basal foi observado apenas para os animais que receberam a inclusão de 1g/kg em associação a 3g/kg de ácido benzoico. Sendo assim, a associação foi mais benéfica ao desempenho que a utilização de concentrações superiores de óleos essenciais.

Diao et al. (2015) também avaliaram os aditivos, porém o ácido benzoico foi associado apenas ao componente timol. Nas duas primeiras semanas de creche, foi observado melhor conversão alimentar dos leitões que receberam 2g/kg de ácido benzoico e 0,1g/kg de timol, em relação aos que receberam ração basal. Porém, essa melhora não resultou em maior consumo de ração e ganho de peso neste período, o que reforça o indício de que o potencial de um óleo essencial pode ser devido ao efeito sinérgico de todos os seus componentes, tanto majoritários quanto secundários. Já em relação à microbiota intestinal, a associação na inclusão de 2g/kg de ácido benzoico e 0,1g/kg de timol, aumentou a contagem de *Lactobacillus* spp. no conteúdo ileal e *Bifidobacterium* spp. no conteúdo cecal em comparação à ração basal.

Sendo assim, as condições experimentais podem interferir na avaliação do potencial da associação de ácido benzoico e óleos essenciais. A realização ou não de um desafio bacteriológico, assim como a escolha das doses de cada aditivo e a escolha dos componentes dos óleos essenciais, podem influenciar o desempenho e saúde dos animais avaliados.

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

A busca por aditivos que substituam a utilização de antibióticos promotores de crescimento na suinocultura é cada vez mais crescente. Uma alternativa para esta substituição na fase de creche é a utilização de ácidos orgânicos na dieta, pois estes possuem capacidade de reduzir o pH gástrico e exercer ação antimicrobiana. Entre os ácidos orgânicos, o ácido benzoico se destaca pela redução da população de bactérias patogênicas e consequente manutenção da morfologia da mucosa intestinal e do desempenho de leitões recém-desmamados. Tais benefícios também são observados em leitões suplementados com óleos essenciais, que possuem alto efeito antimicrobiano. Devido à característica lipofílica do ácido benzoico e dos óleos essenciais, ambos podem agir sobre bactérias patogênicas, diminuindo sua patogenicidade e garantindo menor desafio aos leitões. A associação desses aditivos e seus efeitos sobre o desempenho e a saúde desses animais é uma alternativa que vem sendo avaliada em diferentes condições.

## REFERÊNCIAS

- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological proprieties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 25, p. 407-426, 2010.
- ALVARADO, M. A. P. et al. Ácido benzoico y un producto baseado en especies de *Bacillus* para proteger la productividad de los lechones y al ambiente. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, Mérida, v. 4, p. 477-468, 2013.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BLANCHARD, P. Less buffering more enzymes and organic acids. **Pig Progress**, Doetinchen, v. 16, 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.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. Performance of rabbits and oxidative stability of muscle tissues as affected by dietary supplementation with oregano essential oil. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 58, p. 209-218, 2004.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. The effect of dietary oregano essential oil lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 259-265, 2002.
- BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 1-14, 2010.
- CANIBE, N. et al. 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.
- CASTILLO, M. et al. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 124, p. 239-247, 2007.

COSTA, L. B. et al. Herbal extracts and organic acids as natural feed additives in pig diets. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 43, p. 181-193, 2013.

DANDLEN, S. A. et al. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. **Flavour Fragrances Journal**, Malden, v. 25, p. 150-155, 2010.

DANIEL, E. et al. Anatomia e fisiologia do sistema digestório de suínos. In: SAKOMURA, N. K. et al. (Ed.). **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. p. 20-32.

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

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.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid and thymol on growth performance and gut characteristics of weaned piglets. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 28, p. 287-339, 2015.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid (*Vevovital*<sup>®</sup>) on the performance and jejunal digestive physiology in young pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 7, p. 1-7, 2016.

DIAO, H. et al. Effects of dietary supplementation with benzoic acid on intestinal morphological structure and microflora in weaned piglets. **Livestock Science**, New York, v. 167, p. 249-256, 2013.

DONG, G. Z.; PLUSKE, J. R. The low feed intake in newly-weaned pigs: problems and possible solutions. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 20, p. 440-452, 2007.

FAIRBROTHER, J. M.; GYLES, C. L. Post-weaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. In: STRAW, B. E. et al. (Ed.). **Diseases of Swine**. 9th ed. Ames: Blackwell, 2006. p. 949-662.

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

FRANZ, C.; BASER, K.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 25, p. 327–340, 2010.

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**, Jablona, v. 3, p. 73-87, 1995.

GHELER, T. R. et al. Uso de ácido benzoico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, 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 Animal Nutrition**, Abingdon, v. 66, p. 227-236, 2012.

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

HAO, W. I.; LEE, Y. K. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 268, p. 491-502, 2004.

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

HEO, J. M. et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of strategies of control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 97, p. 207-237, 2013.

HUANG, Y. et al. Effects of dietary supplementation with blended essential oils on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles and fecal characteristics in weanling pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 23, p. 607-613, 2010.

JANZ, J. A. M. et al. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. **Meat Science**, Barking, v. 75, p. 350-355, 2007.

JENSEN, B. B. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in gut. In: PIVA, A.; BACH KNUDSEN, K. E.; LINDBERD, J. E. (Ed.). **Gut environment of pigs**. Uppsala: Oxford University, 2001. p. 302-304.

JONES, G. Phytobiotic solutions. **Pig Progress**, Doetinchen, v. 18, n. 8, p. 25-26, 2002.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plants extracts. **Feed Mix**, Doetinchen, v. 9, p. 19-24, 2000.

KIM, Y. J. et al. Isolation of Escherichia coli from piglets in South Korea with diarrhea and characteristics of the virulence genes. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 74, p. 59-64, 2010.

KONSTANTINOV, S. R. et al. Specific response of a novel and abundant Lactobacillus amylovorus- like phylotypedo dietary prebiotics in the ileum and colon of weaning pig. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3821-3830, 2004.

KUNG, L. J.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. Cap. 7, p. 305-360. (Agronomy, 42).

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 453-462, 2001.

LANGE, C. F. M. et al. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**, New York, v. 134, p. 124-134, 2010.

LE DIVIDICH, J.; SEVE, B. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 19, p. 63–74, 2000.

LEESON, S. et al. Effect of butiric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 1418-1422, 2005.

LI, S. Y. et al. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weanerpigs. **Livestock Science**, New York, v. 145, p. 119-123, 2012.

LIU, Y. et al. Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 5294-5306, 2013.

LUCKSTADT, C.; MELLOR, S. Holoanalysis: the acid test in pigs diets. **Krafftutter Feed Magazine**, Frankfurt, v. 1, p. 18-21, 2010.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative activity of spices and apice extracts. In: RISCH, S. J.; HO, S. C. T. (Ed.). **Spices, flavor, chemistry and antioxidant proprieties**. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 176-187.

MANZANILLA, E. G. et al. Effect of plant extract and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 3210-3218, 2004.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotic. **Pig Progress**, Doetinchen, v. 16, p. 18-21, 2000.

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

NAMKUNG, H. et al. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performande, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 48, p. 697-704, 2004.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, p. 1046-1055, 2006.

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, p. 1875-1884, 2000.

PAPATSIROS, V. G. et al. Effects 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**, Kortowo, v. 14, p. 117-125, 2011.

PARTANEN, K. et al. 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

PARTANEN, K.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pigs diets. **Nutritional 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.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Washington, v. 311, p.808-811, 2006.

PLUSKE, J. R. Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, p. 1-7, 2013.

PLUSKE, J. R.; WILLIAMS, I. H.; AHERNE, F. X. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. **British Journal of Nutrition**, London, v. 76, p. 409-422, 1996.

PLUSKE, J. R. et al. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. **Nutritional Research Reviews**, Cambridge, v. 15, p. 333-371, 2002.

REISHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, P. R. Antioxidants in foodlipids. In: AHOH, C. C.; MIN, D. B. (Ed.). **Chemistry nutrition and biotechnology**. New York: M. Dekker, 1998. p. 423-448.

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.

SAM, A. H. et al. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. **Neuropharmacology**, New York, v. 63, p. 46-56, 2012.

SILVEIRA, H. **Ácido benzoico para leitões na fase inicial**: avaliação *in vivo* e *ex vivo*. 2014. 119 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

STEINERT, R. E. et al. Digestive Physiology of the Pig Symposium: Secretion of gastrointestinal hormones and eating control. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 1963-1973, 2013.

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

SUIRYANRAYNA, M. V. A. N.; RAMANA, J. V. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 6, p. 1-11, 2015.

TORRALLARDONA, D.; BADIOLA, I.; BROZ, J. Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weaning piglets. **Livestock Science**, New York, v. 108, p. 210-213, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Procariotos: Domínios *Bacteria* e *Archaea*. (Eds). **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 299-328

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Safety**, Malden, v. 12, p. 40-53, 2013.

USHIDA, K.; MAEKAWA, M.; ARAKAWA, T. Influence of dietary supplementation of herbs extracts on volatile sulfur production in pig large intestine. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 18-23, 2002.

VIEIRA, S. L. et al. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. In: AVE WORLD, 1., 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: [s. n.], 2005. 1 CD-ROM.

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

VONDRUSKOVA, H. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. **Veterinary Research Institute**, Brno, v. 55, p. 199-224, 2010.

WANG, R.; LI, D.; BOURNE, S. Can 2000 years of herbal medicine history help us solve problems in year 2000? In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 1., 1998, Nottingham. **Anais...** Nottingham: Alltech, 1998. p. 168-184.

YANG, H. et al. Effects of weaning on intestinal upper villus epithelial cells of piglets. **Plos One**, San Francisco, v. 11, p. 1-20, 2016.

YIN, Q; ZHENG, Q. Isolation and identification of the dominant lactobacillus in the gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, p. 68-71, 2005.

ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 6, p. 1-10, 2015.

ZHANG, Z. F.; ROLANDO, A. V.; KIM, I. H. Effects of benzoic acid, essential oils and *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbiota and faecal gas emission in weanling pigs. **Journal of Applied Animal Research**, Izatnagar, v. 44, p. 173-179, 2016.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO

#### **Ácido benzoico e óleos essenciais em rações de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>**

#### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da associação de ácido benzoico (AB) e óleos essenciais (OE) sobre o desempenho e saúde intestinal de leitões recém-desmamados, desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>. Foram utilizados 270 leitões desmamados (peso inicial: 5,76 ± 0,52 kg), distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados, com seis tratamentos: 1) Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); 2) Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); 3) Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); 4) Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); 5) Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); 6) Controle negativo + 4g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4), nove repetições e cinco leitões por parcela experimental. No sétimo e oitavo dia de experimento, todos foram desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup> (1ml a cada dia, 10<sup>6</sup> UFC/ml). Quatorze dias após a inoculação, um animal por baia foi abatido. Os animais foram pesados ao início, aos 14, 21, 28 e 42 dias de experimento para avaliação do desempenho e duas vezes ao dia foi realizada a avaliação do escore fecal. Quatro dias após a inoculação foram coletadas amostras de fezes para análise microbiológica. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey (5%), pelo pacote SAS (2009). A associação AB+OE3 resultou maior ganho de peso (P < 0,05), melhor conversão alimentar (P < 0,05) e maior peso final (P < 0,05), de 0 a 14 dias, comparado ao CN. No período total, os tratamentos AB, AB+OE3 e AB+OE4 foram iguais (P > 0,05) ao CP e superiores (P < 0,05) ao CN para ganho de peso diário e peso final. Não houve diferença (P > 0,05) sobre a diarreia, população microbiana, produção de ácidos graxos voláteis, pH, peso de órgãos, proliferação celular e contagem de colecistoquinina. Os tratamentos CN e AB+OE4 resultaram em maior altura de vilosidade em jejuno (P < 0,05) em relação a AB+OE3. A renda líquida de AB, AB+OE3 e AB+OE4 foram superiores (P < 0,05) em relação ao CN, e semelhantes (P > 0,05) ao CP. A associação de AB e OE em 3g/kg proporciona melhora do desempenho, além de ser uma alternativa economicamente viável para substituir a Colistina.

Palavras-chave: Pós-desmame. Desempenho. Antibacterianos.

## ABSTRACT

The object was to evaluate the effect of association of benzoic acid (AB) and essential oils (OE) on the performance and intestinal health of weanling pigs challenged with *E. coli* K88<sup>+</sup>. 270 weaned piglets (initial weight:  $5.76 \pm 0.52$  kg) were used in a randomized blocks and distributed in six treatments: 1) Positive control receiving Colistin 40ppm (CP); 2) Negative control without additive (CN); 3) Negative control + 5 g/kg of benzoic acid (AB); 4) Negative control + 2 g/kg of benzoic acid and essential oils (AB+OE2); 5) Negative control + 3 g/kg of benzoic acid and essential oils (AB+OE3); 6) Negative control + 4 g/kg of benzoic acid and essential oils (AB+OE4), nine replications and five piglets per experimental plot. In the seventh and eighth day of the experiment all the animals were challenged with *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> (1 ml,  $10^6$  CFU/ml). Fourteen days after the inoculation one animal for pen was slaughtered. The animals were weighed at the beginning, at 14, 21, 28 and 42 days experiment for performance evaluation. The fecal score evaluation was conducted twice a day. Four days after challenge, stool samples were collected for microbial analysis. The data were submitted to ANOVA and Tukey test (5%), the SAS (2009) package. The association AB+OE3 result better higher weight gain ( $P < 0.05$ ), improved feed conversion ( $P < 0.05$ ) and increased body weight ( $P < 0.05$ ) from 0 at 14 days compared to the CN. In total period AB, AB+OE3 and AB+OE4 were similar ( $P > 0.05$ ) CP and higher ( $P < 0.05$ ) to CP for daily gain and final weight. There was no difference ( $P > 0.05$ ) on the incidence of diarrhea, microbial population, volatile fatty acids production, pH, organ weights, cell proliferation count and cholecystokinin count. The CN and AB+OE4 had higher villus height jejunum ( $P < 0.05$ ) than the AB+OE3 group. The net revenue of AB, AB+OE3 and AB+OE4 was higher ( $P < 0.05$ ) compared to CN and similar ( $P > 0.05$ ) to the CP. Thus, the combination of additives in the 3g/kg inclusion provides improved post weaning performance, and is an economically viable alternative to Colistin replacement.

Keywords: Weaning. Additive. Antimicrobial.

## 1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) de um leitão é um ambiente complexo, principalmente após o desmame, quando ocorre mudança de instalação, imposição de um novo convívio social e alteração da dieta. Com a ocorrência destes eventos estressores, o consumo de ração nas duas primeiras semanas de creche é baixo e, além disso, algumas funções fisiológicas do TGI não são remodeladas rapidamente para acompanhar estas mudanças e manter o desempenho do animal (LIU; IPHIRRAGUERRE; PETTIGREW, 2013). São desencadeadas a atrofia das vilosidades, deterioração da função de barreira e perturbação da absorção e secreção de eletrólitos (YANG et al., 2016).

Uma grave consequência é a ocorrência de diarreia, que pode causar morbidade e mortalidade nos leitões. A maioria destas ocorrências nesta fase é causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica, uma cepa bacteriana de alta patogenicidade que possui fímbrias para se aderir à mucosa intestinal e se proliferar (PLUSKE, 2013).

Por muitos anos, os antibióticos foram a principal linha de defesa na suinocultura, mas o receio ao surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos está se concretizando. Liu et al. (2016) descrevem a resistência de bactérias à colistina em animais e humanos, destacando o plasmídeo resistente entre estirpes de *Escherichia coli*. A colistina é um antibiótico substancialmente utilizado na agricultura desde 1950 e a limitação ao seu acesso passa a ser a solução em destaque.

A fim de minimizar os desgastes do animal e problemas econômicos desta fase, assim como buscar alternativas aos antibióticos, o ácido benzoico e os óleos essenciais têm sido avaliados. Estudos mostram que o ácido benzoico tem ação antibacteriana e reflexos positivos sobre o desempenho de leitões recém-desmamados (ALVARADO et al., 2013; DIAO et al., 2014;

GUGGENBUHL et al., 2007). Modulação da microbiota e melhora sobre o desempenho também são efeitos observados em aves e suínos suplementados com óleos essenciais (LI et al., 2012; SCHULZE et al., 2006; TIIHONEN et al., 2010).

Devido à característica lipofílica dos óleos essenciais e do ácido benzoico quando não dissociado, ambos podem se difundir pela parede celular da bactéria, alterando sua permeabilidade. A liberação de íons  $H^+$  no interior da célula, faz com que a bactéria inicie uma tentativa de reestabelecer a homeostase, realizando a retirada de prótons através da bomba  $Na^+/K^+$ . Um processo ativo que promove o esgotamento da bactéria, diminuição de sua patogenicidade e comprometimento dos processos vitais (JUVEN et al., 1994; SUIRYANRAYNA; RAMANA, 2015), caracterizando um efeito bactericida ou bacteriostático. Sendo assim, a associação de ácido benzoico e óleos essenciais mostra atividade sinérgica, na qual os compostos de óleos essenciais poderiam danificar e tornar mais permeável a parede celular de organismos patogênicos, permitindo mais facilmente a entrada e dissociação do ácido no interior da célula (VONDRUSKOVA et al., 2010).

Diante das estruturas e funcionalidades do ácido benzoico e dos óleos essenciais, surge a possibilidade de diminuir a inclusão de cada aditivo visto que, haverá um efeito sinérgico que potencializará os resultados. Além de buscar a inclusão ideal para essa associação, é preciso compará-la ao antibiótico e utilizar animais bacteriologicamente desafiados para que os resultados sejam consistentes com a realidade da suinocultura comercial.

Os objetivos deste estudo foram investigar os efeitos da associação do ácido benzoico e uma mistura de óleos essenciais, em diferentes concentrações, sobre o desempenho e a saúde intestinal de leitões recém-desmamados, desafiados com *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro Experimental de Suínos no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. Os procedimentos foram aprovados no Protocolo nº 067014, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFLA.

### *Animais, instalações e dieta experimental*

Foram utilizados 270 leitões machos castrados (cruzamento de fêmeas DanBred - DB90 x machos PIC - AGPIC337), desmamados aos 21 dias de idade e peso inicial de  $5,76 \pm 0,52$  kg. Foram alojados em baias suspensas, com piso ripado, comedouros semiautomáticos e bebedouros tipo chupeta. A temperatura foi controlada pela abertura ou fechamento de janelas e uso de lâmpadas aquecedoras para manter o ambiente próximo ao adequado para a idade do animal. Na primeira semana de creche, a temperatura foi mantida em torno de  $26,6 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ , decrescendo semanalmente até  $23,8 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$  na última semana desta fase, assim como a umidade relativa na primeira semana foi 63% e na última semana foi 69%.

As rações foram formuladas para atender às exigências nutricionais segundo National Research Council - NRC (2012), em três períodos da fase de creche: Pré-inicial 1 (21 a 31 dias de idade), Pré-inicial 2 (32 a 48 dias de idade) e Inicial (49 a 63 dias de idade) (Tabela 1). Água e ração foram fornecidos *ad libitum*.

### *Delineamento experimental*

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados e os animais distribuídos em seis tratamentos, com nove repetições e parcela experimental composta por cinco leitões. Os tratamentos foram: 1) Controle

positivo com 40ppm de Colistina (CP); 2) Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); 3) Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); 4) Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); 5) Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); 6) Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Como fonte de ácido benzoico foi utilizado o produto *VevoVital*<sup>®</sup>, com 99% do ácido. Como fonte da associação dos aditivos foi utilizado o produto *Vevowin*<sup>®</sup>, composto por 90% de ácido benzoico e 3,6% de uma mistura de óleos essenciais encapsulados que inclui timol, 2-metoxifenol, eugenol, piperina e curcumina. Os produtos foram fornecidos pela *DSM Produtos Nutricionais Brasil SA*.

Tabela 1 - Composição centesimal e valores nutricionais calculados das dietas utilizadas nas diferentes fases do experimento.

Ingredientes (kg)	Pré-inicial 1	Pré-Inicial 2	Inicial
Milho	24,500	39,500	61,500
Farelo de Soja 45%	15,000	20,000	27,000
Soja integral micronizada	9,000	1,750	7,000
Concentrado proteico de soja	6,000	6,250	-
Amido	23,449	15,821	0,757
Soro de leite em pó	12,097	6,250	-
Produto lácteo, 38% de lactose <sup>1</sup>	6,000	6,250	-
DL-Metionina	0,227	0,187	0,101
L-Triptofano	0,052	0,040	0,008
L-Treonina	0,185	0,158	0,091
L-Lisina	0,500	0,434	0,312
L-Valina	0,114	0,071	-
Fitase	0,010	0,010	0,010
Premix Vit/Min <sup>2</sup>	1,000	1,000	1,000
Sal	0,200	0,250	0,400
Calcário	-	-	0,579
Fosfato bicálcico	0,542	0,704	0,668
Sulfato de cálcio	0,550	0,750	-
Antioxidante <sup>3</sup>	0,025	0,025	0,025
Flavorizante <sup>4</sup>	0,050	0,050	0,050
Caolin <sup>5</sup>	0,500	0,500	0,500
Valores Calculados			
Energia metabolizável, Kcal/kg	3694	3607	3259
Proteína bruta	21,48	19,08	20,44
Lisina Total (%)	1,51	1,44	1,32
Lisina Digestível (%)	1,45	1,39	1,17
Ca (%)	0,73	0,63	0,60
P (%)	0,52	0,47	0,45
Lactose (%)	15,45	9,98	-

<sup>1</sup> Produto comercial Nuklospray E50. <sup>2</sup> Composição/kg do produto: Cu (12,00 mg); Fe (80,00 mg); I (1,00 mg); Mn (40,00 mg); Se (0,36 mg); Zn (110,00 mg); vit. A (6875,00 U.I.); vit. D3 (1505,00 U.I.); vit. E (40,00 mg); vit. K3 (3,07 mg); vit. B1 (1,00 mg); vit. B2 (3,13 mg); vit. B6 (2,00 mg); vit. B12 (0,02 mg); niacina (30,00 mg); ácido fólico (0,30 mg); ácido pantotênico (15,00 mg); biotina (0,10 mg); colina (200,97 mg); <sup>3</sup> Produto comercial Banox E. <sup>4</sup> Produto comercial Luctarom Lactantes.

<sup>5</sup> Material inerte composto por silicatos hidratados de alumínio.

### ***Procedimentos experimentais***

O experimento teve duração de 42 dias. Para o controle de doenças respiratórias, os animais receberam no primeiro dia experimental, uma dose (0,15 mL) de antibiótico a base de tulatromicina (Draxxin<sup>®</sup>, Zoetis), sem nenhuma ação entérica e assim, não interferindo no desafio intestinal.

Todos os animais foram desafiados com duas doses do inóculo de *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> (LT<sup>+</sup>, STa<sup>+</sup> e STb<sup>+</sup>), na concentração de 10<sup>6</sup> UFC/ml, sendo fornecido 1 ml ao sétimo e 1 ml ao oitavo dia de experimento. A *Escherichia coli* K88<sup>+</sup> (LSS-103/2008) foi isolada pelo Laboratório de Sanidade Suína - VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP. Já a preparação dos inóculos foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Zootecnia da UFLA. A cepa foi cultivada em meio de cultura durante 16 horas, a 37°C, e em seguida foi lavada sequencialmente em PBS, até a concentração de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Quatorze dias após a inoculação, aos 21 dias de experimento, um animal de cada parcela, com peso vivo mais próximo à média da baia, foi abatido, totalizando 9 leitões por tratamento. O abate foi realizado através de eletronarcose e seguido por exsanguinação, em um frigorífico municipal localizado em Lavras/MG. O objetivo foi coletar conteúdo cecal para análises microbiológica e de ácidos graxos voláteis, avaliar *pH* do TGI, coletar segmentos do TGI para avaliar morfologia intestinal, proliferação celular e contagem de colecistoquinina, bem como realizar pesagem de órgãos.

### ***Desempenho e incidência de diarreia***

Para avaliação do desempenho, os animais foram pesados ao início, 14, 21, 28 e 42 dias de experimento. Foram calculados o ganho de peso diário (GPD), o consumo de ração diário (CRD) e a conversão alimentar (CA).

Duas vezes ao dia foi realizada a avaliação do escore fecal através da classificação das fezes na baia. Foi realizada por apenas uma pessoa treinada, sendo a ausência de diarreia, determinada pela observação de fezes normais e a presença de diarreia, determinada pela observação de fezes líquidas e pastosas. A ocorrência de diarreia foi calculada através da porcentagem de baias positivas para diarreia em relação ao total de observações realizadas em um período, sendo encontrada ao final, a porcentagem de 0 a 14 dias, 0 a 21 dias, 0 a 28 dias e de 0 a 42 dias.

### ***Microbiologia***

Para a análise microbiológica, foram coletadas amostras de fezes no quarto dia após inoculação e amostra de conteúdo cecal no dia do abate, para comparação do perfil microbiológico logo quando estabelecido o desafio e após um período de possível recuperação dos animais. As análises das populações foram realizadas pelo método de cultura em meio seletivo específico para *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* spp, *Escherichia coli* e coliformes totais. As contagens das colônias (UFC/g) foram submetidas à transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ) antes da análise estatística (HUANG et al., 2004).

### ***pH do trato gastrointestinal***

Após o abate foi mensurado o pH dos conteúdos de cada segmento do trato gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno, íleo e ceco), através de cortes e inserção do pHmetro (modelo Testo 205 - Testo do Brasil).

### ***Ácidos graxos voláteis***

A análise dos ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico) foi realizada a partir de conteúdo cecal coletado após abate. Em uma amostra de 2 g do conteúdo, foi adicionado 4ml de ácido fórmico (17%) para extrair e conservar os ácidos graxos presentes; foi realizada a centrifugação a 2500 rpm e o

sobrenadante foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da análise por cromatografia gasosa, seguindo a metodologia descrita por Playne (1985).

### ***Morfologia intestinal***

As amostras de duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletadas, respectivamente, a 10 cm após o piloro, 2,0 cm a partir do piloro, 10 cm anteriores à junção íleo cecal e 10 cm posteriores ao ceco. Foram previamente lavadas com soro fisiológico, fixadas em solução *Bouin* por 12 horas, desidratadas, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo ( $4\mu\text{m}$ ) e as lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina, seguindo metodologia de Pluske, Williams e Aherne (1996b). As lâminas de duodeno, jejuno e íleo foram amostradas com dez vilosidades para avaliação de altura de vilosidade e dez criptas para profundidade de cripta, e o cólon foi amostrado em dez criptas. Elas foram analisadas através de microscópio óptico OLYMPUS CX31, com câmera OLYMPUS SC30 associada e foi utilizado o *software* analisador de imagens Axio Vision Release 4.9 (ZEISS).

### ***Proliferação celular***

Novas lâminas histológicas do jejuno foram preparadas para avaliar a proliferação celular através da detecção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), por imunohistoquímica. Após a desparafinização e reidratação das lâminas, foi realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena, utilizando o reagente Peroxidase Block (DakoCytomation, EUA) e, em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo utilizando o reagente Block Serum (DakoCytomation, EUA). Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo monoclonal anti-PCNA (PC 10 - Dako<sup>®</sup> A/S. Denmark), na diluição 1:1000, por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, foram incubados com o anticorpo secundário policlonal (HRP

Dako Envision<sup>®</sup> - código K401111), na diluição 1:1, por 30 minutos em temperatura ambiente. Para a revelação foi utilizado 50 µl de diaminobencidina (DAB) (Dako Envision<sup>®</sup>, código K346811) e, após imunocoloração, as seções foram contrastadas com hematoxilina de Carazzi. A proliferação foi expressa como a porcentagem de células positivas para PCNA para o total de células da cripta. Foram avaliados cinco campos por amostra, sendo nove amostras por tratamento, em áreas representativas com aumento de 400x. As lâminas foram analisadas através de microscópio óptico OLYMPUS CX31, com câmera OLYMPUS SC30 associada, e foi utilizado o *software* analisador de imagens ImageJ<sup>®</sup> 1.41.

#### ***Contagem de colecistoquinina***

Lâminas histológicas de duodeno também foram preparadas para a contagem de CCK, por imunohistoquímica. Após a desparafinização e reidratação das lâminas, foi realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena, utilizando o reagente Peroxidase Block (DakoCytomation, EUA) e, em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo utilizando o reagente Block Serum (DakoCytomation, EUA). Os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário policlonal CCK-8 (T 4254 – Península Lab<sup>®</sup>), na diluição 1:1000, por 3 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram incubados com o anticorpo secundário policlonal (HRP Dako Envision<sup>®</sup> - código K401111), na diluição 1:1, por 30 minutos em temperatura ambiente. Para a revelação foi utilizado 50 µl de diaminobencidina (DAB) (Dako Envision<sup>®</sup>, código K346811) e, após imunocoloração, as seções foram contrastadas com hematoxilina de Carazzi. Foram quantificadas as estruturas positivas para CCK nas criptas. Foram avaliados cinco campos por amostra, sendo nove amostras por tratamento, em áreas representativas com aumento de 200x. As lâminas foram analisadas através de microscópio óptico

OLYMPUS CX31, com câmera associada OLYMPUS SC30, e foi utilizado o *software* analisador de imagens ImageJ<sup>®</sup> 1.41.

### ***Peso de órgãos***

Foram coletados também o pâncreas, baço e fígado para avaliação do peso relativo destes órgãos. O peso relativo foi determinado pela porcentagem que o peso do órgão coletado representa em relação ao peso corporal do respectivo animal.

### ***Análise econômica***

Ao final do experimento foi realizada a análise econômica, considerando diferentes itens de produção para avaliar a viabilidade em se utilizar cada aditivo. As variáveis inicialmente analisadas foram a receita líquida (RL) considerando a receita bruta da venda do leitão na saída de creche (RBVL), o custo bruto de ração (CBR) e outros custos de produção (OCP) de acordo com custos da agroindústria em uma Unidade Produtora de Leitões de Creche (UPLC), segundo dados do Centro de Inteligência de Aves e Suínos (CIAS) para Santa Catarina, Brasil, no ano de 2014. Os outros custos de produção foram representados por: custo com ração (28,83%), gastos com transporte (1,45%), despesas financeiras (0,18%), despesas com aquisição de leitões (60,56%), gastos eventuais (1,82%) e remuneração sobre reprodutores e animais em estoque (7,17%). Além disso, foi analisado o retorno ao investimento (ROI) considerando o ganho líquido obtido em razão do valor investido (custo bruto com ração e outros custos de produção). E foi analisado o custo por quilo de leitão produzido (Custo/kg de leitão) considerando os custos na fase de creche em razão do peso do animal aos 63 dias de idade. Todos os valores foram convertidos em dólar, de acordo com o valor na data de realização dos cálculos, que foi R\$3,03 em 15/04/2015.

***Análise estatística***

O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e, quando estes não apresentaram essa distribuição, foi realizada a transformação usando PROC RANK (SAS INSTITUTE INC, 2009). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância. Quando houve diferença estatística pelo teste F ( $P < 0,05$ ), foi adotado o teste de Tukey para comparação das médias. Os dados foram submetidos ao pacote estatístico do *software* SAS (2009).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 0 a 14 dias, os leitões que receberam a associação na inclusão de 3g/kg (AB+OE3) apresentaram maior GPD ( $P < 0,05$ ), melhor CA ( $P < 0,05$ ) e maior PF ( $P < 0,05$ ) quando comparado aos animais que não receberam nenhum aditivo (CN) (Tabela 2). No período de 0 a 21 dias, os animais dos grupos AB+OE3 e do grupo que recebeu antibiótico (CP), apresentaram maior GPD ( $P < 0,05$ ) e maior PF ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao CN.

Tabela 2 - Efeitos das dietas experimentais sobre o consumo de ração diário – CRD (kg), ganho de peso diário – GPD (kg), conversão alimentar – CA e peso final PF (kg) de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>\*

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	P-valor
<b>0 a 14 dias</b>								
CRD	0,218	0,201	0,224	0,212	0,234	0,207	0,010	0,232
GPD	0,149ab	0,112c	0,143abc	0,126bc	0,164a	0,132abc	0,008	0,001
CA	1,47ab	1,86a	1,57ab	1,73ab	1,42b	1,63ab	0,089	0,014
PF	7,85ab	7,33c	7,85ab	7,52bc	8,06a	7,66abc	0,121	0,003
<b>0 a 21 dias</b>								
CRD	0,335	0,294	0,335	0,304	0,340	0,317	0,013	0,231
GPD	0,215a	0,167b	0,198ab	0,193ab	0,228a	0,188ab	0,010	0,003
CA	1,57	1,79	1,56	1,59	1,50	1,73	0,077	0,092
PF	10,28a	9,32b	10,27ab	9,81ab	10,28a	9,75ab	0,219	0,002
<b>0 a 28 dias</b>								
CRD	0,409ab	0,355b	0,415a	0,365ab	0,414a	0,407ab	0,014	0,005
GPD	0,265ab	0,208c	0,256ab	0,222bc	0,280a	0,250a	0,012	0,001
CA	1,55	1,72	1,62	1,73	1,48	1,64	0,075	0,129
PF	13,24a	11,95b	13,07ab	12,36ab	13,57a	12,89ab	0,302	0,004
<b>0 a 42 dias</b>								
CRD	0,625ab	0,571b	0,666a	0,587b	0,629ab	0,633ab	0,016	0,002
GPD	0,408ab	0,357c	0,421a	0,377bc	0,419ab	0,407ab	0,010	0,000
CA	1,54	1,61	1,58	1,56	1,51	1,56	0,028	0,200
PF	22,96a	20,78b	23,45a	21,70ab	23,38a	22,98a	0,416	0,000

\*Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

No período de 0 a 28 dias, o tratamento AB+OE3 foi superior ao controle CN quanto ao CRD ( $P < 0,05$ ) e PF ( $P < 0,05$ ), e superior ao CN e a associação com inclusão de 2g/kg (AB+OE2) quanto ao GPD ( $P < 0,05$ ). Comparado ao CP, o grupo AB+OE3 apresentaram resultados significativamente iguais para CRD ( $P > 0,05$ ), GPD ( $P > 0,05$ ) e PF ( $P > 0,05$ ), de 0 a 28 dias.

Considerando todo o período experimental, os leitões que receberam apenas ácido benzoico com inclusão de 5g/kg (AB) apresentaram maior CRD ( $P < 0,05$ ) e GPD ( $P < 0,05$ ) em relação ao CN e AB+OE2. Nesse período foi observado maior PF ( $P < 0,05$ ) para animais do grupo CP, AB, AB+OE3 e AB+OE4 em relação aos animais do grupo CN.

Muitos trabalhos destacam os benefícios do ácido benzoico sobre o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar de leitões após o desmame (DIAO et al., 2013; GUGGENBUHL et al., 2007; HALAS et al., 2010). A utilização de óleos essenciais também resulta em aumento de consumo de ração e peso final em leitões (LI et al., 2012), e melhor conversão alimentar (TREVESI et al., 2010), assim como existem resultados significativamente iguais entre leitões suplementados com antibiótico ou óleos essenciais quanto a ganho de peso e conversão alimentar, destacando a possibilidade de substituição dos antibióticos (PEDROSO et al., 2005).

O melhor resultado de desempenho de 0 a 14 dias, resultado da associação dos aditivos na inclusão de 3g/kg (AB+OE3) em comparação ao controle negativo, não foi acompanhado de maior consumo de ração. Provavelmente os animais do grupo AB+OE3 apresentavam melhores condições do trato gastrointestinal e melhor coeficiente de digestibilidade dos nutrientes. Como observado por Zhang, Rolando e Kim (2016), o fornecimento de 3g/kg de ácido benzoico + 0,1g/kg de óleos essenciais, foram eficientes em aumentar a

digestibilidade aparente total da matéria seca e do nitrogênio em leitões aos vinte e um dias de creche.

Por outro lado, Diao et al. (2015) observaram melhora da conversão alimentar de leitões nas duas semanas de creche ao utilizar 2g/kg de ácido benzoico associado a 0,1g/kg de timol comparado a uma ração basal sem aditivo, mas sem observar diferença para ganho de peso e consumo de ração neste período. Este resultado pode ser devido à utilização apenas do timol associado ao ácido benzoico. No atual estudo, a utilização dos componentes timol, 2-metoxifenol, eugenol, piperina e curcumina em associação ao ácido benzoico pode ter resultado em maior ganho de peso aos animais do tratamento AB+OE3 devido à ação conjunta dos óleos essenciais. Sabe-se que a ação do componente majoritário de uma planta pode ser potencializada por componentes secundários ocorrendo um efeito sinérgico, na forma de blends, diferente de quando um componente é utilizado separadamente (KAMEL, 2000).

Apesar das associações dos aditivos nas inclusões 3g/kg (AB+OE3) e 4g/kg (AB+OE4) terem sido positivas sobre as variáveis de desempenho em alguns períodos avaliados, a associação na menor inclusão 2g/kg (AB+OE2) foram inferiores para GPD, CA e PF de 0 a 14 dias, CRD, GPD e PF de 0 a 28 dias e CRD, GPD e PF de 0 a 42 dias, semelhante ao CN. Esses resultados podem estar relacionados ao fato deste tratamento conter uma inclusão inferior de ácido benzoico (1,8g/kg) e de óleos essenciais (0,072g/kg), não havendo concentração o suficiente e, até mesmo sinergismo, para melhorar as variáveis de desempenho e contrastando com alguns resultados positivos para estas variáveis quando estes aditivos são utilizados. Na literatura, características superiores de desempenho de leitões recebendo ácido benzoico são resultantes de um efeito linear da inclusão do aditivo nos níveis 0; 2,5; 5,0 e 7,5 g/kg (GHELER et al., 2009), e efeitos positivos de óleos essenciais sobre o consumo

de ração e o ganho de peso de leitões podem ser observados nas inclusões 0,1 e 0,15 g/kg (LI et al., 2012), níveis estes superiores ao do grupo AB+OE2.

Considerando o desempenho dos animais em toda a fase de creche, o ácido benzoico e as associações nas inclusões 3g/kg e 4g/kg proporcionaram maior peso final aos animais, se igualando ao antibiótico.

Quanto à incidência de diarreia, não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos nos períodos avaliados (Tabela 3). Os tratamentos não influenciaram a ocorrência de diarreia entre os animais, assim como observado por Halas et al. (2010) em animais desafiados com *E. coli* enterotoxigênica e suplementados com ácido benzoico. Os valores são semelhantes aos observados por Diao et al. (2015) quando utilizada a associação deste ácido e timol. A distribuição da diarreia apresentada pelos animais, independente dos tratamentos, se apresenta concentrada na primeira semana pós-desmame, como é característica desse período devido ao estresse e despreparo fisiológico frente à mudança de alimento. E permanece alta durante a segunda semana de experimento, pois, ao sétimo e oitavo dia de creche, foi realizado a inoculação da cepa bacteriana de alta patogenicidade *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>.

Tabela 3 - Efeitos das dietas experimentais sobre a incidência de diarreia – ID (%) de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>.

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	P-valor
<i>0 a 14 dias</i>								
ID	24,14	37,49	34,55	27,42	29,34	29,02	4,893	0,432
<i>0 a 21 dias</i>								
ID	21,90	31,11	28,57	27,93	26,77	22,30	3,313	0,267
<i>0 a 28 dias</i>								
ID	19,11	28,37	25,61	24,04	27,05	21,86	2,933	0,207
<i>0 a 42 dias</i>								
ID	13,27	19,36	17,45	17,26	15,83	16,01	2,175	0,316

<sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

As contagens das populações de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* spp, *Escherichia coli* e coliformes totais também não foram afetadas por tratamentos experimentais ( $P > 0,05$ ) nos períodos pré-abate e pós-abate (Tabela 4). Os resultados da contagem de populações se diferem de estudos como o de Diao et al. (2014), no qual o uso de ácido benzoico diminuiu a contagem de *Escherichia coli* e aumentou a contagem de *Bifidobacterias* spp. no íleo de leitões. Lević et al. (2008), avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* da associação de diferentes ácidos orgânicos e óleos essenciais em comparação com produtos acidificantes comerciais e as associações foram equivalente a esses produtos quanto ao efeito inibitório do crescimento de *Salmonella*.

Tabela 4 - Efeito das dietas experimentais sobre a concentração microbiana (UFC/g) e relação entre bactérias, nas fezes coletadas pré-abate e no conteúdo cecal coletado pós-abate de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>.

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	P-valor
<b>Pré-abate</b>								
<i>Bifidobacterium</i>	8,35	7,99	7,31	7,78	8,16	8,00	1,140	0,273
<i>Lactobacilli</i> spp	8,39	8,25	8,12	8,05	8,27	7,77	0,579	0,253
<i>Escherichia coli</i>	4,06	5,95	3,33	4,8	4,61	6,56	2,819	0,143
Coliformes totais	5,3	6,26	4,93	5,54	4,62	6,59	1,854	0,245
<b>Pós abate</b>								
<i>Bifidobacterium</i>	7,02	6,76	6,81	6,82	6,75	6,84	0,707	0,971
<i>Lactobacillis</i> spp	6,85	6,46	6,61	6,02	6,74	6,66	1,043	0,811
<i>Escherichia coli</i>	2,88	4,18	1,96	3,77	3,08	3,35	3,128	0,523
Coliformes totais	4,22	5,03	3,15	4,72	3,85	4,34	2,320	0,457

<sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Apesar da diminuição da contagem de bactérias observada em pesquisas destes aditivos, a forma como uma população bacteriana reage frente a eles é bastante complexa, e nem sempre a diminuição da patogenicidade de uma

bactéria é acompanhada da redução de sua contagem. Isto ocorre, pois, a comunicação entre uma população bacteriana é através de envio e recebimento de sinais entre elas em um mecanismo chamado *quórum sensing*, ou seja, são sinais através da liberação de compostos que permitem que as bactérias sintam umas às outras e permitem que genes envolvidos na adesão e lesão epitelial do hospedeiro sejam formados (SIRCILI et al., 2004). Sendo assim, quando a densidade desta população não atinge um mínimo, as bactérias não se comunicam efetivamente, podendo perder seu efeito patogênico ou a capacidade de reprodução (STURBELLE et al., 2015). Segundo Niu e Gilbert (2004), os extratos vegetais são capazes de inibir esse mecanismo e podem modular a formação de biofilme e a motilidade de *E. coli*. Nesse estudo, o ácido benzoico e os óleos essenciais podem ter sido inibidores de *quórum sensing*, diminuindo a comunicação das populações bacterianas e melhorando o desempenho dos leitões, sem que houvesse alteração na contagem desses microrganismos.

Os resultados da produção de ácidos graxos voláteis no ceco e do pH mensurado em segmentos do trato gastrointestinal estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Efeitos das dietas experimentais sobre a produção de ácidos graxos voláteis (mMol/g) no ceco de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>.

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	<i>P</i> - valor
Acético	606,25	594,46	577,03	656,42	511,96	618,45	157,203	0,783
Propiônico	337,76	363,79	297,63	329,18	300,36	298,64	93,265	0,649
Butírico	126,19	157,19	155,58	169,65	155,66	144,1	55,530	0,595

<sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Tabela 6 - Efeitos das dietas experimentais sobre o pH de segmentos do trato gastrointestinal de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>.

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	<i>P</i> -valor
Estômago	3,66	3,12	3,48	3,43	3,23	3,7	0,780	0,518
Duodeno	5,69	5,67	5,7	5,31	5,32	5,54	0,745	0,724
Jejuno	5,94	6,15	6	5,89	6,08	5,87	0,429	0,757
Íleo	6,27	6,17	6,29	6,17	6,22	6,32	0,511	0,949
Ceco	5,66	5,73	5,69	5,58	5,65	5,59	0,231	0,642

<sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Como os ácidos graxos voláteis são os principais produtos finais do metabolismo bacteriano no intestino grosso de suínos, o efeito de ácidos orgânicos ou óleos essenciais sobre o aumento da contagem de bactérias pode aumentar essa produção. Porém, nesse estudo, a contagem de bactérias permaneceu igual em todos os tratamentos, refletindo na produção de AGV.

A utilização de ácido benzoico ou da associação deste aditivo com óleos essenciais também não reduziu o pH dos segmentos do trato gastrointestinal avaliados. Este fato apoia a definição de que o efeito do ácido benzoico não está, necessariamente, ligado a uma redução do pH nos segmentos (FRANCO et al., 2005). Sua constante de dissociação elevada (pKa= 4,21) dificulta sua dissociação e acidificação do meio. Resultado semelhante foi observado por Halas et al. (2010), leitões suplementados com ácido benzoico não apresentaram alteração no pH gástrico.

Os tratamentos experimentais também não apresentaram efeito ( $P > 0,05$ ) sobre a contagem de colecistoquinina (CCK) no duodeno. Este hormônio pode ser secretado pelas células I do duodeno e isto ocorre mais facilmente em condições ácidas (STEINERT et al., 2013). Considerando esta susceptibilidade do hormônio ao pH, a ausência de alteração do pH do duodeno pelos tratamentos

pode ter influenciado a ausência de diferença significativa na contagem de CCK. A CCK é liberada pós-prandialmente em resposta à gordura saturada, ácidos graxos de cadeia longa, aminoácidos e peptídeos que resultam da digestão da proteína. É capaz de promover a constrição do esfíncter pilórico, retardando o esvaziamento gástrico, e é o principal estímulo para a liberação de enzimas pancreáticas e bile no intestino delgado (SAM et al., 2012). O número médio de CCK contabilizado neste trabalho foi  $11,92 \pm 1,26$  unidades.

Ao avaliar a altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação entre elas, não foi observado efeito dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) para os segmentos duodeno e íleo (Tabela 7). Da mesma forma, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para a profundidade de cripta no cólon. Porém, foi observado aumento da altura de vilosidades ( $P < 0,05$ ) do jejuno de animais do grupo CN e AB+OE4, comparados ao grupo AB+OE3.

As alterações morfológicas do intestino, podem ser consequência de um processo natural em suínos com mais de três semanas de idade, fase em que epitélio sofre renovações periódicas, ocorrendo migração das células das criptas para a extremidade das vilosidade. É nesta migração que ocorrem diferenciações morfológicas e funcionais (YANG et al., 2011), e uma taxa de renovação acelerada pode resultar em vilosidades com células imaturas e de atividade enzimática reduzida (PLUSKE; WILLIAMS; AHERNE, 1996a).

Tabela 7 - Efeito das dietas experimentais sobre a altura de vilosidade – AV ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta – PC ( $\mu\text{m}$ ) e relação altura de vilosidade/profundidade de cripta – AV:PC de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>\*

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	P-valor
<i>Duodeno</i>								
AV	265,32	282,71	284,95	262,61	292,38	293,81	32,12	0,108
PC	203,21	210,83	212,58	201,03	199,25	208,39	26,99	0,842
AV:PC	1,42	1,39	1,39	1,35	1,53	1,46	0,17	0,382
<i>Jejuno</i>								
AV	233,07ab	255,78a	242,39ab	247,11ab	220,08b	270,98a	35,99	0,012
PC	174,1	197,78	170,6	189,63	175,62	193,51	24,61	0,141
AV:PC	1,43	1,34	1,47	1,34	1,29	1,47	0,21	0,412
<i>Íleo</i>								
AV	229,94	217,71	217,51	231,88	210,59	203,4	44,00	0,942
PC	192,84	215,14	198,11	212,63	192,28	215,73	28,77	0,200
AV:PC	1,25	1,07	1,16	1,14	1,14	0,98	0,28	0,585
<i>Cólon</i>								
PC	351,23	311,95	334,85	364,35	330,56	321,35	53,67	0,417

\*Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Dessa forma, considerando que os animais do grupo CN apresentaram desempenho inferior e que o grupo AB+OE4, se assemelharam a eles de 0 a 14 e 0 a 21 dias, períodos estes que antecederam a coleta do segmento, possivelmente as células dessas vilosidades eram imaturas. Já a menor altura de vilosidade do grupo AB+OE3, somados aos dados encontrados no desempenho, levam a considerar que, mesmo apresentando uma menor altura de vilosidades no jejuno, os animais desse grupo aproveitaram os nutrientes de forma mais eficiente, com menor desgaste das vilosidades e culminando em melhor desempenho em determinadas fases. Entretanto, nenhum tratamento resultou em aumento ou diminuição significativa da proliferação celular ( $P < 0,05$ ) em criptas de jejuno

dos leitões avaliadas por imunohistoquímica. As células imunorreativas anti-PCNA, coradas em marrom, e as células não coradas foram contadas nas criptas de jejuno e a porcentagem média de células em proliferação foi de  $46,46 \pm 6,29\%$ .

Quanto ao peso relativo de órgãos (Tabela 8), não foram observadas diferenças entre os tratamentos experimentais ( $P > 0,05$ ).

Tabela 8 - Efeitos das dietas experimentais sobre o peso relativo de órgãos de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>.

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	<i>P</i> -valor
Pâncreas	0,24	0,239	0,222	0,237	0,228	0,212	0,031	0,419
Baço	0,208	0,294	0,231	0,214	0,225	0,211	0,110	0,967
Fígado	2,961	3,164	3,131	3,068	3,151	3,123	0,347	0,861

<sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Assim como as alterações no intestino de leitões são constantes após o desmame, alguns órgãos também podem ser passíveis a alterações em seus pesos. Porém, os tratamentos experimentais não influenciaram o tamanho dos órgãos. Esse resultado é semelhante à avaliação de óleos essenciais para frangos, na qual não houve aumento do peso de pâncreas, fígado e intestino delgado, mesmo havendo alteração do consumo de ração em alguns períodos (ÇABUK et al., 2006). Segundo Rao e Mc Cracken (1992), a variação no peso dos órgãos pode variar de acordo com as quantidades de energia e/ou proteína na dieta. Tal fato pode esclarecer a semelhança entre os pesos relativos de órgãos apresentados nessa pesquisa, pois as dietas utilizadas foram isoproteicas e com valores iguais para energia metabolizável.

A viabilidade econômica em utilizar os tratamentos, considerando os custos de produção em uma unidade produtora de leitões, está apresentada na

Tabela 9. Houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da receita bruta da venda de leitão dos grupos de ácido benzoico e de associação deste ácido e óleos essenciais na inclusão 3g/kg, comparada à venda dos animais do controle negativo. Houve também um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da receita líquida quando utilizados os tratamentos ácido benzoico e associações dos aditivos nas inclusões 3g/kg e 4g/kg, comparados ao controle negativo. O retorno ao investimento foi melhor ( $P < 0,05$ ) aos grupos de ácido benzoico e de associações nas inclusões 3g/kg e 4g/kg em comparação ao grupo controle negativo e igual ( $P > 0,05$ ) em comparação ao controle positivo. O custo por quilo de leitão produzido foi menor ( $P < 0,05$ ) aos grupos de ácido benzoico e de associações nas inclusões 3g/kg e 4g/kg em comparação ao grupo controle negativo e igual ( $P > 0,05$ ) em comparação ao controle positivo.

Tabela 9 - Efeitos dos tratamentos sobre a receita bruta da venda de leitões – RBVL (U\$), custo bruto da ração – CBR (U\$), outros custos de produção – OCP (U\$), receita líquida – RL (U\$), retorno ao investimento – ROI (%) e custo por quilo de leitão (U\$) em uma avaliação econômica de leitões desafiados com *E. coli* K88<sup>+</sup>\*

	CP <sup>1</sup>	CN <sup>2</sup>	AB <sup>3</sup>	AB+OE2 <sup>4</sup>	AB+OE3 <sup>5</sup>	AB+OE4 <sup>6</sup>	DP	P-valor
RBVL	45,46ab	41,15b	46,43a	42,61ab	46,54a	45,95ab	3,688	0,005
CBR	7,38	6,75	7,61	6,84	7,46	7,43	0,740	0,087
OCP	18,1	18,1	18,1	18,1	18,1	18,1	0,000	1,000
RL	19,99ab	16,31b	20,73a	17,68ab	20,98a	20,43a	3,107	0,005
ROI	78,33ab	65,48b	80,55a	70,81ab	81,76a	80,06a	3,357	0,006
Custo/kg de leitão	1,11ab	1,20a	1,10b	1,16ab	1,09b	1,10b	0,022	0,005

\*Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Controle positivo com 40ppm de Colistina (CP); <sup>2</sup>Controle negativo sem o uso de promotor de crescimento (CN); <sup>3</sup>Controle negativo + 5g/kg de ácido benzoico (AB); <sup>4</sup>Controle negativo + 2g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE2); <sup>5</sup>Controle negativo + 3g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE3); <sup>6</sup>Controle negativo + 4 g/kg de ácido benzoico e óleos essenciais (AB+OE4).

Diante dos resultados positivos para as variáveis de desempenho avaliadas neste trabalho, é importante avaliar o retorno econômico que se pode obter ao investir na utilização da associação de ácido benzoico e óleos essenciais na fase de creche. As rações de cada tratamento tiveram custo diferente entre elas, porém, ao considerar o quanto o animal consumiu de ração durante o experimento e o seu respectivo valor, não houve aumento de gasto para incluir antibiótico, o ácido benzoico ou as associações de ácido benzoico e óleos essenciais na dieta basal. Considerando os custos de produção, que são fixos para qualquer tratamento avaliado, a utilização de ácido benzoico ou das associações deste ácido e óleos essenciais nas inclusões 3g/kg e 4g/kg resultaram em uma receita líquida superior à utilização de uma dieta basal sem aditivos. Com isso, os rendimentos obtidos a partir da quantia investida nos animais dos tratamentos experimentais AB, AB+OE3 e AB+OE4 foram maiores que quando utilizada a ração basal sem aditivo, além de serem iguais quanto ao investimento realizado em animais que receberam rações com colistina. O custo por quilo de leitão produzido também demonstram que os tratamentos AB, AB+OE3 e AB+OE4 são mais vantajosos, uma vez que os valores foram menores que o custo por quilo de leitão do tratamento com ração basal e igual para os do tratamento com colistina.

#### **4 CONCLUSÃO**

A associação de ácido benzoico e óleos essenciais na inclusão de 3g/kg em rações de leitões fase de creche é um substituinte ao antibiótico Colistina por manterem semelhantes características de desempenho, além de ser uma alternativa economicamente viável.

## REFERÊNCIAS

ALVARADO, M. A. P. et al. Ácido benzoico y um procduto basado en especies de Bacillus para proteger la productividad de los lechones y al ambiente. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, Mérida, v. 4, p. 477-468, 2013.

ÇABUK, M. et al. Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 36, p. 135-141, 2006.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid and thymol on growth performance and gut characteristics of weaned piglets. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 28, p. 287-839, 2015.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid on growth performance , serum biochemical parameters, nutrient digestibility and digestive enzymes activities of jejunal 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 Science**, New York, v. 167, p. 249-256, 2014.

FRANCO, L. D. et al. Effects of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 89, p. 88-93, 2005.

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

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 Science**, New York, 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, 2010.

HUANG, C. et al. Effects of *Lactobacilli* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. **Asian Australian Journal Animal Science**, Seoul, v. 17, p. 401-409, 2004.

JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 76, p. 626-631, 1994.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plants extracts. **Feed Mix**, Doetinchen, v. 9, p. 19-24, 2000.

LEVIĆ, J. et al. Herbs and organic acids as an alternative for antibiotic-growth-promoters. **Archiva Zootechnica**, Balotesti, v. 11, p. 5-11, 2008.

LI, S. Y. et al. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. **Livestock Science**, New York, v. 145, p. 119-123, 2012.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 161-168, 2016.

LIU, Y.; IPHIRRAGUERRE, I. R.; PETTIGREW, J. E. Digestive physiology of the pig symposium: potential applications of knowledge of gut chemosensing in pig production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 1982-1990, 2013.

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

NIU, C.; GILBERT, E. S. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 6951-6956, 2004.

PEDROSO, A. A. et al. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, p. 1225-1233, 2005.

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. P. Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, p. 1-7, 2013.

PLUSKE, J. R.; WILLIAMS, I. H.; AHERNE, F. X. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. **British Journal of Nutrition**, London, v. 76, p. 409-422, 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 cows' milk after weaning. **Animal Science**, Penicuik, v. 62, p. 145-158, 1996b.

RAO, D. S.; McCracken, K. J. Energy:protein interactions in growing boars of high genetic potential for lean growth. 1. Effects on growth, carcass characteristics and organ weights. **Animal Production**, Bletchley, v. 54, p. 75-82, 1992.

SAM, A. H. et al. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. **Neuropharmacology**, New York, v. 63, p. 46-56, 2012.

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

SCHULZE, H. et al. Dietary essential oil supplementation can affect broiler performance and digesta microbial community. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 46, p. 3-22, 2006.

SIRCILI, M. P. et al. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 2329-2337, 2004.

STEINERT, R. E. et al. Digestive Physiology of the Pig Symposium: Secretion of gastrointestinal hormones and eating control. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 1963-1973, 2013.

STURBELLE, R. T. et al. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 180, p. 245-252, 2015.

SUIRYANRAYNA, M. V. A. N.; RAMANA, J. V. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 6, p. 1-11, 2015.

TIIHONEN, K. et al. The effects of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British Poultry Science**, Edinburgh, v. 51, p. 381-392, 2010.

TREVESI, P. et al. Effect of dietary addition of thymol on growth, salivary and gastric function, immune response, and excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, in weaning pigs challenged with this microbe strain. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 6, p. 374-376, 2010.

VONDRUSKOVA, H. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. **Veterinary Research Institute**, Brno, v. 55, p. 199-224, 2010.

YANG, C. et al. Apical Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter 1 (SGLT1) activity and protein abundance are expressed along the jejunal crypt-villus axis in the neonatal pig. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 300, p. 60-70, 2011.

YANG, H. et al. Effects of weaning on intestinal upper villus epithelial cells of piglets. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, p. 1-20, 2016.

ZHANG, Z. F.; ROLANDO, A. V.; KIM, I. H. Effects of benzoic acid, essential oils and *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbiota and faecal gas emission in weanling pigs. **Journal of Applied Animal Research**, Izatnagar, v. 44, p. 173-179, 2016.