

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ÍNDICES PRODUTIVOS DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO BIOFLAVONÓIDES E
ÁCIDO ASCÓRBICO (EXTRATOS VEGETAIS)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Magali Fernandes de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**ÍNDICES PRODUTIVOS DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO BIOFLAVONÓIDES E
ÁCIDO ASCÓRBICO (EXTRATOS VEGETAIS)**

Magali Fernandes de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Carlos Augusto Rigon Rossi

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ÍNDICES PRODUTIVOS DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO BIOFLAVONÓIDES E
ÁCIDO ASCÓRBICO (EXTRATOS VEGETAIS)**

Elaborada por
Magali Fernandes de Oliveira
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Carlos Augusto Rigon Rossi (UFSM), Dr.
(Presidente/Orientador)

Marcelo Soares (UFSM), Dr.

Walter Lucca (IFRS-Campus Sertão), Dr.

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades concebidas, pelo auxílio e conforto em momentos difíceis e por ter me possibilitado exercer a profissão pela qual tenho um amor profundo.

Agradeço aos meus pais que me ofertaram todas as condições para que eu pudesse realizar meu maior sonho que é a Medicina Veterinária, profissão a qual escolhi por amor e que enche minha vida profissional e pessoal por consequência de alegria e pelo apoio de sempre.

Agradeço em todos os momentos ao meu amigo, companheiro, marido Luciano, por todo amor e dedicação proporcionado sempre para que eu possa conquistar os objetivos almejados. Obrigada por todo amor de sempre!!

Ao meu orientador Carlos Augusto Rigon Rossi, não somente pelos ensinamentos, paciência, mas por ser o modelo de profissional no qual posso me espelhar e procurar ser cada dia melhor.

Aos colegas que colaboraram com a execução do presente trabalho. Meu muito obrigada!

A Quinabra pelo aporte para que a execução do trabalho se tornasse possível

Aos laboratórios pela realização das análises.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma colaboraram ao longo da minha formação acadêmica e profissional até aqui e que direta ou indiretamente sempre contribuíram para que pudesse concretizar cada objetivo.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ÍNDICES PRODUTIVOS DE LEITÕES EM FASE DE CRECHE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO BIOFLAVONÓIDES E ÁCIDO ASCÓRBICO (EXTRATOS VEGETAIS)

AUTORA: MAGALI FERNANDES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO RIGON ROSSI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho, o perfil microbiológico, o perfil enzimático e a detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex de 40 leitões (fêmeas e machos) em fase de creche. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e sexo como fator de bloqueamento. Os tratamentos foram distribuídos em: T1 (controle); T2 (Extrato Vegetal (EV) (500ppm)); T3 (Amoxicilina (A) (20mg kg⁻¹) e T4 (A (20mg kg⁻¹) + EV (500ppm)). Não houve influência (P>0,01), entre os tratamentos para peso inicial e final e para ganho diário de peso, porém os machos do grupo controle apresentaram consumo diário médio de ração 1,8% superior (P<0,01) aos demais tratamentos. A contagem total de colônias bacterianas do grupo controle foi 35,9%, 70,9% e 63,8% superior (P<0,01) aos tratamentos com A, EV+A e EV, respectivamente. Em meio MacConkey, o grupo tratado com A foi 88,44%, 91,78% e 56,50%, superior (P<0,01) se comparados com EV+A, EV e controle, respectivamente. O antibiograma de 48 amostras de fezes mostrou que o disco de Amoxicilina foi 85,7%, 72,7%, 44,5% e 100% resistente nos tratamentos controle, EV, A e EV+A, respectivamente. Quanto a dosagem bioquímica CK, AST (U L⁻¹), AST, TBARS e a frequência dos genes de fímbrias (F41, F6 (987 P), F4 (K88), F18 e F5 (K99) e toxinas (LT, STx, LTa e LTb) de cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia usando a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes. Das 64 amostras 55 (85,93%) apresentaram genes para fímbrias e toxinas, 23 (35,93%) apresentaram genes somente para fímbrias e somente duas amostras apresentaram genes somente para toxinas. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada ou em associação com outros fatores foi: F41 (10,93%), F6 (21,87%), F4 (37,5%), F18 (70,31%), LT (39,6%), Stx

(42,18%), STa (60,93%) e STb (75%). Em todas as 64 amostras não foi encontrada nenhum dos fatores de virulência para F5 (k99). O uso de bioflavonoides e ácido ascórbico não afetou o desempenho de suínos na fase de creche. O uso de extratos vegetais e associados a Amoxicilina reduz a contagem de colônias bacterianas. Foi observada alta resistência das amostras estudadas à Amoxicilina, a Neomicina e a Norfloxacin. Os antimicrobianos Cefepine, Ceftriaxona e Meropenem foram os mais eficientes na inibição do crescimento das amostras de *E. coli* isoladas de suínos suplementados com ácido ascórbico e bioflavonóides. A suplementação de EV às dietas de leitões desmamados não altera os perfis enzimáticos (ALT, AST), muscular (CK) e oxidativo (TBARS). Os animais que receberam EV ou sua interação com amoxicilina apresentou genes para fímbrias e toxinas. A suplementação de EV às dietas de leitões desmamados não determinou a ausência de genes para a presença de fímbrias e toxinas. A presença de genes para fímbrias e toxinas não determina a ocorrência de diarreia, pois eles podem estar presentes, mas não estarem sendo expressos.

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUCTION INDICES OF PIGLETS IN NURSERY PHASE FED WITH DIETS CONTAINING BIOFLAVANOIDS AND ASCORBIC ACID (PLANTS EXTRACTS)

AUTORA: MAGALI FERNANDES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO RIGON ROSSI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

The objective of this study was to evaluate the performance, the microbiological profile, the enzyme profile and the detection of pathogenic strains by multiplex PCR of 40 weaned piglets (females and males). The experimental design was completely randomized with four treatments, five replicates and sex as a blocking factor. The treatments consisted of: T1 (control); T2 (Plant Extract (EV) (500 ppm)); T3 (Amoxicilin (A) (20 mg Kg⁻¹) and T4 (A (20 mg kg⁻¹)+EV (500ppm). There was no effect (P>0.01) between treatments for initial and final weight and gain daily weight, but the males in the control group had a mean daily consumption of 1.8% over diet (P<0.01) to the other treatments. The total count control of bacterial colonies was 35.9%, 70.9% and 63.8% higher (P<0.01) to treatment with A, EV+A and EV, respectively. In the midst MacConkey, the treated group A was 88.44%, 91.78% and 56.50%, higher (P<0.01) compared to EV+A, EV and control, respectively. The antibiogram 48 stool samples showed that Amoxicilin disk was 85.7%, 72.7%, 44.5% and 100% resistant in the control treatment, EV, A and EV+A, respectively. The bioflavonoids and ascorbic acid and the interaction with Amoxicilin not change the performance of pigs in the nursery phase, but reduce the colony count bacterianas. By the dosing biochemical CK, AST (U L-1), AST, TBARS and the frequency of fimbriae genes (F41, F6 (R 987), F4 (K88), F18 and F5 (K99) and toxins (LT, STx, STa and STb) of *E. coli* strains isolated from pigs with diarrhea using multiplex PCR with primers specific to these genes. Of the 64 samples 55 (85.93%) had genes for fimbriae and toxins, 23 (35.93%) had only genes for fimbriae and only two samples had genes for toxins only. The frequency of the detected virulence factors alone or in combination with other factors were: F41 (10.93%), F6 (21.87%), F4 (37.5%), F18 (70.31%), LT (39.6%), Stx (42.18%), STa (60.93%) and STb (75%). In all 64 samples was not found any of virulence factors for F5 (K99). The use of bioflavonoids and ascorbic acid did not change the performance of pigs in the weaned piglets. The use of plant extracts and associated with

Amoxicillin reduces the count of bacterial colonies. Showed high resistance of the samples studied to Amoxicillin, the Neomycin and Norfloxacin. The antimicrobial Cefepine, ceftriaxone, Meropenem were more efficient in inhibiting the growth of *E. coli* strains isolated from pigs supplemented with ascorbic acid and bioflavonoid. The EV supplementation to the diets of weaned piglets does not alter the enzymatic profiles (ALT, AST), muscle (CK) and oxidative (TBARS). Animals receiving IV or its interaction with Amoxicillin presented to fimbriae genes and toxins. EV supplementation to weanling pigs a diet did not cause lack genes for the presence of fimbriae and toxins. The presence of genes for fimbriae and toxins does not determine the occurrence of diarrhea, as they may be present, but are not being expressed.

LISTA DE TABELAS

Tabelas do Capítulo 2 - Artigo Científico I

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição centesimal das dietas de leitões em fase de creche suplementados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico (1) | 67 |
| Tabela 2. Desempenho de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico..... | 69 |
| Tabela 3. Contagem de colônias de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico..... | 70 |
| Tabela 4. Antibiograma (sensibilidade em %) de amostras de fezes de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico..... | 71 |

Tabelas do Capítulo 3 - Artigo Científico II

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Avaliação de CK ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico..... | 90 |
| Tabela 2. Avaliação de AST ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico..... | 91 |
| Tabela 3. Avaliação de ALT ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico..... | 92 |
| Tabela 4. Avaliação de TBARS (nmol) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico..... | 93 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|--|-----|
| APÊNDICE A - Instalações Setor de Zootecnia UFSM | 127 |
| APÊNDICE B - Instalações do Setor de Zootecnia UFSM. Ambiente climatizado..... | 128 |
| APÊNDICE C - Comedouro | 129 |
| APÊNDICE D - Coleta de sangue para avaliação bioquímica..... | 130 |
| APÊNDICE E - Coleta de fezes para avaliação microbiológica e posterior PCR..... | 131 |
| APÊNDICE F - Frasco para coleta de fezes com identificação da baia, tratamento, identificação do animal e sexo..... | 132 |
| APÊNDICE G - Gel para identificação das fímbrias da amostra 01 a 04..... | 133 |
| APÊNDICE H - Gel com identificação de fímbrias para amostras de 5 a 19..... | 134 |
| APÊNDICE I - Gel com identificação de fímbrias para amostras de 20 a 34 | 135 |
| APÊNDICE J - Gel com identificação de fímbrias para amostras de 35 a 49..... | 136 |
| APÊNDICE K - Gel com identificação de toxinas para amostras de 1 a 16..... | 137 |
| APÊNDICE L - Gel com identificação de toxinas para amostras de 17 a 20..... | 138 |
| APÊNDICE M - Gel com identificação de toxinas para amostras de 21 a 35..... | 139 |
| APÊNDICE N - Gel com identificação de toxinas para amostras de 21 a 35..... | 140 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| ALT | Alanino aminotransferase |
| AMPc | Adenosina monofosfato-cíclica |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CK | Creatinoquinase |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica |
| EV | Extrato vegetal |
| GMPC | Guanosina monofosfato cíclica |
| LDL | Low density lipoproteins (proteínas de baixa densidade) |
| LT | Toxina termolábil |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TGI | Trato Gastrointestinal |
| PKA | Capacidade de dissociação |
| pH | Potencial hidrogênionico |
| ST | Toxina termoestável |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO | 17 |
| 2.1 Aspectos fisiológicos no período pós desmame | 17 |
| 3 FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA EM SUÍNOS | 19 |
| 3.1 Transporte intestinal de água e eletrólitos | 19 |
| 3.2 Mecanismos secretórios | 21 |
| 3.3 Sistemas nervoso entérico | 21 |
| 3.4 Patogênias da diarreia pós-desmame | 22 |
| 3.5 Diarreia por má absorção | 24 |
| 3.6 Diarreia efusiva (inflamatória) | 26 |
| 4 <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGÊNICA | 27 |
| 5 DIAGNÓSTICOS DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>E. COLI</i> | 31 |
| 6 EXTRATOS VEGETAIS | 33 |
| 6.1 Generalidades sobre os extratos vegetais | 33 |
| 7 ACIDIFICANTES | 35 |
| 7.1 Uso de Acidificantes e Desempenho | 37 |
| 7.2 Justificativas para o uso de acidificantes em dietas de leitões recém-desmamados ... | 38 |
| 7.3 Mecanismos de ação dos acidificantes | 39 |
| 7.3.1 Redução do pH estomacal | 40 |
| 7.3.2 Ação bactericida ou bacteriostática | 41 |
| 7.3.3 Aumento da atividade enzimática e estímulo às secreções pancreáticas | 42 |
| 7.3.4 Alterações na morfologia intestinal e fornecimento de energia | 42 |
| 7.3.5 Outros possíveis mecanismos | 43 |
| 7.4 Antioxidantes naturais | 43 |
| 7.4.1 Ácido ascórbico | 44 |
| 7.4.2 Bioflavonóides | 47 |
| 7.4.3 Sinergismo entre bioflavonóides e ácido ascórbico | 49 |
| 7.4.4 Estresse oxidativo na fase pós-desmame | 49 |
| CAPÍTULO 2 | 51 |
| 8 ARTIGO I | 51 |
| Desempenho e perfil microbiológico de leitões alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico | 52 |
| Resumo | 52 |
| Abstract | 53 |
| Introdução | 54 |
| Material e métodos | 55 |
| Resultados e discussão | 57 |
| Conclusões | 63 |
| Agradecimentos | 63 |
| Referências | 63 |
| CAPÍTULO 3 | 72 |

| | |
|--|------------|
| 9 ARTIGO II..... | 72 |
| Leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico: determinação do perfil enzimático e detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex..... | 73 |
| Resumo | 73 |
| Abstract | 74 |
| Introdução | 75 |
| Material e métodos | 77 |
| Resultados e discussão..... | 78 |
| Conclusões | 84 |
| Agradecimentos | 85 |
| Referências | 85 |
| CAPÍTULO 4 | 94 |
| 10 DISCUSSÃO GERAL | 94 |
| CAPÍTULO 5 | 105 |
| 11 CONCLUSÕES GERAIS | 105 |
| REFERÊNCIAS | 106 |
| APÊNDICES | 126 |

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A cadeia suinícola é uma das grandes responsáveis pelo desenvolvimento econômico e social do Brasil uma vez que o país é o terceiro maior produtor mundial com aproximadamente 3,5 milhões de toneladas anuais (ABPA, 2013). No Brasil são abatidas 34,9 milhões de cabeças anualmente, o que representa uma taxa de desfrute do rebanho de aproximadamente 90 por cento. A região sul é responsável por 66% dos abates de suínos, Minas Gerais representa 11,8% e o restante 22,2% está localizado nos demais estados brasileiros (SEAB, 2013).

Nesse contexto, a busca por melhores índices produtivos pode estimular os suinocultores a avaliar diferentes técnicas de manejo. Uma delas é antecipar o manejo do desmame dos leitões, o que pode aumentar o estresse dessa categoria animal, principalmente o estresse de ordem nutricional. É interessante lembrar que os leitões, ao desmame, possuem o sistema gastrointestinal ainda imaturo, com baixa secreção de ácido clorídrico (HCl), e consequentemente insuficiente secreção enzimática. A soma destes fatores pode estimular as desordens digestivas (de ordem nutricional e patológicas), relacionadas ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos ao longo do trato digestivo. Assim, os efeitos negativos observados no processo de desmame indicam a necessidade de tentar encontrar alternativas nutricionais viáveis.

Para compensar os efeitos negativos da produção insuficiente de HCl no trato digestivo dos leitões recém desmamados, inúmeras alternativas nutricionais são propostas, entre elas a utilização de dietas acidificadas. O objetivo é formular dietas adequadas para esta fase do leitão (alta digestibilidade) e reduzir o pH do trato digestivo (KRYGIEROWICZ, 2010).

No desmame, o sistema digestório dos leitões ainda não está adaptado a realizar a digestão da dieta sólida constituída principalmente por alimentos de origem vegetal (SMINK, 2003). Diversos fatores contribuem para tanto, sendo um dos principais o valor do pH do conteúdo estomacal, que nessa fase encontra-se elevado, impedindo a ativação das enzimas proteolíticas (LINDEMAN, 1986), prejudicando o desempenho do leitão no pós-desmame e podendo aumentar a proliferação de microrganismos patogênicos no trato gastrintestinal,

ocasionando diarreias e mortalidades (TSILOYIANNIS et al., 2001). Desta forma justifica-se o estudo da inclusão de extratos vegetais na dieta de leitões desmamados na tentativa de prevenir as diarreias pós desmame que ainda é um desafio na suinocultura tecnificada e moderna.

O objetivo do estudo foi avaliar o desempenho de leitões no período de pós desmame com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico. Este documento é estruturado de forma sequencial em cinco capítulos, sendo estudo bibliográfico, artigo sobre: “Desempenho e perfil microbiológico de leitões alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico” e um segundo artigo: “Leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavanóides e ácido ascórbico: avaliação do perfil enzimático e detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex”, discussão geral e conclusões gerais.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

Neste capítulo é desenvolvido o tema de estudo abordando os aspectos fisiológicos no período pós desmame. Esses aspectos permitirão compreender e explicar as respostas de suínos alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico.

2.1 Aspectos fisiológicos no período pós desmame

A superação contínua dos resultados técnicos é um desafio que caracteriza a rotina da moderna suinocultura. Vários ganhos foram obtidos tanto no desempenho dos animais, devido ao melhoramento genético e ao aprimoramento dos conhecimentos sobre a nutrição e sanidade, bem como em ambiência, nas instalações e em reprodução (ANAMI et al., 2008). Entretanto, otimizar a produção exige certos procedimentos dentro da cadeia produtiva de suínos. Uma dessas práticas usuais, é a quebra do elo maternal do leitão através do desmame. Está é uma das fases mais crítica da produção de suínos, pois se trata de uma medida cercada de fatores, coletivamente, designados como estresse. Dentre eles a inadequação fisiológica do trato digestivo por ocasião do desmame é um dos maiores transtornos a nutrição do suíno nesta fase do desenvolvimento (MIGUEL, 2008).

É importante salientar que a digestibilidade do leite é alta (cerca de 95%), devido principalmente ao tamanho das partículas e a sua composição. Os lactobacilos que habitam o estômago fermentam a lactose produzindo ácido láctico, que é rapidamente absorvido e utilizado pelo suíno. Este ácido é o principal agente acidificador do estômago de suínos jovens (até aproximadamente 3 semanas de idade). Já o pH gástrico de suínos lactentes (pH entre 2 e 4), é capaz de auxiliar na digestão das proteínas e atuar como barreira mecânica na inativação de patógenos. Após esta idade, a secreção do ácido clorídrico aumenta gradativamente e tem grande ação acidificante (MORÉS et al., 1990).

Após o desmame, os leitões passam a consumir dietas secas, recebendo amidos, óleos e proteínas vegetais, para os quais não possuem o sistema enzimático adequadamente desenvolvido (BERTOL, 2000). Nesta fase, as dietas são elaboradas, contendo farelo de soja, o que provoca reações imunológicas de hipersensibilidade transitória no intestino. Essas reações produzem alterações nas vilosidades intestinais, o que prejudica a digestão dos

alimentos e a absorção de nutrientes (SANTOS et al., 2002). Assim, a baixa produção de enzimas digestivas somada a redução da área absorptiva do trato digestivo, podem predispor a incidência de diarreias, pois os nutrientes não digeridos e não absorvidos pelos leitões servem como substrato para fermentação microbiana (BRAZ et al., 2007).

Nesse contexto, o maior ou menor comprometimento dos leitões, no período do desmame e início da fase de creche, irá depender da interação entre fatores estressantes de origem psicológica, nutricionais e ambientais, aos quais os leitões são submetidos (CRENSHAW et al., 1986). Portanto, a mudança na alimentação de leitões, no desmame, geralmente é associada a um período de estresse e jejum que resulta em depleção do trato gastrointestinal e prejudica a absorção de nutrientes e também oportuniza a multiplicação de bactérias patogênicas causadoras de diarreia. A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), por exemplo, é uma das principais causas de diarreia pós desmame em leitões e acarreta grandes perdas econômicas para a fase de creche. A este cenário, soma-se a restrição gradual do uso de antibióticos pelo mercado e a constante busca por alternativas que garantam proteção aos leitões e evitem quedas de desempenho.

3 FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA EM SUÍNOS

Os mecanismos determinantes para manifestação clínica das infecções entéricas resultam primariamente de alterações fisiológicas no transporte intestinal de água e eletrólitos (ARGENZIO, 1992). O desequilíbrio entre os mecanismos absorptivos, secretórios e regulatórios inerentes ao epitélio intestinal resultam em perda de fluídos e comprometem a absorção de nutrientes. Destaca-se ainda que as similaridades das lesões e da patogênese dessas infecções em suínos e humanos permitem o desenvolvimento de modelos experimentais, nos primeiros, para estudos da fisiopatologia dessas enfermidades (SAIF et al., 1997).

3.1 Transporte intestinal de água e eletrólitos

A mucosa intestinal, revestida por epitélio simples colunar, é responsável pela secreção e absorção de água, eletrólitos e nutrientes. Essa camada simples está constantemente exposta a fatores exógenos, presentes no lúmen intestinal (por exemplo, nutrientes e patógenos), e sob influência de fatores intrínsecos do organismo, a partir da submucosa (por exemplo, peptídeos ativos, hormônios e mediadores inflamatórios) (JONES; BLIKSLAGER, 2002). Nesse contexto, o epitélio intestinal representa uma barreira seletiva regulada por mecanismos de transporte específicos e por junções intercelulares (*tight junctions*) (BERKES et al., 2003).

As principais células envolvidas no transporte de íons e nutrientes por meio da mucosa intestinal são os enterócitos maduros e as células das criptas intestinais (criptas de Lieberkühn) (HOLT; YEH, 1992). Os enterócitos maduros, presentes no ápice das vilosidades, são responsáveis pela absorção de nutrientes. As dissacaridases e peptidases são continuamente expressas na membrana apical dessas células e, por meio da hidrólise de carboidratos e proteínas da dieta, absorvem monossacarídeos, aminoácidos e peptídeos (HOLT; YEH, 1992). A atividade secretora dessas células é mínima, entretanto pode ser estimulada por toxinas e neurotransmissores (JONES; BLIKSLAGER, 2002).

As células das criptas representam o compartimento proliferativo, que originará enterócitos maduros e diferenciados. Essas células imaturas presentes na base das vilosidades

têm fundamental importância no processo de renovação celular, característico da mucosa do trato digestivo. Possuem também predominantemente funções secretórias por meio de canais iônicos (WELSH et al., 1982). Portanto, alterações nos mecanismos de absorção e na secreção intestinal estão associadas às características específicas do patógeno em colonizar diferentes regiões das vilosidades. O íon Na^+ é o principal eletrólito envolvido nos processos de absorção intestinal. Baixas concentrações de Na^+ intracelular permitem o transporte por meio da membrana apical de carboidratos, aminoácidos, peptídeos e vitaminas hidrossolúveis.

Os mecanismos de absorção desses nutrientes envolvem a ativação de transportadores acoplados ao Na^+ (WRIGHT, 1993). O exemplo clássico é o transporte de glicose acoplado ao Na^+ pelo cotransportador Na^+ /glicose (SGLT1). A ativação desse mecanismo permite a absorção de duas moléculas de Na^+ para cada molécula de glicose, carreando água, por osmose, por meio das junções intercelulares. Em seguida, a glicose é transportada na membrana basolateral, por difusão facilitada, e o Na^+ , por ativação da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase) (WRIGHT; LOO, 2000). Esse é o princípio básico da re-hidratação oral em casos de diarreia.

A hidratação com soluções contendo glicose estimula a absorção de Na^+ e água, assim, essas soluções são mais eficientes que soluções salinas (NaCl 0,9%) (ARGENZIO, 1980). A galactose é absorvida por esse mesmo processo. Contudo, a absorção de frutose ocorre por transportador específico (GLUT5), sem a necessidade de acoplagem com o Na^+ (RUMESSEN, 1992). Cotransportadores acoplados ao Na^+ também estão associados à absorção de aminoácidos, porém na proporção de um para um (1:1). O mecanismo mais importante na absorção intestinal de Na^+ ocorre por meio de trocas iônicas com íons H^+ realizadas por transportadores NHE. O acionamento desse mecanismo ocorre simultaneamente à ativação de transportadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, os quais permitem a transferência de íons Cl^- para o meio intracelular em troca de HCO_3^- para o lúmen intestinal.

Portanto, como resultado desse processo dinâmico, ocorre absorção de Na^+ e Cl^- associada à secreção de H^+ e HCO_3^- (ZACHOS et al., 2005). Os transportadores NHE são regulados pela concentração intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e pela ativação da proteína quinase A (PKA). Nesse sentido, toxinas bacterianas e processos inflamatórios que elevam a concentração intracelular de AMPc e, conseqüentemente, ativam a PKA, inibem a função dos NHE, estimulando os processos diarreicos (FORTE et al., 1992).

3.2 Mecanismos secretórios

Os processos secretórios do epitélio intestinal ocorrem predominantemente nas criptas de Lieberkühn e os eletrólitos envolvidos são Cl^- e HCO_3^- (WELSH et al., 1982). A secreção de íons Cl^- na membrana apical ocorre pela abertura de canais iônicos. O principal canal de Cl^- é o regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR). O nome dado refere-se à expressão anormal do gene codificador do CFTR em crianças com fibrose cística (ROGERS et al., 2008). Mensageiros intracelulares (AMPc e GMPc) regulam o funcionamento do CFTR por meio da ativação de proteínas quinases (ROGERS et al., 2008). Dessa forma, processos patológicos que resultam no aumento da concentração intracelular de AMPc estimulam a ativação da PKA e abertura dos canais iônicos CFTR com consequente secreção de Cl^- (VANUCCI; GUEDES, 2009). A concentração de íons Ca^{2+} presentes no citoplasma dos enterócitos é capaz de regular a abertura dos canais de Cl^- dependentes de Ca^{2+} (CaCC). Pode ocorrer ainda sinergismo entre os mensageiros intracelulares, potencializando o estímulo secretório de Cl^- (KEELY; BARRETT, 2000).

3.3 Sistemas nervoso entérico

O sistema nervoso entérico (SNE) é constituído por dois grandes plexos, submucoso e mioentérico, os quais são responsáveis pela regulação de estímulos motores e sensoriais (BENARROCH, 2007). Esse sistema é capaz de coordenar o funcionamento do trato gastrointestinal e regular os mecanismos secretórios e absorptivos pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (BENARROCH, 2007). A liberação de noradrenalina aciona mecanismos pró-absortivos pela ativação de receptores α_2 -adrenérgicos nos enterócitos (CHANG et al., 1982). Contrariamente, a acetilcolina e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) são os principais neurotransmissores envolvidos na estimulação dos processos secretórios. O SNE pode ser ativado por agentes tóxicos, estímulos endócrinos e mediadores inflamatórios, resultando no aumento da secreção intestinal (SPILLER, 2002). A estimulação local do SNE ocorre por arco reflexo. Nesse contexto, nervos sensoriais (via aferente) transmitem impulsos aos interneurônios (localizados nos plexo submucoso e mioentérico), os quais, por sua vez, comunicam-se com nervos motores (via eferente),

estimulando a liberação de neurotransmissores e peptídeos ativos (JONES; BLIKSLAGER, 2002). O conhecimento dos mecanismos regulatórios do SNE envolvidos no transporte de eletrólitos pelo epitélio intestinal tem contribuído para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas como a utilização de fármacos capazes de modular a resposta neurogênica.

3.4 Patogenias da diarreia pós-desmame

Os leitões adquirem os patógenos geralmente pela via fecal-oral. Uma vez instalada a infecção, ocorre a interação entre diversos mecanismos relacionados aos fatores de virulência do agente e de defesa do hospedeiro. Por exemplo, para causar a doença por *E. coli* ingerida, esta deve ser capaz de evitar os efeitos do peristaltismo intestinal, se aderir, multiplicar-se e ocasionar a diarreia secretória (FORTE et al., 1992).

A ativação súbita e descontrolada dos mecanismos secretórios da mucosa intestinal pode levar à desidratação intensa e, conseqüentemente, à morte. O principal íon envolvido na patogênese desse tipo de diarreia é o Cl⁻ (FORTE et al., 1992). A diarreia secretória mais frequente entre os animais domésticos está associada à infecção por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), sobretudo em leitões após o desmame e bezerros neonatos (NAGY; FEKETE, 1999). Os dois principais fatores de virulência da ETEC são as fímbrias (adesinas) e as enterotoxinas. A partir da interação específica entre as fímbrias adesivas expressas na parede celular bacteriana com receptores presentes na membrana celular dos enterócitos, ocorre a produção de enterotoxinas. Segundo MACEDO et al. (2007), as cepas F4 (K88), F18, F41 e F5 (K99) foram as mais prevalentes em um estudo realizado em leitões diarreicos no Estado de Minas Gerais. As enterotoxinas são divididas de acordo com sua estabilidade térmica: termolábeis (LT-I e LT-II) e termoestáveis (STa, STb e EAST1) (ZHANG et al., 2007). A ação dessas toxinas leva à ativação de mecanismos secretórios específicos no epitélio intestinal.

As LTs são imunologicamente distintas entre si, no entanto têm mecanismos de ação semelhantes. Ambas possuem uma subunidade B, que se liga ao receptor gangliosídeo (GM1) na membrana celular dos enterócitos, o que resulta na entrada da subunidade A, enzimaticamente ativa. A partir da clivagem dessa subunidade, formam-se dois domínios (A1 e A2) (SPANGLER, 1992). O domínio A1, presente no citoplasma celular, ativa a enzima adenilciclase, que catalisa a síntese de AMPc, que, por sua vez, ativa a PKA (HAMILTON et al, 1978; WIMER-MACKIN et al., 2001). Como consequência, ocorre fosforilação do CFTR

e inibição do NHE na membrana apical, o que induz aumento significativo na secreção de Cl⁻ e redução na absorção de Na⁺.

A toxina STa interage com o receptor transmembrana guanilciclase tipo C (GC-C), o que aumenta a concentração intracitoplasmática de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Esse evento ativa CFTR a partir da fosforilação da proteína quinase G (PKG) (GOLIN-BISELLO et al., 2005). Dessa forma, a ação da toxina STa também resulta no aumento da secreção de íons Cl⁻ e na inibição da absorção de íons Na⁺ (TIEN et al., 1994). A atividade biológica da EAST1 parece ser similar à atividade da STa. A partir da exposição da mucosa intestinal à EAST1, foi demonstrada a elevação na concentração intracitoplasmática de GMPc (SAVARINO et al., 1993). Esses autores acreditam que haja similaridade estrutural entre essas duas toxinas.

A atividade da STb ainda é pouco compreendida; entretanto, sabe-se que não há envolvimento de nucleotídeos intracitoplasmáticos (AMPc ou GMPc), como ocorre na LT e STa (DUBREUIL, 2008). O estímulo secretório induzido pela ação da STb envolve a ativação do sistema nervoso entérico (PETERSON; WHIPP, 1995). A prostaglandina E2 e a 5-hidroxitriptamina (5-HT), secretadas a partir das células enteroendócrinas, são as principais mediadoras envolvidas nos mecanismos secretórios decorrentes da ação da toxina STb (DUBREUIL, 1999).

Nos estágios agudos da infecção por ETEC, não ocorre nenhum tipo de alteração histológica evidente, visto que a patogênese envolve mecanismos estritamente bioquímicos pela ação de enterotoxinas (VANUCCI; GUEDES, 2009). Entretanto, secundariamente à perda de eletrólitos, pode ocorrer necrose isquêmica e atrofia de vilosidades em fases mais tardias (ROSE et al., 1987). A colibacilose pós-desmame em suínos é atribuída a infecções por cepas de *E. coli* produtoras de Shiga toxina (STx2e), que favorecem a doença do edema (WADDELL et al, 1998). A aderência bacteriana à mucosa intestinal é mediada pela fimbria F18. Em seguida, ocorre liberação e migração transepitelial dessa toxina e, como consequência, degeneração e necrose do endotélio vascular, sinais neurológicos e edema em vários tecidos. A inoculação experimental de altas doses de STx2e no lúmen intestinal não reproduziu a doença (GANNON; GYLES, 1990). Entretanto, Waddell & Gyles (1995), a partir da inoculação intragástrica de STx2e associada a um sal biliar (desoxicolato de sódio), que induz alterações na permeabilidade da barreira epitelial, conseguiram reproduzir a enfermidade. Dessa forma, esses autores sugerem que o aumento na permeabilidade da mucosa intestinal é pré-requisito para o desenvolvimento da doença do edema e

demonstraram associação entre a acidose intestinal e a doença do edema. Contudo, a patogênese dessa possível interação ainda não foi esclarecida (NABUURS et al. 2001).

3.5 Diarreia por má absorção

A ação direta de patógenos entéricos sob o epitélio intestinal induz a lise celular (MOON, 1978). Nesses casos, a intensidade da infecção e a morte celular superam a capacidade de renovação epitelial, levando à atrofia de vilosidades e, conseqüentemente, à redução na absorção intestinal. As alterações nos mecanismos de absorção são decorrentes da perda e fusão de vilosidades com redução na produção de enzimas digestivas e inibição da atividade biológica dos transportadores de membrana (ARGENZIO, 1992). As alterações morfológicas observadas na mucosa intestinal são caracterizadas pela substituição de células colunares maduras por células cubóides em processo de diferenciação (REYNOLDS et al., 1985).

A patogênese dessas infecções depende do local de replicação do agente nas vilosidades (ápice ou criptas). O terço apical das vilosidades é o local de predileção para a replicação desse agente (SAIF et al., 1997). A replicação viral no citoplasma dos enterócitos estimula a liberação de íons Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático (BRUNET et al., 2000). O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa uma série de mecanismos celulares, incluindo inibição da atividade do citoesqueleto nas microvilosidades, redução na expressão das dissacaridases e outras enzimas da superfície apical, inibição dos transportadores SGLT1 e necrose celular (PEREZ et al., 1998).

Os principais eventos que comprometem a funcionalidade dos processos de absorção ocorrem pela redução da atividade do SGLT1 e pela menor expressão de enzimas digestivas (dissacaridases) na superfície epitelial (HALAIHEL et al., 2000a). Com o aumento na permeabilidade da membrana celular, ocorre elevação de íons Na^{+} e decréscimo de íons K^{+} intracitoplasmáticos. Segundo Castillo et al. (1991), a alteração no equilíbrio dinâmico desses eletrólitos poderia comprometer a absorção de $NaCl$ e a ativação de transportadores SGLT1, como consequência, haveria maior perda de água e eletrólitos.

Não há dúvida com relação à importância dos mecanismos de má absorção, como exemplo podemos citar a rotavirose. No entanto, Vellenga et al. (1992), observaram a presença de diarreia aquosa em suínos experimentalmente infectados, associada à ausência de

lesões histológicas até 48 horas após a infecção, sugerindo envolvimento de mecanismos de secreção na patogênese da diarreia por rotavírose. Essa observação pode ser esclarecida a partir do reconhecimento de uma proteína não estrutural (NSP4) enterotoxigênica, produzida pelo rotavírus. A NSP4 atua como enterotoxina, a qual induz aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e, conseqüentemente, secreção de íons pelas criptas intestinais, mediada pela ativação de transportadores de Cl^- (BALL et al., 1996). Nesse caso, o mecanismo de secreção não envolve AMPc, pois camundongos ausentes de CFTR foram susceptíveis à infecção por rotavírus e à indução de diarreia por inoculação da enterotoxina NSP4 (MORRIS et al., 1999). Nesse contexto, sugere-se o envolvimento dos canais de Cl^- dependentes de Ca^{2+} (CaCC) na patogênese dessa infecção. Ainda, a NSP4 tem pouco efeito na indução de diarreia em animais adultos, possivelmente pela baixa expressão de CaCC. Essa toxina também é capaz de inibir especificamente a atividade do SGLT1, o que contribui para má absorção intestinal (HALAIHEL et al., 2000b).

Comparativamente, a enterotoxina viral (NSP4) e as bacterianas possuem em comum a característica de não causarem lesões morfológicas na mucosa intestinal; entretanto, as enterotoxinas bacterianas não possuem efeito direto sobre o SGLT1. Ainda, a secreção de Cl^- , na infecção por rotavírus, não é mediada por nucleotídeos (AMPc ou GMPc) e não envolve o CFTR, tal como ocorre nas diarreias por ETEC (LORROT; VASSEUR, 2007). Os mecanismos de ativação do sistema nervoso entérico (SNE), nas infecções por rotavírus, ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, não foi demonstrada experimentalmente a estimulação do SNE a partir da atividade biológica da NSP4 nas células das criptas (LUNDGREN et al., 2000).

Portanto, é possível que haja secreção de citocinas e prostaglandinas por células infectadas presentes no terço apical das vilosidades, com posterior ativação do SNE e estimulação dos mecanismos secretórios nas células das criptas (CASOLA et al., 1998). Segundo Lundgren et al. (2000), aproximadamente 67% da atividade secretória, nas infecções por rotavírus, ocorre em decorrência da ativação do SNE. Os principais neurotransmissores envolvidos no estímulo secretório são a 5-HT e o VIP, indicando uma possível ativação de arco reflexo local (KORDASTI et al., 2004).

3.6 Diarreia efusiva (inflamatória)

A penetração do agente na célula hospedeira é determinada pela interação de vários fatores de virulência. O principal mecanismo de invasão está associado à ativação do sistema de secreção tipo III pela bactéria, que permite o transporte de proteínas bacterianas para o citoplasma do enterócito e a posterior indução do processo inflamatório (GALYOV et al., 1997). Alguns autores demonstraram como ocorre a ativação dos mecanismos secretórios, determinada pelo acúmulo de líquido no lúmen intestinal após a infecção experimental com *S. entérica* Typhimurium (GIANNELLA et al., 1975; GRONDAHL et al., 1998).

A *E. coli* é um habitante natural do intestino grosso do homem e animais cuja colonização ocorre logo após o nascimento (BARNES, 1986). Relativamente pouco é conhecido acerca dos fatores que estimulam a colonização intestinal de recém-nascidos. Ao nascimento, o intestino é estéril e estimula um meio ideal para o rápido crescimento de bactérias adquiridas do ambiente. Na maioria dos animais, os microrganismos colonizadores iniciais são: cepas de *E. coli* não patogênicas, *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp. e *Lactobacillus* spp. Mais tarde, bactérias anaeróbicas facultativas removem o oxigênio, e as anaeróbicas se tornam predominantes (BARNES, 1986). É importante salientar que embora a *E. coli* faça parte da microbiota intestinal, alguns sorotipos podem ser associados com patologias intestinais e extraintestinais no homem e animais (DE GRAAF; MOOI, 1986). Colibacilose é um termo genérico que abrange várias doenças associadas com cepas patogênicas de *E. coli* (MARTINEAU et al., 1995).

Além de ser considerada a principal responsável por diarreia em leitões em fase de creche, a colibacilose apresenta índices de mortalidade que podem atingir 25 por cento (HAMPSON, 1994).

4 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, da qual compreende 5 espécies, designadas: *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanni*, *Escherichia vulneris*, sendo que a espécie de maior importância é *Escherichia coli* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Este microrganismo foi primeiramente descrito pelo pediatra e bacteriologista alemão Theodor Escherich (1857-1911) em neonatos (GYLES, 1994). São bactérias Gram-negativas não esporuladas, anaeróbias facultativas, apresentam-se como bastonetes (FAIRBROTHER, 2005; GYLES, 1994).

A *E. coli* é comensal do intestino da maioria dos animais, incluindo o homem (DRASAR; HILL, 1974). Contudo, em casos de baixa imunidade do hospedeiro, até mesmo cepas não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (DRASAR; HILL, 1974). A principal fonte de contaminação para suínos suscetíveis são as fezes. Uma vez eliminada no meio ambiente, a bactéria pode sobreviver por até 11 semanas quando em condições ideais de temperatura e umidade (BURROWS; RANKIN, 1970; BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). Além disso, esta bactéria é um dos principais patógenos isolados de infecções do trato urinário, causando significativa percentagem de morte e descarte de fêmeas suínas (BRITO et al., 1999).

A *E. coli* cresce facilmente em meios de cultura como ágar MacConkey, formando grandes colônias vermelhas (GYLES; FAIRBROTHER, 2004). Sob avaliação bioquímica, ela apresenta reação positiva para o Indol, negativa para a produção de Urease e Sulfito de hidrogênio e não utilização do Citrato como fonte de carbono (DEBROY; MADDOX, 2001). Essas provas permitem sua distinção entre as *Enterobacteriaceae*. Sendo o microrganismo mais presente em amostras de fezes e integrante da microbiota saprófita intestinal, é muito importante que seja feita a distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas (DEBROY; MADDOX, 2001).

A tipificação sorológica é fundamental para caracterização da espécie. Este agente é classificado em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica; antígenos somáticos (O) para os sorogrupos e antígenos flagelares (H) para os sorotipos. Pode, ainda, expressar antígenos capsulares (K) e fimbriais (F), que são importantes na patogênese (NATARO; KAPER, 1998). Para tanto, são utilizados anti-soros; contudo estes estão disponíveis apenas para um grupo reduzido de cepas (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER,

1999). Assim, a detecção de fatores de virulência que são específicos a cada patotipo é importante para identificação e classificação de *E. coli* (GYLES et al., 2004).

As adesinas fimbriais medeiam a fixação da bactéria a superfície das células epiteliais e iniciam a colonização bacteriana (ZHANG et al., 2007). Em suínos as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987p) e F41 estão relacionadas com distúrbios entéricos na fase de lactente e as fímbrias F4 (K88) e F18 (F107), com os quadros de enterite ou doença do edema na fase pós desmame. Outros fatores de virulência importantes na patogenia das enfermidades são as toxinas de *E. coli*, as quais se classificam em endotoxinas e exotoxinas, e têm papel importante nas diarreias dos suínos e bovinos, na doença do edema dos suínos, infecções urinárias dos humanos e nas doenças respiratórias das aves (MORRIS; SOJKA, 1985).

Determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas proteicas que podem exercer um papel importante na patogenia das doenças, tais como: hemolisina, colicina, enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina termoestável (ST), verotoxina ou Shiga-toxina (VT ou Stx) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (BRITO et al., 2001). Smith & Halls (1967), foram os primeiros a identificar uma proteína secretada pela bactéria, responsável pelo acúmulo de líquido em testes realizados em alças de intestino de coelho e suíno. Além disso, demonstraram que esta toxina mantinha sua atividade após aquecimento a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente, GYLES & BARNUM (1969), identificaram outra toxina produzida por cepas de *E. coli* implicada em diarreias de suínos. Porém, esta era inativada por aquecimento a 65°C durante 30 minutos e relacionava-se antigenicamente com a toxina colérica. SMITH & GYLES (1970), estabeleceram as relações entre as duas enterotoxinas e denominaram-nas de ST e LT.

Burgess et al. (1978), demonstraram que há dois tipos de ST. Uma designada STa, que se caracteriza por ser solúvel em metanol, de baixo peso molecular (aproximadamente 2.000 daltons) e ativa no intestino de camundongos neonatos; a outra chamada STb, insolúvel em metanol, inativa em camundongo neonato, porém ativa no intestino de leitões desmamados. Whipp (1991), demonstrou a atividade biológica da STb em diversas espécies de animais de laboratório. Os termos ST-I e ST-II foram mais tarde usados como sinônimos para STa e STb, respectivamente.

A enterotoxina LT é uma molécula proteica de alto peso molecular (86.500 daltons), imunogênica, formada por duas subunidades denominadas de A e B. A subunidade A representa o componente ativo, enquanto a subunidade B é responsável pela fixação da toxina aos gangliosídeos presentes na membrana das células da mucosa do hospedeiro (SUSSMAN, 1985). O mecanismo de ação da toxina LT é idêntico ao da toxina colérica. Não ocorre um

dano estrutural em nível celular, mas sim o bloqueio de suas funções, por isso a enterotoxina LT vem sendo chamada de citotonina para diferenciá-la das citotoxinas, que causam dano estrutural em nível celular. Em células de linhagem de adrenal de camundongo (Y-1), de ovário de hamster chinês (CHO) e de rim de macaco verde africano (VERO) esta toxina apresenta efeito citotônico (SPEIRS et al., 1977).

As verotoxinas são exotoxinas termolábeis, cujo peso molecular varia de 70.000 a 88.500 daltons. Similarmente a LT, elas são constituídas por uma subunidade A, enzimaticamente ativa, e cinco subunidades B, com função de acoplamento a receptores celulares. As verotoxinas inibem a síntese proteica por inativação catalítica da sub-unidade ribossomal 60S (GYLES, 1992). Estas toxinas se classificam em dois tipos: Stx1 e Stx2, que são sorologicamente distintas e apresentam efeito citotóxico em células VERO e células de adenoma de útero humano (HeLa) (RYCKE et al., 1989). O efeito citotóxico caracteriza-se por arredondamento celular, morte e descolamento do tapete de células (KONOWALCHUK et al., 1977). Os genes que codificam as Stx1 e Stx2 estão relacionados a bacteriófagos (SMITH et al., 1983).

A Stx2 variante (Stx2e) apresenta atuação importante nos quadros de doença do edema dos suínos e diferencia-se por não causar efeito citopático em células HeLa (IMBERECHTS et al., 1992). Ao menos cinco categorias de cepas de *E.coli* envolvidas na doença intestinal são reconhecidas com base nas diferenças entre os aspectos clínicos e epidemiológicos e nos determinantes específicos de virulência: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAaggEC). A *Escherichia coli* com adesina difusa (DAEC) tem sido reconhecida como a sexta classe *E. coli* diarreica (CHAHUDURI; HENDERSON, 2012; CHOI et al, 2002).

A patogenia da *E. coli* (ETEC), é desencadeada pela ação de toxinas termo estáveis STa (STI), STb (STII), toxina termolábil (LT) e a toxina EAST 1 (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). A toxina STa divide-se ainda em STh, composta por 19 aminoácidos e oriunda de cepas isoladas de humanos, e STp composta por 18 aminoácidos e inicialmente detectada em suínos. Essa toxina se liga a receptores transmembrana guanilato ciclase resultando em aumento de GMP cíclico, que por sua vez ativa as enzimas quinases intracelulares, culminando na secreção de íons cloro e água, além de inibir a absorção de cloreto de sódio (DUBREUIL, 2008).

A enterotoxina STb é mais associada com isolados de suínos, apesar de também ter sido encontrada em humanos. Ela é internalizada e uma vez dentro do enterócito, desencadeia

influxo de íons cálcio que acarreta na formação de prostaglandina E2, a qual regula o transporte de água e eletrólitos para fora das células (KAPER et al, 2004).

A toxina termolábil (LT) é composta por LT I, presente em cepas de *E. coli* patogênicas para humanos e animais e LT II, encontrada primariamente em isolados de animais. Após se ligar a receptores de membrana, a toxina é endocitada e seu alvo é a adenilato ciclase presente em membranas basolaterais. Ao estimular a adenilato ciclase, ocorre um aumento nos níveis de AMP cíclico que leva à ativação da proteína quinase e consequente fosforilação de canais de íons cloro presentes em membranas. Seu efeito final é a secreção de cloro nas células das criptas e inibição da absorção de cloreto de sódio (NATARO; KAPER, 1998). LT II, por sua vez, provoca elevação nos níveis de AMP cíclico intracelular por mecanismos semelhantes aos já citados.

5 DIAGNÓSTICOS DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *E. COLI*

O diagnóstico de infecções causadas por *E. coli* é realizado pela observação dos sinais clínicos característicos, dados epidemiológicos e exames laboratoriais, sendo estes essenciais para a caracterização de isolados patogênicos, pois este microrganismo é comensal da urina e fezes de animais saudáveis (BRITO et al., 2004). O cultivo desta bactéria em laboratório pode ser realizado em meio de cultura sólido, no qual as colônias são observadas após 24 horas de incubação, apresentando aspecto mucóide. Alguns isolados apresentam hemólise em meio de ágar sangue ovino 5%, sendo este um critério utilizado na determinação do potencial patogênico de *E. coli* (BRITO et al., 2004). Entretanto, colônias não hemolíticas também podem apresentar fatores de virulência. Em ágar Mac Conkey, caracteriza-se por fermentar a lactose, o que auxilia na diferenciação de outras bactérias de origem entérica (SCHIERACK et al., 2006)

E. coli é identificada por diferentes características bioquímicas, como ausência da enzima citocromo oxidase, produção de Indol, redução de nitratos, fermentação da glicose e outros carboidratos, produção de gás. A maioria dos isolados não produz ácido sulfídrico (H₂S) (QUINN et al., 1994, STROHL et al., 2004). Contudo, a identificação fenotípica deve ser utilizada com prudência, por não apresentar 100% de fidedignidade, pois aproximadamente 10% das cepas são lactose negativa, e 1% das cepas não produzem Indol, que se constitui no principal teste para diferenciação de *E. coli* dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* (NATARO; KAPER, 1998). Além disso, está sujeito à subjetividade da leitura e interpretação dos testes.

Na maior parte dos casos, somente o isolamento de *E. coli* a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal pode não ser suficiente para o diagnóstico da enfermidade. A sorotipificação do isolado é também importante para caracterização da espécie. Este agente é classificado sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica; antígenos somáticos (O) para os sorogrupos e antígenos flagelares (H) para os sorotipos. Pode, ainda, expressar antígenos capsulares (K) e fimbriais (F), que são importantes na patogênese (NATARO; KAPER, 1998). A classificação sorológica do microrganismo é, no entanto, limitada, pois somente algumas cepas de *E. coli* possuem anti-soros disponíveis para sorotipificação.

Outros fatores importantes podem ser utilizados para caracterização deste agente, como as exotoxinas produzidas pela bactéria, que atuam diretamente no intestino, além de

endotoxinas presentes na parede celular, hemolisinas, sideróforos e adesinas (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). A técnica de PCR tem sido amplamente utilizada para caracterização da patogenicidade de *E. coli* pela detecção dos diferentes fatores de virulência e caracterização dos patotipos (BRITO et al., 1999; BEIER et al., 2005). Esta metodologia apresenta como vantagens a rapidez na obtenção dos resultados, alta sensibilidade e especificidade. No entanto, é uma técnica que necessita de padronização, sendo muitas vezes considerada onerosa, de acordo com a quantidade de *primers* utilizados, além da necessidade de pessoal treinado para a execução da mesma (QUINN et al., 1994, STROHL et al., 2004).

6 EXTRATOS VEGETAIS

A utilização de extratos vegetais e plantas medicinais em humanos data de milhares de anos, desde o Egito, China, Índia e Grécia (KAMEL, 2000). Vários destes extratos vegetais têm fornecido a base para modernos medicamentos, tais como a digoxina da planta digitalis e a efedrina da planta chinesa na “Huang” (BRUGALLI, 2003). Os efeitos benéficos das plantas geralmente são associados com a constituição de seus princípios ativos e compostos secundários (PEREIRA; CARDOSO, 2012) Assim, levando em consideração a enorme variedade de plantas existentes, constituídas por inúmeras substâncias, o grande desafio na utilização de extratos vegetais como alternativa ao uso de antimicrobianos está na identificação e avaliação dos efeitos exercidos pelos diferentes componentes dos extratos, sobre o organismo animal (KAMEL, 2000).

6.1 Generalidades sobre os extratos vegetais

Os princípios ativos dos extratos vegetais são componentes químicos, presentes em todas as partes específicas da planta e responsáveis por alguma atividade terapêutica (MARTINS et al., 2000). Os princípios ativos dos vegetais são moléculas de baixo peso molecular oriundas do metabolismo secundário dos vegetais (HUYGHEBAERT, 2003). Estes compostos são produzidos como um mecanismo de defesa da planta contra fatores externos, tais como estresse fisiológico, fatores ambientais e proteção contra predadores e patógenos (HUYGHEBAERT, 2003). Assim, a composição dos constituintes metabólicos de uma planta pode variar de acordo com o tipo de planta, local de origem e condições climáticas durante seu desenvolvimento. Outra fonte de variação que deve ser levada em consideração são os métodos de extração/destilação e estabilização utilizados, bem como o tempo e condições de armazenamento (HUYGHEBAERT, 2003).

As substâncias ativas das plantas medicinais podem ser classificadas de acordo com suas características físicas, químicas ou atividade biológica. Os principais grupos existentes são: alcalóides (álcoois, aldeídos, cetonas, éter, ésteres, lactonas), glucosídeos, compostos fenólicos, saponinas, mucilagens, flavonóides, terpenóides (mono e sesquiterpenos e esteróides), taninos e óleos essenciais (MARTINS et al., 2000; HUYGHEBAERT, 2003).

Portanto, estas substâncias ativas geralmente não se encontram na planta em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam sua ação sobre o organismo em questão (OETTING, 2005).

Os princípios ativos dos extratos vegetais são absorvidos no intestino pelos enterócitos e metabolizados rapidamente no organismo animal. A maior parte dos compostos e seus metabólitos são eliminados pelos rins e pelos pulmões. A rápida metabolização e a curta meia vida dos compostos ativos levam a crer que existe um risco mínimo de acúmulo nos tecidos (KOHLERT et al., 2000)

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais não é totalmente compreendido, no entanto, sugere-se a ruptura da membrana por 12 terpenóides e compostos fenólicos, bem como a quelação de metais por fenóis e flavonóides, e efeito sobre o material genético por cumarina e alcaloides são pensados para inibir o crescimento de microrganismos. O alvo exato dos agentes antimicrobianos naturais, muitas vezes não é conhecido ou bem definido, dificultando o conhecimento do local específico de ação onde ocorrem as reações (NEGI, 2012).

7 ACIDIFICANTES

Os acidificantes estão inseridos no grupo dos aditivos zootécnicos, denominados como quaisquer substâncias utilizadas para influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais (BRASIL, 2004). São denominados de equilibradores da microbiota intestinal, a qual se define como microrganismos que formam colônias ou outras substâncias definidas quimicamente que, administradas aos animais, têm efeito positivo para a microbiota intestinal (BRASIL, 2004). Ainda segundo o mesmo autor, os acidificantes podem ser orgânicos ou inorgânicos, e quando adicionados a alimentação animal reduzem o pH do trato digestivo anterior, com o objetivo de facilitar o processo de digestão e diminuir a quantidade de microrganismos patogênicos no estômago e no intestino.

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de diversos alimentos, e contém uma ou mais carboxilas em sua molécula. Em nutrição animal, são ácidos fracos de cadeia curta que produzem menor quantidade de prótons por molécula ao se dissociarem. Os ácidos orgânicos apresentam efeitos fisiológicos relacionados com o sistema imune, com o esvaziamento gástrico e pela absorção de minerais e água (HENRY et al., 1987). O uso de ácidos orgânicos na dieta animal não é um conceito novo, pois foram utilizados em pesquisas na década de 1960, como forma de controlar a diarreia pós-desmame (SINDIRAÇÕES, 2005). Na década de 1980, seu uso foi intensificado na alimentação de suínos em substituição aos antibióticos, principalmente para leites na fase de desmame (HENRY et al., 1987)

Os ácidos orgânicos adicionados às dietas reduzem o pH da dieta e do trato gastrointestinal (TGI). Isto corrige o aumento do pH resultante da redução da secreção ácida gástrica e dos efeitos ligadores de ácidos dos ingredientes alimentares (MORÉS et al., 1990). Essa redução do pH estimula a atividade das enzimas digestivas nos microvilos (envolvidos no processo de digestão dos nutrientes), e auxilia na criação de um ambiente intestinal favorável ao crescimento dos microrganismos benéficos (EWING; COLE, 1994). Além disso, inibe o desenvolvimento de microrganismos patogênicos no intestino (*E. coli*, por exemplo), os quais competem com o animal pelos nutrientes (CROMWEL, 1991). Desse modo, a acidificação das dietas controla a proliferação de bactérias patogênicas, podendo melhorar o desempenho do animal (MACARI; MAIORKA, 2000).

Uma característica interessante dos acidificantes é a capacidade de não deixar resíduos na carcaça e não estimular o aparecimento de bactérias resistentes (CHERRINGTON et al., 1991). Além disso, os ácidos orgânicos apresentam ação bacteriostática, pois, quando

absorvidos pelas bactérias, alteram o DNA celular e impedem a sua multiplicação (LANGHOUT, 2000). A eficiência antimicrobiana dos ácidos depende de sua capacidade de dissociação (pKa), pois quanto maior o pKa de um ácido, mais eficiente ele será como preservante.

Os ácidos orgânicos podem ter efeitos direto ou indireto sobre as bactérias. O efeito indireto é exercido por aqueles que apenas reduzem o pH inicial do TGI e o efeito direto é exercido pelos ácidos orgânicos que apresentam propriedades extras, pois além de reduzirem o pH, alteram o complexo enzimático intracelular das bactérias patogênicas (VAN DEN BROEK, 2000). Segundo este autor, os ácidos fórmico, acético, propiônico e sórbico são os que apresentam efeito direto, e por isso possuem grande potencial para substituírem antibióticos como olaquinox e carbadox. Os ácidos orgânicos mais utilizados em suínos são o acético (KRABBE, 2001), o fórmico, o propiônico, o láctico, o fumárico e o cítrico (PARTENEN, 2002).

A quantidade de acidificante a ser adicionado a dieta e o alcance dos objetivos em adicioná-lo dependerá de fatores como seu pH, sua capacidade tamponante, a idade dos animais, a composição da dieta e do acidificante, a presença ou ausência de antimicrobianos e características físico-químicas dos ingredientes da dieta (KRYGIEROWICZ, 2010). A adição de acidificantes (ácidos orgânicos ou inorgânicos), em dietas para leitões vem sendo estudada com a finalidade de melhorar a digestão através da redução do pH do trato digestivo e, por possuírem efeitos antibacterianos, especialmente contra bactérias Gram-negativas (SILVA JR., 2009). As bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis aos ácidos com menos de oito carbonos, enquanto as bactérias Gram-positivas apresentam sensibilidade aos ácidos com cadeias maiores e moléculas mais lipolíticas (PARTENEN e MROZ 1999; BEST, 2000; CANIBE et al., 2001).

A melhora na digestibilidade dos nutrientes da dieta de suínos com a adição de 2% de ácido fumárico também já foi relatada por Blank et al. (1999), assim como a melhora no desempenho relatada por Braz et al. (2011), utilizando misturas de acidificantes (propiônico, acético, fórmico, fosfórico, cítrico e benzóico). Contudo, outros estudos mostram que nem sempre os resultados com o uso de acidificantes são satisfatórios.

7.1 Uso de Acidificantes e Desempenho

O aumento da taxa de crescimento pós- desmame e a eficiência na utilização da dieta tem sido observado pela suplementação às dietas de leitões com ácidos orgânicos puros ou suas misturas e/ou seus sais (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993; KYRIAKIS et al.,1996). Sabe-se também que o efeito dos ácidos orgânicos sobre o desempenho varia (PARTANEN; MROZ, 1999). Em um trabalho realizado por BRAZ et al (2007), onde o grupo avaliou o ganho de peso e consumo médio diário de ração de leitões, observou-se dados semelhantes ao trabalho de Partanen e Mroz (1999), que verificaram que os acidificantes ajudam a contornar os problemas de baixo desempenho no pós-desmame. Este resultado, talvez possa ser justificado pela presença de ácido láctico na dieta. Durante a fase de lactente, a presença de ácido láctico formado pela ação dos *Lactobacillus* sobre a lactose é responsável pela acidificação no estômago dos leitões (ROSTAGNO; PUPA, 1998).

De acordo com Partanen e Mroz (1999), o ácido láctico pode estimular o funcionamento do intestino, atuando de maneira positiva na microbiota intestinal e, segundo Costa et al (2007), em condições de baixo desafio em que foi realizado o trabalho, os dados do estudo confirmam que, de 1 a 14 dias após o desmame, dietas com ácido láctico resultam em maior ganho de peso e melhor conversão alimentar. A melhora na CA dos animais com a utilização de acidificantes na dieta corrobora os resultados obtidos por Manzanilla et al. (2006), em que a acidificação da dieta com 0,03% de butirato melhorou a CA para o período de duas semanas após o desmame. O bom desempenho dos animais com a utilização de ácidos orgânicos pode ter ocorrido pelo maior aproveitamento da proteína da dieta. Outra hipótese é a ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos, especialmente contra *Escherichia coli*, responsável pela redução do crescimento e mortalidade dos animais no período do pós-desmame (KIRCHGESSNER; ROTH, 1982). Por outro lado, os dados do presente estudo diferem daqueles obtidos por Krause et al. (1994), que não observaram diferenças significativas na CA dos animais com a adição de ácidos orgânicos às dietas.

Avaliando a acidificação de dietas para leitões, outros pesquisadores também não observaram efeito no CR dos animais no período pós-desmame (RISLEY et al., 1991). Em outras pesquisas, porém, a inclusão de 2,0% de ácido propiônico na dieta diminuiu o CR Giesting; Easter (1985), enquanto a inclusão dos ácidos propiônico, láctico, fórmico, málico, cítrico e fumárico Tsiloyiannis et al. (2001), e de uma mistura acidificantes Kirchgessner; Roth, (1982) aumentou o CR para todos os ácidos testados. Os autores concluíram que o

aumento do consumo deve estar relacionado com a melhora na palatabilidade das rações acidificadas.

A adição nas dietas de leitões desmamados de ácidos orgânicos e seus sais isoladamente, como ácido fumárico Giesting; Easter (1991), ácido láctico Tsiloyiannis et al. (2001), Silva (2002), formiato de cálcio Partanen; Mroz (1999), Bosi et al. (2005), ou em combinação como ácido láctico, ácido fórmico e ácido fosfórico Freitas et al. (2006), têm resultado em benefícios no desempenho, enquanto outras pesquisas tem demonstrado respostas negativas no desempenho de leitões resultantes do uso de ácido fórmico Manzanilla et al. (2004), e mistura de ácidos fumárico e fórmico (GOMES et al., 2007). A divergência nas respostas ao uso de acidificantes nas dietas de leitões recém-desmamados pode estar relacionada às diferenças na composição em matérias primas das dietas experimentais (GRECCO, 2014).

7.2 Justificativas para o uso de acidificantes em dietas de leitões recém-desmamados

Os acidificantes produzem acidez, a qual por sua vez age como flavorizante e retardam a degradação enzimática oxidativa. Eles atuam também como agentes complexantes que se liga a metais e formam complexos metálicos (previnem ou reduzem a oxidação). Agem ainda, diretamente como inibidores do crescimento microbiano, o que os torna eficiente na preservação de grãos e rações e como promotor de crescimento (FRANÇA, 2008).

Para a eficiente digestão de proteínas necessita-se a manutenção de um pH gástrico baixo, pois o baixo pH do estômago ativa as enzimas proteolíticas, tais como a pepsina (KIDDER; MANNERS, 1978). Além disso, as condições ácidas desempenham um papel importante na prevenção da passagem de bactérias patogênicas para o trato gastrointestinal inferior (MAXWELL; STEWART, 1995).

A produção de ácido clorídrico (HCl) é um dos principais determinantes do pH do estômago, e maior produção de HCl leva a um pH inferior do estômago. No entanto, leitões recém-desmamados têm um pH desfavoravelmente alto no estômago, devido à sua capacidade limitada pela secreção de uma quantidade adequada HCl (KIDDER; MANNERS, 1978), o que resulta em reduzida digestão proteica a partir de dietas sólidas. Além disso, a maior entrada de proteína não digerida no duodeno pode acelerar o crescimento de bactérias

patogênicas na parte inferior do trato gastrointestinal (SMITH; JONES, 1963; PARTANEN; MROZ, 1999).

Ravindran e Kornegay (1993), observaram que o baixo desempenho e uma alta taxa de diarreia em leitões recém-desmamados levam a uma redução na digestão de proteínas e desenvolvimento de bactérias patogênicas. Para superar o pH do estômago em leitões recém-desmamados, os nutricionistas defendem a acidificação da dieta através da adição de ácidos (RAVINDRAN; KORNEGAY 1993). Tem sido proposto que a dieta acidificante reduz o pH do estômago e TGI de leitões desmamados. Em experimentos com leitões, a acidificação da dieta têm sido utilizada com o objetivo de diminuir o pH do estômago, pelo menos em pequena medida, mas observou-se em alguns estudos pouca influência sobre o pH do trato gastrointestinal posterior (KIL; KWON, 2011).

Outros estudos não observaram alterações em populações microbianas ao oferecer acidificantes na dieta, mas tem-se reportado uma ligeira redução de lactobacilos ou bactérias lácticas produtoras de ácido no trato gastrointestinal. (SCHÖNER, 2001). Em muitos casos, os acidificantes parecem melhorar a digestão de proteínas, apesar de oferecer resultados variáveis com respeito à digestibilidade dos aminoácidos e melhora no crescimento (KIL; KNOW, 2011). No entanto, a resposta de crescimento tem sido inconsistente com relação a diferentes fontes e níveis de inclusão de acidificantes. A informação sobre o modo de ação dos acidificantes na dieta é bastante limitada e existem grandes variações nos resultados sobre seus efeitos (KIL; KNOW, 2011).

7.3 Mecanismos de ação dos acidificantes

Os ácidos são doadores de prótons (H^+) enquanto que as bases são receptoras. Cada ácido possui tendência característica de perder seus prótons quando em uma solução aquosa e esta é uma das características que diferencia um ácido do outro (LEHNINGER, 1990). Ainda segundo Lehninger (1990), quanto mais forte um ácido maior será sua tendência de perder prótons H^+ e sua constante química de equilíbrio para reações de ionização e separação da fração H^+ e OH^- do ácido, na qual é conhecida como constante de ionização ou dissociação e é designada pelo termo pK (p denota o “logaritmo negativo de”).

Ácidos mais fortes possuem sua constante de dissociação (K) maior enquanto que ácidos mais fracos possuem sua constante de dissociação menor. Isto implica que, quanto

maior a dissociação de um ácido menor será seu valor de pK e quanto menor sua tendência de dissociação maior será seu valor de pK (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993; PARTANEN; MROZ, 1999).

A adição de acidificantes à dietas de suínos desmamados requer uma compreensão clara do seu modo de ação. Alguns pesquisadores propuseram que a adição de acidificantes alimentares para dietas de suínos, correlaciona-se principalmente com a diminuição do pH no estômago e trato gastrointestinal inferior, modulação de populações microbianas e melhoria na digestão de nutrientes, apesar de outros investigadores especularem sobre outros possíveis mecanismos (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993; PARTANEN; MROZ, 1999).

7.3.1 Redução do pH estomacal

A adição de acidificantes nas dietas diminui o pH de forma dose-dependente. Afigura-se que o valor de pKa de acidificantes e a quantidade de outros componentes alimentares (tais como produtos lácteos e suplementos minerais que possuem alta capacidade de ligação de ácidos) afetam o grau de redução do pH (KIM et al., 2005). Em geral, a adição de acidificantes alimentares diminui o pH do estômago em suínos recém-desmamados (PAPATSIROS et al., 2012). Nem todos os ácidos têm efeitos na microflora intestinal, sendo que os ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana são aqueles de cadeia curta com até sete átomos (PAPATSIROS et al., 2012). Em 17 experimentos realizados com leitões no período de pós desmame, 19 dos 25 grupos que haviam sido suplementados com acidificantes diminuíram o pH estomacal quando comparados com o grupo controle (KIL; KNOW, 2011).

De acordo com Schöner (2001), a adição de ácidos orgânicos nas dietas induz uma redução mais rápida do valor de pH no estômago, o que resulta em um tempo mais curto para alcançar o pH ótimo de 4 a 3, o qual é necessário para a ativação do pepsinogênio em pepsina. Esta resposta leva a uma melhoria da digestibilidade das proteínas, além do aumento na atividade de outras enzimas. Os produtos resultantes da digestão das proteínas pela pepsina no estômago chegam ao duodeno e estimulam a secreção de enzimas pancreáticas e bicarbonato, no qual pode apresentar função significativa sobre a regulação do esvaziamento gástrico, que se torna mais lento (LEHNINGER, 1990). Assim, a redução do pH e o esvaziamento gástrico podem tornar as proteínas mais hidrolisadas e favorecer seu processo de digestão (ROCHA et al., 2008).

7.3.2 Ação bactericida ou bacteriostática

Os ácidos exercem suas ações de duas formas diferentes, porém relacionadas. Primeiramente existe efeito no meio extracelular pela acidificação estomacal por um ácido em sua forma dissociada e a segunda consiste além da acidificação do meio, na ação de ácidos na forma não dissociada agindo diretamente sobre os microrganismos (RODRIGUEZ-PALENZUELA, 2000).

A absorção dos ácidos orgânicos se dá rapidamente quando o valor do pH luminal é menor do que o pKa dos ácidos. O pKa de um ácido é o valor de pH em que 50% do ácido encontra-se na forma ionizada, sendo determinado pelo logaritmo negativo da constante de ionização do ácido, ou seja K_a , que por sua vez, indica a força do ácido, portanto sua tendência em doar prótons. Por serem expressos de forma logarítmica, uma unidade de pH acima do pKa de um ácido indica que 90% do ácido encontra-se na forma não dissociada e, com duas unidades de pH acima do pKa, 99% do ácido estarão não dissociados (BELLAYER; SCHEUERMANN, 2004). O pKa da maioria dos ácidos encontra-se entre 3-5 (THOMPSON; HINTON, 1997). Quando o ácido está na forma ionizada pode difundir-se livremente através da membrana semipermeável do microrganismo para seu citoplasma celular e, dentro da célula para um ambiente mais alcalino, libera o próton, resultando na diminuição do pH intracelular (CANIBE et al, 2001). Isso influencia no metabolismo microbiano, inibindo a ação de importantes enzimas e forçando a célula bacteriana a usar energia para liberar prótons conduzindo a um acúmulo intracelular de ânions e redução da sua taxa de crescimento (RUSSEL, 1992).

De acordo com Viola e Vieira (2007), os ácidos na forma não dissociada são lipossolúveis, e penetram passivamente na célula microbiana e liberam prótons e ânions, sendo que os radicais H^+ e o COO^- causam redução do pH intracelular, acúmulo de ânions polares dentro da célula. Isto inibe a ação de enzimas e resulta na morte do microrganismo. Como mecanismo de resistência, as células dos microrganismos reagem bombeando os íons H^+ para fora, tentando manter o pH constante. Isto, faz com que haja gasto de energia e redução do crescimento celular (BELLAYER; SCHEUERMANN, 2004), além de provocar inibição da síntese de DNA e RNA e outras moléculas microbianas (MONTEIRO, 2007).

O aumento do pH interno das células interfere em seu metabolismo, interfere no sistema de transporte de aminoácidos e fosfato. Ainda, acarreta aumento na turgidez celular pelo aumento da quantidade de ânions, o que gera mecanismo compensatório de cargas

elétricas e por consequência, obriga as células a aumentarem os níveis de Na⁺, K⁺, e/ou glutamato, que causa aumento adicional da força iônica intracelular e turgência (RODRIGUEZ-PALENZUELA, 2000). Em síntese o baixo pH reduz patógenos como *E. coli* e *Salmonella*, pois não são capazes de sobreviver em pH ácido (SANTOS et al., 2003).

7.3.3 Aumento da atividade enzimática e estímulo às secreções pancreáticas

Este é um mecanismo que ocorre em função da redução do pH gastrointestinal. Tal acidificação influencia o aumento da secreção enzimática pelo pâncreas, resultando no aumento da digestibilidade das dietas, assim como da digestibilidade íleal verdadeira dos aminoácidos (PARTEN, 2001). De acordo com Parten (2001), o aumento da secreção enzimática pelo pâncreas em resposta a acidificação do TGI poderia resultar no aumento da digestibilidade das dietas mais simples e da digestibilidade íleal verdadeira dos aminoácidos. A acidificação do conteúdo gastrintestinal acarreta no aumento da atividade da pepsina melhorando a digestibilidade proteica, e, portanto o efeito dos ácidos orgânicos sobre a digestibilidade dos nutrientes pode estar relacionado tanto com a acidificação do estômago como do intestino (BURNELL et al, 1998).

7.3.4 Alterações na morfologia intestinal e fornecimento de energia

A digestão incompleta de carboidratos e proteínas somados ao pH mais elevado do estômago, também pode propiciar meio rico em substratos para bactérias nos intestinos delgado e grosso, provocando desequilíbrio e favorecendo o crescimento de patógenos como, *Escherichia coli*, *Streptococcus* e *Clostridium* (MOLLY, 2011). Estes podem aderir-se à mucosa intestinal e, durante o processo de fermentação, produzir toxinas como cadaverina, putrescina, tiramina, histamina e outras aminas, agravando os danos ao epitélio intestinal (MOLLY, 2011).

Cunningham (1992), afirmou que a integridade epitelial é fundamental para o desenvolvimento da capacidade digestiva dos leitões, e também para conferir uma barreira ao ataque de microrganismos. Segundo Silva (2011), quando há ação de patógenas ou altas

condições de estresse, há perda de eletrólitos e aumento de endotoxinas séricas, pois ocorre interferência nas funções da barreira intestinal.

Alguns produtos como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), considerados agentes tróficos, podem interagir com a mucosa, acelerando processos mitóticos, agindo no aumento do número de células e tamanho das vilosidades, e na nutrição local, havendo assim estímulo ao crescimento por nutrientes específicos (SILVA, 2011).

Os acidificantes servem então como substrato energético, agem na estimulação do desenvolvimento da mucosa intestinal, e assim, causando aumento na produção e crescimento das células epiteliais da mucosa, proporcionando dessa forma maior capacidade de absorção e aproveitamento dos nutrientes (MROZ, 2005).

7.3.5 Outros possíveis mecanismos

Alguns trabalhos propuseram que os ácidos orgânicos podem estimular o metabolismo intermediário de nutrientes em animais, levando a uma melhor energia e utilização de nutrientes, e ácidos orgânicos como ácido fumárico podem servir como fontes de energia imediatas, particularmente para as células epiteliais intestinais (RAVINDRAN e KORNEGAY, 1993; PARTANEN e MROZ, 1999). Em teoria, esses papéis regulatórios da acidificação da dieta parecem ser aceitáveis, pelo menos em alguma extensão. No entanto, pouca evidência experimental apoia estes mecanismos em suínos (KIL e KWON, 2011).

7.4 Antioxidantes naturais

A análise da atividade antioxidante de compostos naturais teve início com Chipault em 1952, trabalhando com especiarias, ingredientes utilizados nos alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar suas características sensoriais, mas também, para preservá-los (EXARCHOU et al., 2002). Antioxidantes naturais são substâncias químicas naturalmente encontradas na composição de alimentos de origem vegetal e que possuem efetiva atividade antioxidante (RODRIGUES et al., 2003). A atividade dos antioxidantes naturais é também de interesse tecnológico, pois o processamento e obtenção de alimentos com elevado teor destas substâncias supõem uma redução da utilização de

antioxidantes sintéticos, possibilitando a obtenção de alimentos mais saudáveis que podem ser incluídos no grupo dos alimentos funcionais (THEROND et al., 2000; WEBER; ANTIPATIS, 2001).

7.4.1 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ou cítrico é produzido por fermentação, apresenta-se cristalino e inodoro, com sabor azedo agradável, geralmente é menos efetivo como agente antimicrobiano que outros ácidos orgânicos, particularmente porque muitos microrganismos podem metabolizá-lo e também devido ao baixo pKa (PARTANEN et al., 1999). O ácido cítrico é metabolizado através do ciclo do ácido cítrico e pode atuar como uma fonte de energia (PARTANEN; MROZ, 1999). O ácido cítrico é disponível comercialmente na forma monohidratado ou anidro. Ajuda a preservar a textura, coloração, o aroma e o conteúdo de vitaminas dos alimentos, sendo particularmente usual como agente quelante (VIOLA; VIEIRA, 2007).

Em outro estudo, Tsiloyiannis et al. (2001b), avaliaram leitões desmamados com doença do edema e diarreia causada por *E. coli*. Estes animais foram suplementados com ácido láctico (1,6%), ácido cítrico (1,5%) ou antibiótico enrofloxacina (50ppm). Os resultados mostraram que todos os grupos suplementados apresentaram baixa mortalidade em relação ao grupo controle e melhor desempenho para crescimento e conversão alimentar.

O ácido cítrico é um ácido orgânico fraco e é o principal ácido encontrado nas frutas cítricas. É usado como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante, dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e bebidas. Entre os ácidos orgânicos é o que se apresenta menos efetivo como agente antimicrobiano, visto que muitos organismos podem metabolizar o citrato e também devido ao seu pKa (3,1-4,8) (VIOLA; VIEIRA, 2004)

As vitaminas são substâncias orgânicas que agem em pequenas doses, sem qualquer valor energético intrínseco (PENTEADO, 2000). A descoberta do ácido ascórbico (Vitamina C ou ácido Cevitâmico) foi originada dos estudos realizados para detectar a substância existente nas frutas e verduras, que impedia a proliferação do escorbuto entre os marinheiros em longas viagens (ARANHA et al., 2000). Durante vários anos tentou-se isolar a vitamina C na sua forma pura. Foi o médico Albert Szentgyorgyi que, em 1928, conseguiu isolar esta

vitamina, dando-lhe o nome de ácido hexurônico. Ele descobriu ainda que sua fórmula é $C_6H_8O_6$. Em 1932, o isolamento da vitamina C em forma cristalina pura foi obtido independentemente por dois grupos de pesquisadores (ARANHA et al., 2000).

A estrutura química foi identificada e o produto sintetizado sob a forma fisiologicamente ativa pouco depois. Em 1938, o ácido ascórbico foi oficialmente aceito como nome químico da vitamina C (ARANHA et al., 2000). A vitamina C está presente naturalmente em alimentos sob duas formas: a forma reduzida (geralmente designada como ácido ascórbico) e a forma oxidada (ácido desidroascórbico).

A absorção do ácido ascórbico ocorre no jejuno e íleo, que são porções distais do intestino delgado, sendo para isto necessária a presença de sódio na luz intestinal (KRINSKY et al., 2000). A vitamina C é transportada no plasma sob a forma de um ânion livre, sendo transferida por difusão simples no interior dos leucócitos e dos eritrócitos. Quando a oferta de ácido ascórbico aumenta, a ascorbemia também aumenta, o que resulta num nível da vitamina compreendido entre 1,2 e 1,5 $mg\ dl^{-1}$ ($68-85\ \mu mol\ L^{-1}$) (PENTEADO, 2000).

O ácido ascórbico administrado em altas doses, após atingir concentração máxima nos tecidos, sofre eliminação do excesso através da urina. Os principais metabólitos do ácido ascórbico excretados na urina, além do ácido ascórbico inalterado, são o ácido desidroascórbico, o ácido oxálico e o ácido 2,3-dicetogulônico. Seus teores na urina estão relacionados com as espécies animais e, também com o teor de ácido ascórbico administrado (ARANHA et al., 2000; KRINSKY et al., 2000).

O ácido ascórbico se distribui em todos os tecidos do organismo. Embora o fígado seja o local de síntese do ácido ascórbico no suíno, sua concentração nos tecidos varia consideravelmente (MAHAN et al., 2004). Concentrações mais elevadas ($>1mg\ g^{-1}$ de tecido) do ácido ascórbico são observadas nas glândulas pituitária e adrenal e humor aquoso do olho; concentrações moderadas ($0,25-0,75mg\ g^{-1}$ de tecido) são observadas no baço, timo, tireóide, paratireóide, no cérebro e na íris; concentrações menores ($<0,25mg\ g^{-1}$ de tecido) estão no fígado, rins, pulmões, coração, olho de lombo e plasma sanguíneo (MAHAN et al., 2004).

O ácido ascórbico é uma molécula usada como antioxidante e na síntese do colágeno, e em processos de hidroxilação e secreção hormonal. Como antioxidante envolve as espécies reativas de oxigênio (ROS), tornando-as menos reativas, mas também está envolvido no desenvolvimento do esqueleto fetal e no crescimento e manutenção do tecido gonadal (MAHAN et al., 2004). Atua na formação dos glóbulos vermelhos do sangue, absorção e utilização do ferro e na manutenção e integridade das paredes dos capilares. No plasma pode doar elétrons para várias espécies reativas, retornando facilmente ao seu estado reduzido,

eliminando-as antes que reajam com as membranas e lipoproteínas biológicas (WHITEHEAD; KELLER, 2003).

O ácido ascórbico atua como antioxidante através de dois mecanismos: (a) pode ser facilmente oxidado a ácido desidroascórbico em uma reação reversível. Assim, o sistema redox forma uma interconversão entre ambas as moléculas. Esta interconversão forma a base para muitas das ações fisiológicas do ácido ascórbico. (b) pode formar um radical ascorbato formando mais uma rota de atividade antioxidante, a qual destrói os radicais livres originados a partir do oxigênio, como o hidroxil, o oxigênio simples e o superóxido. Neste mecanismo pode apresentar ação sinérgica com outras enzimas protetoras como superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e catalase (WHITEHEAD; KELLER, 2003).

Dentro da célula, o ascorbato remove moléculas de oxigênio reativo, superóxidos, hidroxila e radicais livres, produzidos pelo metabolismo normal. O ascorbato perde um elétron na presença de um agente oxidante (elétron receptor) e forma um radical ascorbato livre. Embora o radical ascorbato livre possa ser reversivelmente reduzido a ascorbato e dinucleotídeo de adenina nicotinamida semidesidroascorbato, são formados o ácido hidroascórbico ou ácido semidesidroascórbico (MAHAN et al., 2004). De qualquer forma podem ser reversivelmente convertidos em ácido ascórbico, ou a estrutura do ácido desidroascórbico do anel pode ser quebrada formando o 2,3 diceto-1-ácido gulônico e excretado pelos rins (LEHNINGER et al., 2007).

O antioxidante lipídeo-solúvel nas membranas celulares é o α -tocoferol que pela peroxidação é convertido em quinona tocoferol e então reconvertido a sua forma ativa pela doação de elétrons ou da glutaciona ascorbato. Se localizado na bicamada da membrana, os elétrons podem ser transferidos a partir do ascorbato para o espaço extracelular. Não há evidência de que a peroxidação lipídica ocorre a partir dos análogos do ácido ascórbico (BERGER et al., 1997).

Adicionalmente, o ácido ascórbico facilmente perde seus elétrons, sendo um dos antioxidantes mais eficazes solúveis em água (MAHAN et al., 2004). A vitamina C desempenha um papel central no controle de reações oxidativas na célula em função do acúmulo de ROS, os quais podem afetar a estabilidade do DNA, do processo de transcrição, ou da integridade da membrana. O ascorbato extracelular pode evitar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LEHNINGER et al., 2007).

Na presença de Fe^{3+} livre ou Cu^{2+} , o ácido ascórbico reduz cada um desses metais para Fe^{2+} , ou Cu^{1+} , respectivamente (STADTMAN, 1991). Estes elementos são

sequestrados biologicamente (por exemplo, Fe em ferritina), impedindo assim a forma mais oxidada de ter efeitos nocivos sobre os tecidos (MAHAN et al., 2004).

7.4.2 Bioflavonóides

Os bioflavonóides ou flavonóides foram descobertos em 1930, por Szent-György que extraiu a citrina da casca do limão, substância que possui a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Assim, esta classe de produtos naturais foi inicialmente denominada de vitamina P (de permeabilidade) e também de vitamina C₂, pois apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Estes compostos podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários das plantas, que derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA₂ e que participam na fase dependente de luz da fotossíntese, durante a qual catalisam o transporte de elétrons (GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2002).

Os bioflavonóides são compostos de baixo peso molecular, com uma estrutura base C₆-C₃-C₆ (dois anéis fenil A e B ligados através de um anel pirano C). Dependendo da substituição e do nível de oxidação no anel C₃, os bioflavonóides podem ser divididos em 14 classes (flavanóis, flavonóis, flavonas, antocianidinas, isoflavonóides, flavononas, etc.) (GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2002). Dentro da mesma classe, os bioflavonóides diferem na substituição dos anéis A e B. Estes se encontram na natureza sob a forma de glicosídeos, o que melhora a absorção intestinal e a bioavaliabilidade destes compostos (PINELO et al., 2006). Os glicosídeos formam-se através da união de resíduos de D-glucose na posição 3 ou na posição 7 destes bioflavonóides, sendo a primeira substituição a mais frequente. Outros resíduos de açúcares encontrados ligados a estes compostos são a D-galactose, a L-ramanose, a L-arabinose, a D-xilose e o ácido D-glicurônico (GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2002).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos bioflavonóides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídios (ISHIWA et al., 2000), a agregação plaquetária e de ativar sistemas enzimáticos, incluindo cicloxigenases e lipoxigenases (HOMMA et al., 2000). Esses efeitos são devidos a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (COOK; SAMMAN, 1996; SILVA et al., 2001). Outros estudos mostram que os bioflavonóides quercetina, rutina e naringina inibem a biossíntese de eicosanóides (resposta antiprostanóide e antiinflamatória) (PELZER et al., 1998), protegem a

oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), previnem agregação plaquetária e estimulam o relaxamento do músculo liso com efeitos anti-hipertensivo e antiarrítmico (KATZUNG, 2006).

Os bioflavonóides apresentam ainda ações anti-inflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas e imuno-estimulantes (ERLUND, 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005). A resposta imuno-estimulante dos bioflavonóides ocorre, quando as células imunologicamente competentes são ativadas frente a organismos estranhos ou substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. Muitos dos efeitos antiinflamatórios e cardiovasculares dos bioflavonóides e compostos fenólicos interferem no metabolismo final do araquidonato (ERLUND, 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005).

O ácido araquidônico é um ácido graxo que serve como precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, os quais são potentes mediadores intracelulares, que controlam uma variedade de processos complexos no organismo. A propriedade apresentada pelos bioflavonóides em inibir tanto a via da ciclooxigenase quanto da 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato pode contribuir para as propriedades anti-inflamatórias (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os produtos da ação das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase são as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, também denominados eicosanóides. Esses compostos são agentes homeostáticos, envolvidos na manutenção da integridade dos sistemas inflamatório, cardiovascular e renal. O desequilíbrio na homeostase dos leucotrienos pode resultar em respostas inflamatórias com distúrbios respiratórios, como asma e rinite alérgica, artrite e desordens inflamatórias no intestino (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os bioflavonóides inibem, *in vitro*, a peroxidação lipídica, no estágio de iniciação, por atuar como antioxidante, eliminando o ânion superóxido e radicais hidroxilas. Os bioflavonóides interrompem a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de bioflavonóide. O radical bioflavonóide, então, reage com o radical livre, terminando, assim, a propagação da reação em cadeia (COOK; SAMMAN, 1996).

Portanto, além dos efeitos anti-inflamatórios, os bioflavonóides podem ter efeitos biológicos em diferentes vias, em vários componentes do sangue, como as plaquetas, monócitos, LDL e tecido muscular liso. As plaquetas têm papel chave na aterogênese e são mediadores pró-inflamatórios como os tromboxanos A (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

7.4.3 Sinergismo entre bioflavonóides e ácido ascórbico

O sinergismo entre os bioflavonóides e ácido ascórbico, presentes nos extratos cítricos, estão relacionados à redução do dano oxidativo (NIJVELDT et al., 2001). A ação antioxidante destes compostos aumenta a imunidade mediada ou não por células, o que diminui a susceptibilidade dos animais às doenças causadas pelo estresse (PETERSON; DWYER, 1998).

Segundo Mariano (2003); Sebastian (2003), citado por Batista (2005), por motivo do seu mútuo poder antioxidante, os flavonóides e o ácido ascórbico apresentam efeitos sinérgicos nas seguintes atividades: Os flavonóides estão relacionados na redução do dano oxidativo na superfície dos fibroblastos, ação potencializada pela presença do ácido ascórbico. Também melhoram a imunidade entérica porque aumentam a fagocitose, e incrementam a eficiência dos capilares intestinais, durante os processos de absorção de nutrientes, além de melhorar a absorção de antibióticos.

O ácido ascórbico e os flavonóides aumentam a resistência dos capilares sanguíneos ao diminuir os níveis de colesterol-LDL (NIJVELDT et al., 2001). Como antioxidantes, o ácido ascórbico e os flavonóides estão relacionados com o aumento da imunidade mediada ou não por células, ação ocorrida em parte pela manutenção da estrutura funcional e a integridade estrutural de células importantes do sistema imunológico (Linfócitos T e B) (PETERSON; DWYER, 1998).

Essa proteção resulta em uma maior eficiência produtiva pela diminuição da susceptibilidade dos animais as doenças causadas pelo estresse e, conseqüentemente, diminuição das taxas de morbidade e mortalidade (PETERSON; DWYER, 1998).

7.4.4 Estresse oxidativo na fase pós-desmame

A produção mitocondrial de ATP consiste basicamente na oxidação do H₂ para a formação de H₂O sendo a principal via de produção de energia da célula animal. Cerca de 90% de O₂ absorvido pelos animais é utilizado pela mitocôndria e quase sua totalidade forma H₂O na cadeia respiratória (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No entanto 1 a 4 % do O₂ consumido é convertido em O₂ (superóxido) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) devido a perda

de elétrons na mitocôndria (TURRENS et al., 1982), podendo dar origem a radicais OH (hidroxila), os quais tem sido chamados coletivamente de radicais livres ou espécies reativas de hidrogênio (TURRENS et al., 1982). Em determinadas situações de estresse, pela ativação imune, observa-se que as defesas antioxidantes do organismo podem estar sobrecarregadas (STOREY, 1996), provocando um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (WEISS; MAHAN, 2008; HARRELL et al., 2008; STOREY, 1996). Caso este desequilíbrio seja favorável às moléculas oxidantes, pode haver injurias histológicas e fisiológicas e até morte celular, acarretando redução do desempenho (HARREL et al., 2008; WELCH, 2002) e caracterizando o estresse oxidativo.

Na fase pós desmame, as concentrações séricas de diversos antioxidantes diminuem acentuadamente nos leitões, modificando o *status* antioxidante do animal, como a diminuição na concentração de alfa-tocoferol na maioria dos tecidos (LAURIDSEN, 2008, 2010; WEISS; MAHAN, 2008). Ingredientes de baixa qualidade na dieta, condições de ativação imune, estresse ambiental e características genéticas podem predispor os leitões ao estresse oxidativo (BANDEIRA et al., 2007; HARREL et al., 2008). Nessas condições, é prudente reforçar o sistema antioxidante do animal através da dieta (WEISS; MAHAN, 2008).

CAPÍTULO 2

8 ARTIGO I

**Desempenho e perfil microbiológico de leitões alimentados com dietas contendo
bioflavonóides e ácido ascórbico**

**Magali F. de Oliveira⁽¹⁾, Carlos A. R. Rossi⁽¹⁾, Matheus S. Lucca⁽¹⁾, Marcelo Soares⁽¹⁾,
Vladimir de Oliveira⁽²⁾ e Vagner L.F. Martins⁽¹⁾**

Artigo submetido a Revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira), e apresentado de acordo
com as normas da revista

**Desempenho e perfil microbiológico de leitões alimentados com dietas contendo
bioflavonoides e ácido ascórbico**

**Magali F. de Oliveira⁽¹⁾, Carlos A. R. Rossi⁽¹⁾, Matheus S. Lucca⁽¹⁾, Marcelo Soares⁽¹⁾,
Vladimir de Oliveira⁽²⁾ e Vagner L.F. Martins⁽¹⁾**

⁽¹⁾Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Clínica de Grandes Animais, CEP 97105-900, Av. Roraima, nº 1.000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: magalifernandesoliveira@gmail.com, carlos.rossi.mv@gmail.com, schardonglucca@gmail.com, marcello1646@gmail.com, martinsvagnerlf@hotmail.com ⁽²⁾

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Zootecnia, CEP 97105-900 Av. Roraima, nº 1.000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: vladimir.oliveira@ufsm.br.

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho e perfil microbiológico de 40 leitões (fêmeas e machos) em fase de creche. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e sexo como fator de bloqueamento. Os tratamentos foram distribuídos em: T1 (controle); T2 (Extrato Vegetal (EV) (500ppm)); T3 (Amoxicilina (A) (20mg kg⁻¹) e T4 (A (20mg kg⁻¹) + EV (500ppm). Não houve influência (P>0,01), entre os tratamentos para peso inicial e final e para ganho diário de peso, porém os machos do grupo controle apresentaram consumo diário médio de ração 1,8% superior (P<0,01) aos demais tratamentos. A contagem total de colônias bacterianas do controle foi 35,9%, 70,9% e 63,8% superior (P<0,01) aos tratamentos com A, EV+A e EV, respectivamente. Em meio MacConkey, o grupo tratado com A foi 88,44%, 91,78% e 56,50%, superior (P<0,01) se comparados com EV+A, EV e controle, respectivamente. O antibiograma de 48 amostras de fezes mostrou que o disco de Amoxicilina foi 85,7%, 72,7%,

44,5% e 100% resistente nos tratamentos controle, EV, A e EV+A, respectivamente. Os bioflavonoides e ácido ascórbico e a interação com Amoxicilina não alteram o desempenho de suínos na fase de creche, porém reduzem a presença de colônias bacterianas.

Termos de indexação: Amoxicilina, creche, colônias bacterianas, *E. coli*, extrato vegetal.

Performance and microbiological profile of piglets fed diets containing bioflavonoids and ascorbic acid

Abstract. - The objective of this study was to evaluate the performance and microbiological profile of 40 pigs (females and males) in the nursery phase. The experimental design was completely randomized with four treatments and five replications sex as a blocking factor. Treatments were arranged in T1 (control); T2 (Plant Extract (EV) (500ppm)); T3 (Amoxicilin (A) (20 mg kg⁻¹) and T4 (A (20 mg kg⁻¹) + EV (500ppm). There was no effect (P>0.01) among treatments for initial and final weight and gain daily weight, but the males in the control group had daily feed intake 1.8% higher (P<0.01) than the other treatments. The total count of bacterial colonies in the control was 35.9%, 70.9% and 63.8% higher (P<0.01) for treatments A, EV and EV+A, respectively. In MacConkey medium, the treated group A was 88.44%, 91.78% and 56.50%, higher (P<0.01) compared to EV+A, EV and control, respectively. The antibiogram of the 48 stool samples showed that hard Amoxicilin was 85.7%, 72.7%, 44.5% resistant and 100% in control treatments, EV, EV+A and A, respectively. The bioflavonoids and ascorbic acid and the interaction with Amoxicilin does not alter the performance of pigs in the nursery phase, but reduces bacterial colony count.

Index terms: Amoxicilin, bacterial colony, *E. coli*, nursery, plant extract.

Introdução

A superação contínua dos resultados técnicos é um desafio que caracteriza a rotina da moderna suinocultura. Vários foram os ganhos obtidos com o melhoramento genético, o aprimoramento dos conhecimentos sobre a nutrição e sanidade, ambiência, instalações e reprodução. Não obstante, há vários desafios a serem vencidos em todos os setores da produção de suínos, pois mesmo com as modernas ferramentas disponíveis, os leitões ainda sofrem com as enteropatias (Anami et al., 2008).

As diarreias, assim como outras doenças que acometem o trato digestivo dos suínos, são multifatoriais e os principais agentes envolvidos são o *Clostridium perfringens* tipo A ou tipo C, a *Escherichia coli* enterotoxigênica, a *Isospora suis*, o rotavírus e o vírus da gastroenterite transmissível dos leitões (Yaeger et al., 2007; Hur & Lee, 2012). Em uma rápida reflexão sobre a ocorrência das diarreias de suínos, o que determina a importância desses episódios são fatores como o número de doentes, o curso da doença, o grau de desidratação dos leitões afetados, a mortalidade especificamente devida ao problema, a repetição de episódios em diferentes lotes e as quantidades e eficiência das medicações e vacinações em curso (Barcellos et al., 2011).

As diarreias cursam com sinais clínicos como perda de solutos e água, depleção de eletrólitos, desequilíbrio ácido-básico e desidratação, que pode ser fatal se não tratada adequadamente (Zlotowski et al., 2008). Os tratamentos são difíceis, de custos elevados e muitas vezes ineficientes, porém a prevenção e o manejo adequado são formas eficazes de reduzir a incidência de diarreia. A necessidade de garantir os resultados zootécnicos e econômicos da produção de suínos incentivou a incorporação rotineira de antibacterianos (promotores de crescimento) nas rações destinadas às fases do processo produtivo. Nesse sentido, novas alternativas que garantam o desempenho animal, a qualidade do produto final e

a redução de resíduos indesejáveis à saúde do consumidor estão sendo cientificamente consideradas.

Pesquisas têm sido realizadas com prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais (EV). Estes últimos, representado pelos compostos fenólicos (bioflavonoides ou flavonoides) e o ácido ascórbico. Os bioflavonoides são antioxidantes naturais, com ações antiinflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas e imuno-estimulantes (Cushnie & Lamb, 2005). O ácido ascórbico participa de diversos processos metabólicos, como a formação do colágeno e síntese de epinefrina, corticosteroides e ácidos biliares (Pion et al., 2004). Além de co-fator enzimático, o ácido ascórbico participa dos processos de óxido-redução, aumentando a absorção de ferro e a inativação de radicais livres (Padayatty et al., 2003). Os benefícios da utilização terapêutica do ácido ascórbico em suínos são observados no desempenho, estresse pré-abate e na qualidade da carne (Pion et al., 2004).

Pelas propriedades individuais e ação sinérgica de seus princípios ativos, o uso de EV pode melhorar a resposta imune de leitões na fase de creche. Embora existam informações positivas relacionadas ao sinergismo dos constituintes dos EV, seu uso no controle dos sinais clínicos das diarreias de leitões é incipiente e pouco conclusivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho e o perfil microbiológico de leitões na fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico.

Material e métodos

Os animais foram alojados no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da UFSC. O experimento foi executado no período de 02 a 23 dezembro de 2013. As unidades experimentais possuíam peso médio de $\pm 5,89$ quilogramas. O galpão da creche possui 48 baias elevadas a 0,40m do solo, com piso plástico vazado com 2m² de área por baia. As baias

são equipadas com comedouros semi-automáticos e bebedouros tipo chupeta, com regulagem de altura. O galpão possui sistema automático de acionamento de cortinas, um conjunto de quatro exaustores e ar condicionado.

Os animais no momento da chegada foram pesados, identificados e distribuídos nos tratamentos. Foram utilizados 40 animais alojados em 40 baias, sendo 20 fêmeas e 20 machos desmamados, dispostos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, 5 repetições e utilizado o sexo como fator de bloqueamento. Os tratamentos foram denominados, respectivamente em: T1 (controle); T2 (EV (500ppm)); T3 (Amoxicilina (20mg kg⁻¹)) e T4 (Amoxicilina (20mg kg⁻¹)+EV (500ppm)).

O EV é constituído de ácido lático (180,0g kg⁻¹), vitamina C (5.200,0g kg⁻¹), flavonoides (344,0mg kg⁻¹), ácido cítrico (400,0g kg⁻¹), ácido fosfórico (15,0g kg⁻¹), ácido fumárico (20,0g kg⁻¹). A Amoxacilina (50,0g), foi utilizada na dose de 20mg por quilograma de peso. Os animais foram submetidos à avaliações clínicas constantes quanto ao grau de hidratação e sintomatologia de diarreia. A temperatura mínima e máxima foi verificada duas vezes ao dia. Os animais consumiram uma dieta isonutritiva comercial, seguindo as exigências nutricionais do NRC (Nrc 2012) (Tabela 1), Os animais receberam alimentação a vontade e tiveram livre acesso a água.

Os dados de ganho de peso foram obtidos por pesagens semanais e individuais dos animais. O consumo diário de ração foi obtido pela pesagem da ração fornecida menos as sobras diárias presentes nos comedouros. A conversão alimentar foi estimada a partir das variáveis anteriores.

Para a avaliação do perfil microbiológico foram coletadas fezes dos animais, identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para a contagem de colônias bacterianas. As coletas de fezes foram realizadas nos dias 7, 14 e 21 do experimento. Para a contagem das colônias foi

utilizado e meio PCA (Plate Count Agar) e MacConkey. Ainda foram realizadas provas bioquímicas (oxidação e fermentação de açúcares (GOF), produção de Indol (SIM), utilização de açúcares (TSI) e urease) para identificação de *E. coli*. As colônias foram armazenadas em glicerol para posterior cultura e antibiograma das 48 amostras conservadas. As amostras passaram por repique em meio VBR e logo levadas a estufa por 24 horas a 37°C. Após este período, com a alça de platina, algumas colônias foram adicionadas ao Muller Hilton caldo (MH) e a seguir em MH Agar e adicionados os discos de antibióticos para serem encaminhadas a estufa por 24 horas a 37°C. Após 24 horas fez-se a leitura com régua transparente milimetrada para determinar o diâmetro em mm para cada halo de inibição. Foram utilizados os seguintes discos para o antibiograma: Polimixina (30 µg), Cefepine (30µg), Amoxicilina (10µg), Neomicina (30µg), Norfloxacino (10µg), Ceftriaxona (30µg), Meropenem (10µg) e Ampicilina (10µg).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM em nível de 5% de significância. Os efeitos incluídos no modelo analítico foram tratamentos (T) e semana (S). As eventuais diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Minitab (Mckenzie & Goldman, 2010). Os dados do antibiograma foram avaliados através do percentual de sensibilidade, sensibilidade intermediária e resitência aos antibióticos.

Resultados e discussão

O desempenho animal não apresentou diferenças ($P>0,01$) entre os tratamentos para peso inicial e final e para ganho diário de peso. Porém, os machos do grupo controle apresentaram consumo diário médio de ração (CDMR) 1,8% superior ($P<0,01$) aos demais tratamentos e conversão alimentar (CA) 2,11% superior ($P<0,01$) em relação ao tratamento

com EV (Tabela 2). Na atualidade, os aspectos nutricionais que envolvem os extratos vegetais têm sido mensurados pelas atividades antimicrobianas, sobre os sistemas enzimáticos, estruturas celulares e moléculas biológicas. Entretanto, é interessante lembrar que os efeitos biológicos dos antioxidantes naturais são potencializados pelas interações entre os constituintes da fórmula (Middleton et al., 2000). Por exemplo, a biodisponibilidade e eficácia da vitamina C e dos bioflavonoides são inferiores se administrados de forma isolada (Navarro et al., 2008). Entre as várias ações, os antioxidantes protegem o sistema imunológico. Os bioflavonoides modulam algumas respostas inflamatórias, como a inibição da PGE₂, IgE e inibição da fagocitose da membrana de mielina no processo de esclerose múltipla (Flórez, 2002). No momento atual, os acidificantes passaram a ser utilizados nas dietas dos suínos nas fases iniciais de crescimento, auxiliando no desempenho após o desmame (Miguel, 2008).

Em nosso trabalho, observamos maior consumo médio diário de ração dos machos do grupo controle e por consequência pior conversão alimentar, se comparado aos demais tratamentos. Em outro trabalho, um dos constituintes da fórmula dos EV, mais especificamente o ácido fumárico, utilizado em dietas para leitões no pós-desmame melhorou o desempenho dos animais, tanto no ganho de peso e conversão alimentar, assim como aumentou o consumo de ração (Teixeira et al., 2003). Já o uso 1,5 a 3,0% de ácido cítrico na dieta de leitões no pós desmame, não apresentou melhora no ganho de peso e na eficiência alimentar (Radecki et al., 1988). Portanto, as respostas das características de desempenho e dos coeficientes de digestibilidade aparente de nutrientes, frente à suplementação de acidificantes são variáveis e contraditórias (Miguel, 2008).

A contagem total de colônias bacterianas do grupo controle foi 35,9%, 70,9% e 63,8% superior ($P < 0,01$) aos tratamentos com A, EV+A e EV, respectivamente. A contagem de colônias pequenas do grupo controle foi 72,3%, 75,99% e 75,35% superior ($P < 0,01$) aos tratamentos com A, EV+A e EV, respectivamente. A contagem de colônias médias do

tratamento com A foi 58,27%, 75,37% e 99,82% superior ($P < 0,01$) aos tratamentos com EV, EV+A e ao grupo controle, respectivamente. Em relação as colônias grandes não foram observadas diferenças ($P > 0,01$) entre os tratamentos. Já, na contagem em meio MacConkey, o grupo tratado com A foi 88,44%, 91,78% e 56,50%, superior ($P < 0,01$) aos tratamentos com EV+A, EV e controle, respectivamente (Tabela 3).

Inúmeras hipóteses são sugeridas a respeito do mecanismo de ação dos acidificantes e entre elas a redução do pH estomacal, alterações da microflora intestinal (por meio de controle bactericida) ou bacteriostático, melhora na digestibilidade e retenção de nutrientes (Miguel, 2008). É importante recordar que a secreção de ácido clorídrico, em leitões jovens, é limitada devido a insuficiente produção de ácido clorídrico. Isto foi observado em outro trabalho, o qual avaliou dietas líquidas fermentadas ou não e, salientou que a redução do pH favoreceria o aproveitamento dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos orgânicos) e o controle de enterobactérias (Canibe et al., 2007). Nesse sentido, o uso de acidificantes nas dietas de leitões no pós desmame pode servir como adjuvante no controle do pH estomacal e auxiliar na digestão de alimentos à base de grãos e farelos vegetais (Gallo et al., 2003). Porém, salientamos que os resultados mais constantes são em relação ao poder antimicrobiano dos acidificantes. Esse poder, na maioria das vezes, se dá quando há redução do pH estomacal.

Um dos mecanismos de controle microbiano refere-se à capacidade que os acidificantes possuem de alterar o pH do meio, em função do seu potencial de dissociação (pK_a) entre a forma dissociada e não dissociada (Partanen & Mroz, 1999). A absorção dos ácidos orgânicos se dá mais rapidamente quando o valor do pH luminal é menor do que pK_a dos ácidos. O pK_a de um ácido é o valor de pH em que 50% do ácido encontra-se na forma ionizada, sendo determinado pelo logaritmo negativo da constante de ionização do ácido, ou K_a , que por sua vez indica a força do ácido, portanto sua tendência em doar prótons. Por

serem expressos de forma logarítmica, uma unidade de pH acima do pKa de um ácido indica que 90% do ácido encontra-se na forma não dissociada e, com duas unidades de pH acima do pKa, 99% do ácido estarão não dissociados e o pKa da maioria dos ácidos encontra-se entre 3 e 5 (Bellaver & Scheuermann, 2004; Thompson & Hinton, 1997).

Quando o ácido está na forma ionizada pode difundir-se livremente através da membrana semipermeável do microorganismo para seu citoplasma celular e dentro da célula em um ambiente mais alcalino libera o próton resultando na diminuição do pH intracelular (Canibe et al., 2001). Este aspecto influencia no metabolismo microbiano, inibindo a liberação de importantes enzimas e forçando a célula bacteriana a usar energia para liberar prótons, conduzindo ao acúmulo intracelular de ânions e em consequência reduz sua taxa de crescimento e isto devido ao consumo de energia através da ação da bomba ATPase que bombeia prótons (H^+) até o esgotamento dessa bactéria (Gauthier, 2005).

Esses eventos relatados a cima podem ter acontecido em nosso estudo, pois a contagem total de colônias bacterianas foi favorável aos tratamentos com EV e EV+A. Como exemplo, a contagem total de colônias do tratamento com EV foi 70,9% inferior ao grupo controle, o que nos remete a possibilidade dos EV apresentarem efetivamente propriedades antimicrobianas. Nesse sentido, os resultados obtidos em meio MacConkey permitem diferenciar presuntivamente gêneros e espécies de microorganismos através de coloração ou morfologia das colônias. Em nosso trabalho, foi observado que o grupo que recebeu EV, apresentou redução de 91,78% na contagem de colônias, se comparado ao grupo controle. Através desses resultados e provas bioquímicas realizadas, podemos estimar que essas colônias são do gênero *E coli*. A *E. coli* é o microorganismo mais presente em amostras de fezes e integrante da microbiota saprófita intestinal. A *E. coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa com morfologia bastonete, Gram negativa, fermentadora de lactose e que cresce facilmente em meios de cultura como ágar MacConkey, formando grandes colônias

vermelhas (Gyles & Fairbrother, 2004). Sob avaliação bioquímica, ela apresenta reação positiva para o Indol, negativa para a produção de urease e sulfito de hidrogênio e não utilização do citrato como fonte de carbono. Essas provas permitem sua distinção entre as Enterobacteriaceas (DebRoy & Maddox, 2001).

Na avaliação do antibiograma (dados percentuais), foi observado que os antibióticos Cefepine (CPM), Ceftriaxona (CRO), Meropenem (MPM) apresentaram 100% de sensibilidade independente dos tratamentos. A Polimixina apresentou 100% de resistência nos tratamentos controle, EV e EV+A, porém 66,6% de resistência no tratamento com A. O antibiograma com o disco de Amoxicilina apresentou 85,7%, 72,7%, 44,5% e 100% de resistência nos tratamentos controle, EV, A e EV+A, respectivamente (Tabela 4). Já os discos com ampicilina e Norfloxacin apresentaram 88,8% e 88,8% de resistência, respectivamente no tratamento com A. Em resumo, podemos observar que o antibiograma com os discos de Amoxicilina, Norfloxacin e Ampicilina apresentaram maiores percentuais de resistência independente dos tratamentos. Ainda, podemos observar que o antibiograma com discos de neomicina apresentaram 100% de sensibilidade intermediária no tratamento com EV+A e 0% de resistência nos demais tratamentos.

Dentre as medidas para a redução e controle da *E. coli* encontra-se a antibioticoterapia (Glattleder, 1993). Trabalhos de sensibilidade aos antibióticos têm sido realizados com resultados variáveis (Wilson, 1981; Borowski et al., 1993). Em virtude da diversidade de comportamento da *E. coli* frente aos antimicrobianos, principalmente pelo uso de subdoses de antibióticos e pela fácil transferência da resistência através de plasmídeos entre amostras bacterianas, em nosso estudo foi realizado antibiograma das amostras de fezes de todos os tratamentos. Observamos que os tratamentos efetivamente não influenciaram nos resultados do antibiograma. A sensibilidade observada pode ser o efeito direto dos discos de antibióticos adicionados às amostras.

Os antibióticos Cefepine (CPM), Ceftriaxona (CRO), Meropenem (MPM) foram de fato eficientes em todas as amostras avaliadas. Esses antimicrobianos são mais eficientes provavelmente por inibirem a síntese de parede microbiana, o que resulta na morte bacteriana. Isto é possível porque as células Gram negativas (Ex. *E. coli*), possuem uma quantidade muito menor de peptidoglicano do que as Gram positivas. Isso faz com que sua parede celular não seja tão espessa e forte quanto a das outras supracitadas, mas sua estrutura é mais complexa devido ao fato da existência de uma membrana de lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolipídios, que envolve sua parede celular (KINN et al., 2005).

Os antibióticos Cefepine (CPM), Ceftriaxona (CRO), Meropenem (MPM) foram eficientes em todas as amostras avaliadas. Esses antimicrobianos são mais eficientes provavelmente por inibirem a síntese de parede microbiana, o que resulta na morte bacteriana. Isto é possível porque as células Gram negativas (Ex. *E. coli*) possuem uma parede celular muito mais complexa, o que as torna mais resistentes aos antibióticos, devido à incapacidade de alguns não atravessarem a membrana lipídica que constituem sua parede celular. Para se ter acesso a célula bacteriana, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos de porina embebidos na estrutura lipídica que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim antibióticos com maior atividade frente a gram-negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em sua estrutura química (GUIMARÃES et al., 2010).

Portanto, na caracterização de um desequilíbrio intestinal, as diarreias aparecem comumente como um importante sinal da complexidade do processo. É interessante lembrar que a dinâmica intestinal é contínua, com respostas imunes de intensidades diferentes sobre substâncias ou agentes ofensivos e inofensivos. Estes desafios impostos, muitas vezes por ações multifatoriais, recursos nutricionais ou alimentares podem ser interessantes para acelerar a recuperação de eventuais danos no sistema digestivo. Para tanto, mais estudos são

necessários para avaliar os níveis ideais de inclusão e melhores combinações dos extratos vegetais, tendo em vista a possibilidade de melhorar a resposta imune de leitões na fase de creche.

Conclusões

1. O uso de bioflavonoides e ácido ascórbico não alteram o desempenho de suínos na fase de creche.

2. O uso de extratos vegetais e associados a Amoxicilina reduz a contagem de colônias bacterianas.

3. Foi observada alta resistência das amostras estudadas à Amoxicilina, a Neomicina e a Norfloxacin. Os antimicrobianos Cefepime, Ceftriaxona e Meropenem foram os mais eficientes na inibição do crescimento das amostras de *E. coli* isoladas de suínos suplementados com ácido ascórbico e bioflavonoides.

Agradecimentos

Ao LABAC pelo auxílio prestado e execução das análises. Ao Departamento de Zootecnia pela concessão das instalações para execução do experimento. A Quinabra Química Natural Brasileira Ltda, pelo financiamento parcial do projeto. Ao programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pelo apoio prestado na execução do trabalho.

Referências

ANAMI, R.M.; SANTOS, J.M.G.; FERREIRA, S.R. Desenvolvimento e avaliação de uma bacterina contra colibacilose em suínos. **Iniciação Científica Cesumar**. v. 10, n.2, 2008.

BARCELLOS, D. E.; SATO, J.P.H.; ANDRADE, M.R.. Diarreias nutricionais dos suínos: uma visão do veterinário clínico. In: VI SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura, 2011, Porto Alegre. **Anais**. 2011, p 23-34.

BELLAVER, C.& SCHEUERMANN; G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: CONFERÊNCIA AVESUI, 2004, Florianópolis, SC. **Anais**. 2004. Florianópolis: [s.n.], p.1-16.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; STEPAN, A.L. Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *E. coli* isoladas de suínos recentemente desmamados. **ABRAVES**, Goiânia, MT, p.81. 1993.

CANIBE, N.; HOJBERG, O.; BADSBERG, J.H.; JENSEN, B.B. Effect of feeding fermented liquid feed and fermented grain on gastrointestinal ecology and growth performance in piglets. **Journal of Animal Science**, v. 85, p.2959-2971, 2007.

CUSHNIE, T.P. & LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p.343-356, 2007. DOI: doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002

DebRoy, C. & Maddox, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of Veterinary significance. **Animal Health Research Reviews**, v.1, n.2, p.129-140, 2007. DOI: 10.1079/AHRR200131.

FLÓREZ, S.M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Ciudad Industrial Venecia, Madrid, Espanha, v. 6, p.271-278. 2002

GALLO, B.L.; VIOLA, E.; CONDE, O.R. DE A. Uso do composto de ácidos orgânicos Profitol em dietas de leitões pré e pós desmame. **Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre, RS, p. 24-28.2003. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39404/000394202.pdf?sequence=1>> Acesso em 10 jun. 2014.

GAUTHIER, R. Modo de ação dos acidificantes e interesse que geram na fase de crescimento e terminação. **Revista Pork World**, v.5, n.28, p.52-58, 2005.

GLATTLEIDER, D.L. Pathologie digestive du porc en croissance et alimentation. **Recueil de Medecine Veterinaire**. v. 169, n.8/9, p.719-32. 1993.

GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L. da S., PUPPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, vol. 33, n.3, p.667-679, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

GYLES, C.L., FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. **Pathogenesis in Bacterial Infections in Animals**. Ames: Blackwell Publishing. 2004. 223 p.

HUR, J. & Lee, J.H. Development of a novel live vaccine delivering enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens to prevent post-weaning diarrhoea in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.146, p.283-288, 2012.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, DAIANE D.E.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. **Ciencia Rural**. v.38, n.6, p.1686-1693.2008. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000600030>>.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, E.U.A., v.4, n.673-751, 2000.

MIGUEL, W.C. **Suplementação de acidificantes em rações de leitões desmamados: desempenho e digestibilidade**. 2008.54 f. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Produção animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP. 2004.

MINITAB. User's guide: Meet Minitab, 16:142, p.2010.

NAVARRO, M.; GRANIZO, J.; SEBASTIAN, M. **Publicación para veterinarios y técnicos del sector de animales de producción extractos vegetales como fuente de antioxidantes naturales en la alimentación animal**. Albèitar - Foro empresas: Probená, S.L., Zaragoza, Espanha. v.116,p.64-65.2008.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF SWINE: Eleventh Revised Edition: NRC 2012 Models for Estimating Nutrient Requirements of Pigs Case studies. 2012. Disponível em <<http://dels.nas.edu/resources/static-assets/banr/swine-resources/case-studies-pdf.pdf>>. Acesso em: 15/11/2014.

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.K.; LEVINE, M. Vitamin C as an Antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n.1, p.18-35, 2003. DOI: 10.1080/07315724.2003.10719272.

PARTANEN, K.H & MROZ, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition research reviews**, v. 12, n.1, p.117-145. Doi: 10.1079/095442299108728884

PION, S. J.; VAN HEUGTEN, E.; SEE, M.T.; LARICK, D. K.; PARDUE, S. Effects of vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations and meat quality in swine. **Journal of Animal Science**,v. 82,p.2004-2012, 2004.

RADECKI, S. V.; JUHL, M.R.; MILLER, E.R. Fumaric and citric acids feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. **Journal of animal Science**,v. 66, p.2598-2605, 1988.

TEIXEIRA, M.P.; SILVA, G.F.; LOPES, D.C.; CORASSA, A.; TEIXEIRA, A.O.; BUNZEN, S.; PENA, S.M.; GATAS, G.; COSTA, L.F. Avaliação de ácidos orgânicos e inorgânicos em dietas para leitões desmamados as 21 dias de idade. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Santa Maria, RS. 2003. CD ROM.

THOMPSON, J.L & HILTON, M. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonella in the crop. **British Poultry Science**. v. 38, n.59, p.65, 1997.

WILSON, M.R. Enteric Colibacillosis. Leman, A.D. et al. Diseases of swine. In: Leman, A.D. et al. **Diseases of Swine**. 5. ed. State University Press. Iowa. 1981. p. 477.

YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; SONGER, J.G.A. Prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium Difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1,p.52-59,2007. DOI: 10.1177/104063870701900108.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D.E.S.N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**,v. 36, p.81-86, 2008.

Tabela 1. Composição centesimal das dietas de leitões em fase de creche suplementados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico (1).

| Ingredientes | Pré inicial I* | Inicial I* |
|--|----------------|------------|
| Proteína Bruta (g kg ⁻¹) | 180 | 177,99 |
| Umidade (g kg ⁻¹) | 120 | 120 |
| Ácido Fórmico (mg kg ⁻¹) | 325 | - |
| Ácido Fólico (mg kg ⁻¹) | - | 0,60 |
| Ácido Pantatênico (mg kg ⁻¹) | - | 13,65 |
| Biotina (mg kg ⁻¹) | - | 75 |
| Cobalto (mg kg ⁻¹) | - | 19,95 |
| Ácido Láctico (mg kg ⁻¹) | 760 | - |
| Pantotenato de Ca (mg kg ⁻¹) | 11 | - |
| Aroma de frutas (mg kg ⁻¹) | 30 | - |
| BHT (mg kg ⁻¹) | 97 | - |
| Cálcio (mg kg ⁻¹) | 8.000 | 8 |
| Cálcio (mg kg ⁻¹) | 5.000 | 6,25 |
| Cobre (mg kg ⁻¹) | 8 | 0,6 |
| Colina (mg kg ⁻¹) | - | 349 |
| Etoxiquin (mg kg ⁻¹) | - | 25 |
| Extrato Etéreo (mg kg ⁻¹) | 25 | 27,6 |
| Ferro (mg kg ⁻¹) | 79 | 112 |
| Fibra Bruta (g kg ⁻¹) | 35 | 22,6 |
| Fósforo (mg kg ⁻¹) | 3.500 | 5,4 |
| Halquinol (mg kg ⁻¹) | 120 | - |
| Iodo (mg kg ⁻¹) | 0,49 | 1,95 |
| Lisina (g kg ⁻¹) | 12 | 6.175 |
| Manganês (mg kg ⁻¹) | 30 | 62,25 |
| Matéria mineral (g kg ⁻¹) | 60 | 33,38 |
| Metionina (mg kg ⁻¹) | 5.000 | 3.394 |
| Niacina (mg kg ⁻¹) | 18 | 33 |
| Selênio (mg kg ⁻¹) | 0,25 | 0,3 |
| Sódio (mg kg ⁻¹) | 1.800 | 0,24 |
| Treonina (mg kg ⁻¹) | 1.800 | - |

| | | |
|--------------------------------------|-------|--------|
| Triptofano (mg kg ⁻¹) | 790 | - |
| Vitamina A (UI kg ⁻¹) | 6.400 | 15.900 |
| Vitamina B12 (mcg kg ⁻¹) | 30 | 30 |
| Vitamina B1 (mg kg ⁻¹) | - | 1,2 |
| Vitamina B2 (mg kg ⁻¹) | 4 | 8,4 |
| Vitamina B6 (mg kg ⁻¹) | 2 | 3,39 |
| Vitamina D3 (UI kg ⁻¹) | 1.200 | 32.400 |
| Vitamina E (UI kg ⁻¹) | 30 | 39 |
| Vitamina K3 (mg kg ⁻¹) | 1 | 1,65 |
| Zinco (mg kg ⁻¹) | 2.500 | 2.250 |

(1) Obs.: Composição básica do produto: Ácido fólico, ácido nicotínico, carbonato de cálcio, cloreto de sódio, cloreto de colina, etoxiquin, farelo de soja transgênico, milho moído, fitase, fosfato bicálcico, halquinol, iodato de potássio, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, vitamina A, Vitamina B1, B2, B6, B12, D3, E e K3.

Tabela 2. Desempenho de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico.

| Tratamentos (T) | Peso In | | Peso Fi | | CMDR | | GDP | | CA | |
|----------------------|-------------------|-------------------|---------|------|-------------------|------|------|------|--------------------|------|
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| Controle | 5,69 | 5,55 | 9,01 | 8,90 | 0,53 ^a | 0,53 | 0,36 | 0,36 | 1,42 ^a | 1,41 |
| Extrato Vegetal (EV) | 5,78 | 6,61 | 9,16 | 9,98 | 0,52 ^b | 0,52 | 0,36 | 0,36 | 1,39 ^b | 1,39 |
| Amoxicilina (A) | 5,88 | 6,61 | 9,22 | 9,92 | 0,52 ^b | 0,52 | 0,36 | 0,36 | 1,39 ^{ab} | 1,41 |
| EV+A | 5,41 | 5,67 | 8,76 | 8,79 | 0,52 ^b | 0,52 | 0,36 | 0,36 | 1,40 ^{ab} | 1,41 |
| Dpr | 0,56 | 0,54 | 0,89 | 0,83 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,03 |
| Probabilidade | | | | | | | | | | |
| T | 0,87 | 0,91 | 0,23 | 0,17 | 0,01 | 0,08 | 0,85 | 0,94 | 0,01 | 0,54 |
| R | 0,01 ¹ | 0,01 ² | 0,69 | 0,70 | 0,01 ³ | 0,07 | 0,11 | 0,54 | 0,01 ⁴ | 0,21 |

Peso In=peso inicial; Peso Fi= peso final; CMDR= consumo médio diário de ração; GDP= ganho diário de peso; CA= conversão alimentar; DPR=desvio padrão residual; R= repetição; M= macho; F= fêmea; Equações de Regressão para ¹Peso In machos: (Peso In=4,65+0,59R) =;²Peso In fêmeas: (Peso In=6,03+0,10R); ³CRMD machos: (CRMD=0,52+0,0008R); ⁴CA machos: (CA=1,38+0,012R).

Tabela 3. Contagem de colônias bacterianas de conteúdo fecal leitões em fase inicial de creche alimentados com dietas enriquecidas com bioflavonoides e ácido ascórbico.

| Tratamento (T) | Contagem (UFC mL ⁻¹) | | | | |
|----------------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|
| | Contagem Total | Colônia Pequena | Colônia Média | Colônia Grande | mC |
| Controle | 684797437,5 ^a | 507353125 ^a | 515000 ^c | 24855375 | 24855375 ^b |
| Extrato Vegetal (EV) | 247453000 ^c | 125062500 ^b | 121118125 ^b | 1334875 | 4693963 ^b |
| Amoxicilina (A) | 438725000 ^b | 140493750 ^b | 290243750 ^a | 250000 | 57148625 ^a |
| EV+A | 198959562,5 ^c | 121786875 ^b | 71472688 ^c | 2668750 | 6604125 ^b |
| Dpr | 179 | 129 | 142 | 288 | 239 |
| Probabilidade | | | | | |
| T | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,14 | 0,01 |
| S | 0,01 ¹ | 0,01 ² | 0,01 ³ | 0,01 ⁴ | 0,01 ⁵ |

Atb= antibiótico; Dpr=desvio padrão residual; S=semana; mC=Ágar MacConkey; Equação de regressão para semanas de avaliação: ¹S=2,80 - 0,000000 Contagem total de colônias; ²S=2,84 - 0,023000 Contagem de colônias pequena; ³S=2,44 + 0,031000 Contagem de colônias médias; ⁴S=2,72 - 0,0420000 Contagem de colônias grandes; ⁵S=2,62 - 0,063000 mC.

Tabela 4. Antibiograma (sensibilidade em %) de amostras de fezes de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico.

| Tratamento | Sensibilidade | Polim | CPM | AMO | NEO | NOR | CRO | MPM | AMP |
|-------------------------|---------------|-------|-----|------|------|------|-----|-----|------|
| Controle | S | 100 | 100 | 14,3 | 85,7 | 100 | 100 | 100 | 14,3 |
| | SI | 0 | 0 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | R | 0 | 0 | 85,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 85,7 |
| Extrato Vegetal (EV) | S | 100 | 100 | 27,3 | 54,5 | 36,4 | 100 | 100 | 27,3 |
| | SI | 0 | 0 | 0 | 45,5 | 9,1 | 0 | 0 | 0 |
| | R | 0 | 0 | 72,7 | 0 | 54,5 | 0 | 0 | 72,7 |
| Amoxicilina (A) | S | 66,6 | 100 | 33,3 | 55,5 | 11,2 | 100 | 100 | 11,2 |
| | SI | 22,2 | 0 | 22,2 | 44,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | R | 11,2 | 0 | 44,5 | 0 | 88,8 | 0 | 0 | 88,8 |
| EV+A | S | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 33,3 |
| | SI | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | R | 0 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 0 | 66,6 |

Polim=Polimixina; CPM=Cefepine; AMO=Amoxicilina; NEO=Neomicina;
 NOR=Norfloxacino; CRO=Ceftriaxona; MPM=Merepenem; AMP=Ampicilina; S=sensível;
 SI=sensibilidade intermediária; R=resistente.

CAPÍTULO 3

9 ARTIGO II

Leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico: avaliação do perfil enzimático e detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex

Magali F. de Oliveira¹, Carlos A. R. Rossi², Matheus S. Lucca¹, Marcelo Soares¹, de Oliveira, V.³ e Vagner L. F. Martins¹

Artigo à ser submetido a Revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira), e apresentado de acordo com as normas da revista.

Leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico: determinação do perfil enzimático e detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex

Magali F. de Oliveira¹, Carlos A. R. Rossi², Matheus S. Lucca¹, Marcelo Soares¹, de Oliveira, V.³ e Vagner L. F. Martins¹.

⁽¹⁾Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Clínica de Grandes Animais, CEP 97105-900, Av. Roraima, nº 1.000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: magalifernandesoliveira@gmail.com, carlos.rossi.mv@gmail.com, schardonglucca@gmail.com, marcello1646@gmail.com, martinsvagnerlf@hotmail.com⁽³⁾

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Zootecnia, CEP 97105-900 Av. Roraima, nº 1.000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: vladimir.oliveira@ufsm.br

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar a dosagem bioquímica CK, AST, AST, TBARS e a frequência dos genes de fímbrias (F41, F6 (987P), F4 (K88), F18 e F5 (K99) e toxinas (LT, STx, LTa e LTb) de cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia usando a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e sexo como fator de bloqueamento. Os tratamentos foram distribuídos em: T1 (controle); T2 (Extrato Vegetal (EV) (500ppm)); T3 (Amoxicilina (A) (20mg kg⁻¹) e T4 (A (20mg kg⁻¹) + EV (500ppm). Os resultados encontrados não foram significativos no presente estudo (P>0,05) para a avaliação das enzimas. Das 64 amostras 55 (85,93%) apresentaram genes para fímbrias e toxinas, 23 (35,93%) apresentaram genes somente para fímbrias e somente duas amostras apresentaram genes somente para toxinas. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada ou em associação com outros fatores foi: F41 (10,93%), F6 (21,87%), F4 (37,5%), F18 (70,31%), LT (39,6%), Stx (42,18%), STa (60,93%) e STb (75%). Em todas as 64 amostras não foi encontrada nenhum dos fatores de virulência para F5 (k99). O

fornecimento de EV na dieta de leitões desmamados não influencia nas enzimas como CK, ALT, AST e no TBARS. O grupo de animais que recebeu EV ou sua interação não apresentou ausência de genes para fímbrias e toxinas.

Termos de indexação: diarreia, dosagem bioquímica, fímbrias, leitões desmamados, toxinas.

The enzyme profiles of evaluation and detection of pathogenic strains by PCR multiplex in piglets in nursery phase fed diets containing bioflavonoids and ascorbic acid

Abstract - The objective of this study was to evaluate serum levels CK, AST, AST, TBARS and the frequency of fimbriae genes (F41, F6 (987P), F4 (K88), F18 and F5 (K99) and toxins (LT, STx, LTa and LTb) of *E. coli* strains isolated from piglets with diarrhea using multiplex PCR with primers specific for these genes. The experimental design was completely randomized with four treatments, five replicates and sex as blocking factor treatments were distributed as follows: T1 (control), T2 (Plant Extract (EV) (500ppm)), T3 (Amoxicilin (A) (20 mg kg⁻¹) and T4 (A (20 mg kg⁻¹) + EV (500ppm)). The results were not significant results in this study (P>0.05) for the evaluation of enzymes. Of the 64 samples 55 (85.93%) had genes for fimbriae and toxins, 23 (35.93 %) had only genes for fimbriae and only two samples had genes for toxins only. The frequency of virulence factors detected alone or in combination with other factors was: F41 (10.93%), F6 (21.87%), F4 (37.5%), F18 (70.31%), LT (39.6%), Stx (42.18%), STa (60.93%) and STb (75%). In all 64 samples we found no virulence factors for F5 (K99). The supply of IV in the diet of weanling pigs did not affect the CK enzymes such as ALT, AP and TBARS. O group of animals receiving IV or their interaction showed no fimbriae absence of genes and toxins.

Index terms: biochemical analysis, diarrhea, fimbriae, toxins, weaned piglets.

Introdução

A superação contínua dos resultados técnicos é um desafio que caracteriza a rotina da moderna suinocultura. Vários foram os ganhos obtidos com o melhoramento genético, o aprimoramento dos conhecimentos sobre a nutrição e sanidade, ambiência, instalações e reprodução. Não obstante, há vários desafios a serem vencidos em todos os setores da produção de suínos, pois mesmo com as modernas ferramentas disponíveis, os leitões ainda sofrem com as enteropatias (Anami et al. 2008).

O desmame antecipado dos leitões, por volta dos 21 dias de idade, possibilita o aumento do número de leitões por matriz por ano (Morés et al., 1998). Contudo, o período de creche acaba se tornando crítico na produção de suínos, em virtude dos fatores estressantes que ocorrem simultaneamente por ocasião do desmame, relacionados à separação dos leitões da matriz, à mudança de ambiente e à mudança brusca na alimentação (Santos et al. 2003).

Além disso, a imaturidade do sistema digestivo e as drásticas alterações na fisiologia intestinal dos leitões com duas a três semanas de idade Boudry et al. (2004), prejudicam os processos digestivo e absorptivo, comprometem o desempenho e predispõem os leitões a problemas de saúde fazendo com que o período pós desmame represente grande desafio para os nutricionistas (Silva et al. 2008). As diarreias, assim como outras doenças que acometem o trato digestivo dos suínos, são multifatoriais e os principais agentes envolvidos são o *Clostridium perfringens* tipo A ou tipo C, a *Escherichia coli* enterotoxigênica, a *Isospora suis*, o *rotavírus* e o vírus da gastroenterite transmissível dos leitões (Yaeger et al. 2007, Hur & Lee 2012). Em uma rápida reflexão sobre a ocorrência das diarreias em suínos, o que determina a importância desses episódios são fatores como o número de doentes, o curso da doença, o grau de desidratação dos leitões afetados, a mortalidade especificamente devida ao problema,

à repetição de episódios em diferentes lotes e as quantidades e eficiência das medicações e vacinações em curso (Barcellos et al. 2011).

As diarreias cursam com sinais clínicos como perda de solutos e água, depleção de eletrólitos, desequilíbrio ácido-básico e desidratação, que pode ser fatal se não tratada adequadamente (Zlotowski et al. 2008). Os tratamentos são difíceis, de custos elevados e muitas vezes ineficientes, porém a prevenção e o manejo adequado são formas eficazes de reduzir a incidência de diarreia. A necessidade de garantir os resultados zootécnicos e econômicos da produção de suínos incentivou a incorporação rotineira de antibacterianos (promotores de crescimento) nas rações destinadas às fases do processo produtivo. Nesse sentido, novas alternativas que garantam o desempenho animal, a qualidade do produto final e a redução de resíduos indesejáveis à saúde do consumidor estão sendo cientificamente consideradas.

Pesquisas têm sido realizadas com prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais (EV). Estes últimos, representado pelos compostos fenólicos (bioflavonoides ou flavonoides) e o ácido ascórbico. Os bioflavonoides são antioxidantes naturais, com ações antiinflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas e imuno-estimulantes (Cushnie & Lamb 2005). O ácido ascórbico participa de diversos processos metabólicos, como a formação do colágeno e síntese de epinefrina, corticoesteróides e ácidos biliares (Pion et al. 2004). Além de co-fator enzimático, o ácido ascórbico participa dos processos de óxido-redução, aumentando a absorção de ferro e a inativação de radicais livres (Padayatty et al. 2003). Os benefícios da utilização terapêutica do ácido ascórbico em suínos são observados no desempenho, estresse pré-abate e na qualidade da carne (Pion et al. 2004).

Pelas propriedades individuais e ação sinérgica de seus princípios ativos, o uso de EV pode melhorar a resposta imune de leitões na fase de creche. Embora existam informações positivas relacionadas ao sinergismo dos constituintes dos EV, seu uso no controle dos sinais

clínicos das diarreias de leitões é incipiente e pouco conclusivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dosagem bioquímica de CK ($U L^{-1}$), AST ($U L^{-1}$), AST ($U L^{-1}$), TBARS (nmol) e a frequência dos genes de fímbrias (F41, F6 (987P), F4 (K88), F18 e F5 (K99) e toxinas (LT, STx, LTa e LTb) de cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia usando a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes.

Material e métodos

Os animais foram alojados no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da UFSM. Os animais foram pesados, identificados e distribuídos nos respectivos tratamentos. Foram utilizados 40 animais alojados em 40 baias, sendo 20 fêmeas e 20 machos desmamados, dispostos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e utilizado o sexo como fator de bloqueamento. Os tratamentos foram denominados, respectivamente em: T1 (controle); T2 (EV (500ppm)); T3 (Amoxicilina ($20mg kg^{-1}$)) e T4 (Amoxicilina ($20mg kg^{-1}$) + EV (500ppm)).

O EV utilizado no estudo é constituído de ácido láctico ($180,0g kg^{-1}$), vitamina C ($5.200,0g kg^{-1}$), flavonoides ($344,0mg kg^{-1}$), ácido cítrico ($400,0g kg^{-1}$), ácido fosfórico ($15,0g kg^{-1}$), ácido fumárico ($20,0g kg^{-1}$). A Amoxicilina ($50,0g$) foi utilizada na dose de $20mg$ por quilograma de peso. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas constantes quanto ao grau de hidratação e sintomatologia de diarreia. A temperatura mínima e máxima foi verificada duas vezes ao dia. Os animais consumiram uma dieta isonutritiva comercial, seguindo as exigências nutricionais do NRC (Nrc 1998). Os animais receberam alimentação à vontade e tiveram livre acesso a água.

Foram realizadas coletas de sangue de 16 animais para avaliação bioquímica das enzimas AST, ALT, CK, e TBARS nos dias 0, 7, 14 e 21 do experimento. Ainda, foram

coletadas fezes dos animais (dias 0, 7, 14 e 21 do experimento), identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da UFSM para a realização da PCR, totalizando 64 amostras de fezes avaliadas após ter sido realizado o isolamento bacteriano.

O isolamento bacteriano foi realizado a partir de amostras das fezes de leitões com diarreia, em Ágar Sangue e MacConkey, incubados por 24 horas e à temperatura de 37°C. Colônias bacterianas com características sugestivas de *E. coli* foram repicadas por esgotamento e, posteriormente, identificadas por provas bioquímicas (Hitchins et al., 1995). A partir do isolamento, foi avaliada a frequência dos genes de fímbrias (F41, F6 (987P), F4 (K88), F18 e F5 (K99) e toxinas (LT, STx, LTa e LTb), de cepas de *E. coli*. Para tanto, foi usada a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes. Culturas puras de *E. coli* foram estocadas em placas de Ágar Sangue ou Ágar Muller Hinton, a 4°C, até o processamento para o PCR multiplex que ocorreu nos dias subsequentes. A técnica para PCR multiplex encontra-se descrita em muitos trabalhos entre eles o de Macedo et al (2007), em seu trabalho de detecção de sevas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *E. coli* isolados de leitões diarreicos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM em nível de 5% de significância. Os efeitos incluídos no modelo analítico foram tratamentos (T) e semana (S). As eventuais diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Minitab (Mckenzie & Goldman 2010).

Resultados e discussão

Em nosso estudo foi observado que a CK ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonoides e ácido ascórbico (Tabela 1), não apresentou

diferenças ($P>0,01$), entre os tratamentos. A AST ($U L^{-1}$) (Tabela 2), CK (Tabela 3) e TBARS (substâncias reativas no ácido 2-tiobarbitúrico) (Tabela 4), não apresentaram diferenças ($P>0,01$) entre os tratamentos nos períodos avaliados. Névoa (2013) não encontrou diferenças ($P>0,05$) entre os valores dos parâmetros bioquímicos séricos analisados de leitões submetidos a diferentes aditivos alternativos a substituição de antibióticos. Semelhantes resultados encontrou Arantes (2002), em suas pesquisas com leitões desmamados, alimentados com dietas submetidas a diferentes níveis de zinco (zero, 1.500, 3.000 e 4.500ppm) adicionados à dieta. A CK é indicativo de lesão muscular assim como a AST. No entanto, pelos resultados obtidos em nosso estudo podemos estimar que o transporte dos animais e o manejo dos mesmos tenham sido realizados nas condições adequadas e a manutenção dos leitões durante o experimento tenha sido realizado de forma menos estressante. Observamos que não houve diferenças entre os tratamentos em relação ao TBARS ($P>0,01$).

A análise da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o principal método para quantificar os produtos finais da peroxidação lipídica, que nada mais é do que a oxidação do radical livre de ácidos graxos poliinsaturados nos sistemas biológicos, utilizada para mensurar o estresse oxidativo de tecidos e células (Scoccia et al., 2001). A concentração plasmática de CK é um forte indicativo da severidade do dano físico e seu efeito nos tecidos. Aumento nos níveis desta enzima provoca seu extravasamento para o sangue devido à perda da integridade da membrana celular (Chevion et al., 2003), correlacionando-se com o ataque oxidativo, uma vez que distúrbios originados pelas EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) podem induzir microlesões e aumento de permeabilidade das membranas biológicas (Antunes Neto et al., 2006).

É interessante lembrar que em situações de estresse defesas antioxidantes do organismo podem ser sobrecarregadas (Storey, 1996), provocando um desequilíbrio entre

moléculas oxidantes e antioxidantes (Weiss; Mahan, 2008; HARRELL et al., 2008; Storey, 1996). Caso este desequilíbrio seja favorável às moléculas oxidantes, pode haver injúrias histológicas e fisiológicas e até morte celular. Isto pode resultar na redução do desempenho (Harrel et al., 2008; Welch, 2002). Este é o estresse oxidativo. Em função disto observa-se que os extratos vegetais não foram eficientes para ofertar o atraso ou inibição da oxidação e por consequência lesão celular tanto no grupo que recebeu EV ou no grupo que recebeu a interação.

Na fase pós desmame, as concentrações séricas de diversos antioxidantes diminuem acentuadamente nos leitões, modificando o *status* antioxidante do animal, como a diminuição na concentração de alfa-tocoferol na maioria dos tecidos (Lauridsen, 2008; Lauridsen, 2010; Weiss; Mahan, 2008). Ingredientes de baixa qualidade na dieta, condições de ativação imune, estresse ambiental e elevada taxa de crescimento podem predispor os leitões ao estresse oxidativo (Bandeira et al., 2007; Harrel et al., 2008). Nessas condições, é prudente reforçar o sistema antioxidante do animal através da dieta (Weiss; Mahan, 2008). Outro trabalho em que os leitões desmamados receberam dietas suplementadas com diferentes níveis de zinco (zero, 1.500, 3.000 e 4.500ppm), apresentou resultados semelhantes aos nosso estudo (Arantes 2002). Mais estudos são necessários para que se compreenda o mecanismo de ação dos extratos vegetais com relação ao mecanismo antioxidante.

Foi avaliada a presença de genes para as fímbrias F41, F6, F4, F18, F5 e para as toxinas LT, STx, STa e STb. Das 64 amostras 55 (85,93%) apresentaram genes para fímbrias e toxinas, 23 (35,93%) apresentaram genes para fímbrias e duas amostras apresentaram genes para toxinas. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada ou em associação com outros fatores foi: F41 (10,93%), F6 (21,87%), F4 (37,5%), F18 (70,31%), LT (39,6%), Stx (42,18%), STa (60,93%) e STb (75%). Em todas as 64 amostras não foram encontrados fatores de virulência para F5 (K99).

A PCR múltipla (multiplex PCR) pode detectar, num único ensaio, vários determinantes de virulência (FRANCIS, 2002a; GUEDES, 2006a; GYLES et al., 2004). Embora tenha uma maior demanda técnica, a amplificação gênica elimina o problema da baixa expressão in vitro de alguns fatores de virulência. Entretanto, o método não indica se o gene é funcional e se de fato o fator de virulência está sendo expresso, indica apenas que ele está presente (FRANCIS, 2002a; FRANCIS, 2002b) em virtude disso salientamos que mesmo as amostras tendo apresentado genes positivos para fímbrias e toxinas não significa que estes animais apresentaram diarreia.

Julgamos importante avaliar os fatores de virulência na primeira semana, pois caso contrário como no trabalho apresentado por Coelho (2010), teríamos que avaliar somente pela presença ou não de diarreia, mas sem poder afirmar que havia a presença de fatores de virulência presentes nos animais antes do início do estudo.

A F4 é encontrada com maior frequência em leitões com mais de 21 dias de vida. Ao contrário Menin (2008), relata em seu estudo que na fase de creche, houve maior ocorrência de cepas F4 / (K88) 11,2% e F18 5,4%, respectivamente. O que corrobora com nossos resultados, pois encontramos uma maior percentagem de F4 (37,5%) e F18 (70,31%).

Nossos resultados não estão de acordo com Lazo (2007) que em seu estudo realizado com leitões diarreicos por *E.coli* no pós-desmame relata que não encontrou genes para F4 apesar de ser um dos fatores de colonização mais frequentes. Segundo o trabalho realizado por Macedo et al (2007), quarenta e duas (29,2%) das 144 amostras estudadas foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência testados (fímbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41; e toxinas: LT, STb, STa e Stx). Vinte e três amostras (54,8%) apresentaram genes de fímbria e toxina, sete (16,6%) amostras apresentaram somente genes de toxinas e 12 (28,6%), amostras somente genes de fímbrias. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada

ou em associação com outros fatores foi: STb (40,5%), K99 (33,3%), STa (33,3%), LT (19,0%), F18 (19,0%), 987P (14,3%), K88 (14,3%) e F41 (9,5%), contrapondo nossos resultados, onde encontramos fímbrias associadas as toxinas em 85,9% das amostras e em todas as semanas, exceto em relação a fimbria F5 que não foi detectada a presença de genes para a mesma.

Observamos em nosso estudo que a menor percentagem de genes positivos para fímbrias F41, F6 e F4 encontra-se na quarta semana de estudo, assim com a percentagem de genes positivos para as toxinas LT, STx, STa e STb. Guedes (2006) demonstra em seu estudo elevada frequência de isolamento de *E. coli* não patogênicas em leitões com diarreia, estando presente as fímbrias F41, F6 e F4 em 74%, 12,3% e 50% dos casos, respectivamente.

Vários autores Moon et al. (1986), Baccaro et al. (1999), e Costa et al. (2006), relataram que 75% dos resultados confirmados sobre o fator de virulência, em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas, são relacionados a toxina STb. Segundo Fairbrother et al. (2000), genes dos fatores de virulência (STa, STb, LT, K88, K99, 987P, F18 e F41), foram encontrados em 414 (65,6%) de 633 amostras de *E. coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia após o desmame (21 a 50 dias de idade). Os virotipos (combinação de fatores de virulência associados a *E. coli*) mais frequentemente observados segundo Fairbrother et al. (2000), em seu estudo com *E. coli* em leitões no período pós desmame foram LT e Stb (34%), LT, STb e STa (13%), STa e STb (12%), STb (10%) e STa (4%). Quase todos os isolados que apresentaram LT, STb e LT, STa, STb eram F4 (K88) positivos. Entre os isolados que apresentaram STa e STb, 12% eram F18 positivos. Entre os que apresentaram STb, 10% eram F18 positivos, enquanto o restante das amostras foi negativo para todos os genes de fímbrias testados. Entre os que apresentaram a toxina STa, 70% eram F5 (K99) positivos e o restante eram F6 (987P) positivos. No trabalho de Macedo (2007), os isolados que apresentaram STa e STb, e STa, STb e LT também apresentaram genes para as fímbrias F18, F6 (987P) ou F4

(K88). As amostras que apresentaram genes para as enterotoxinas STb e LT, e STb, eram F41, F18 ou F4 (K88) positivas assim como em nosso trabalho. Em nosso trabalho, no decorrer do experimento, observamos que a detecção para as fímbrias F6 (987P) e F41 foi reduzindo ao longo das semanas e F5 não foi observada em nenhuma das coletas. Ao contrário do trabalho de Macedo et al (2007), que relatou como um fato curioso em relação a detecção de ETEC com fímbria K99, 987P e F41 em leitões desmamados em todas as amostras.

Vale salientar que à medida que os animais ficam mais velhos tornam-se mais resistentes, sendo as fímbrias acima citadas, raramente detectadas em animais desmamados (Macedo et al. 2007). As três possíveis explicações para este fato seriam (i) que o manejo de desmama precoce propicia a infecção de animais desmamados ainda jovens; (ii) que esses animais, infectados por cepas possuidoras de fímbrias de adesão e alguns genes de toxinas, tenham tido diarreia por essas amostras anteriormente, mas que essas amostras não estejam envolvidas com o processo diarreico atual; (iii) que a infecção concomitante por outros agentes causadores de diarreia poderia mudar a distribuição por faixa etária (Macedo et al. 2007).

Em nosso trabalho observamos a presença de *E. coli* assim como Silva (2004), trabalhando com ácido láctico e outros ácidos orgânicos, também observou a presença de *E. coli*. Ao contrário, Tsiloyiannis et al. (2001b), verificaram redução no número de *E. coli* β -hemolítica positiva nas fezes dos animais que receberam ácidos orgânicos no período de 28 dias após o desmame. A *E. coli* K88+ β -hemolítica pode diminuir a taxa de crescimento dos animais e, possivelmente, aumentar a mortalidade em decorrência da doença do edema e da diarreia pós-desmame (Pluske et al., 1997; Tsiloyiannis et al., 2001a). Freitas et al (2006) afirmam que proporções de 0,84 % de ácidos orgânicos, na fase de 21 a 35 foram eficientes, considerando-se que não foram isoladas as bactérias *E. coli* α -hemolítica.

No entanto, Risley et al. (1991) não observaram nenhum efeito mensurável da suplementação de 15g de ácido cítrico ou ácido fumárico por quilograma de ração sobre a incidência de diarreia pós-desmame de leitões inoculados com *E. coli* enteropatogênica. Também é importante lembrar que a percentagem de animais com presença de fatores de virulência foi baixa na última semana principalmente no grupo que recebeu o EV. Em nosso ponto de vista uma diminuição da presença dos fatores de virulência é visto de forma positiva e mesmo ainda encontrando-se fatores de virulência presentes nas amostras de animais que não apresentaram diarreia pode ser indicativo de que estes fatores de virulência presentes não estejam sendo expressos.

O mecanismo de ação dos extratos vegetais não está completamente elucidado, mas verificou-se em nosso estudo que houve uma real redução dos fatores de virulência e que estes podem contribuir para a ausência de genes para fímbrias e toxinas nas diarreias pós desmame. Assim, os extratos podem ser uma das alternativas para a redução dos custos de produção e também uma alternativa para as questões de resistência bacteriana, porém mais estudos ainda são necessários para que se compreenda o mecanismo de ação dos extratos vegetais, e de como podem contribuir para a ausência de genes para fímbrias e toxinas nas diarreias pós desmame.

Conclusões

1. A suplementação de EV às dietas de leitões desmamados não altera os perfis enzimáticos (ALT, AST), muscular (CK) e oxidativo (TBARS).
2. Os animais que receberam EV ou sua interação com amoxicilina apresentaram genes para fímbrias e toxinas.

3. A suplementação de EV às dietas de leitões desmamados não determina a ausência de genes de fimbrias e toxinas.

Agradecimentos

Ao labac pelo auxílio prestado na execução das análises. Ao departamento de zootecnia pela concessão das instalações para execução do experimento. A quinabra química natural brasileira ltda, pelo financiamento do projeto. Aos colegas que contribuíram para a execução do experimento.

Referências

ANAMI, R.M., SANTOS, J.M.G., FERREIRA, S.R. Desenvolvimento e avaliação de uma bacterina contra colibacilose em suínos. **Iniciação Científica Cesumar**. 10:2. 2008.

ANTUNES-NETO, J.M.F. et al. Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. **Stress**, v.9, n.2, p.1007-1125, 2006.

ARANTES, V.M. **Níveis de zinco na dieta de leitões recém-desmamados sobre: desempenho, incidência e gravidade de diarreia, isolamento de *E. coli*, perfil de parâmetros sanguíneos e avaliação econômica**. 2002. 81f. Tese (doutorado em Zootecnia). Jaboticabal: Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BRONZONI, P.V.M., et al. **Deteção de genes codificadores de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 9, 1999, Concórdia. Anais...Concórdia: EMBRAPA: CNPSA, 1999.

BANDEIRA, C.M. FONTES, D.O. SOUZA, L.P.O. SALUM, G.M. CORREA, G.S.S. SILVA, M.A.E. **Saúde intestinal dos leitões: um conceito novo e abrangente**. Cadernos Técnicos de veterinária e zootecnia. Belo Horizonte, v.54, p.74-96, 2007.

BARCELLOS, D.E., SATO, J.P.H., ANDRADE, M.R. Diarreias nutricionais dos suínos: uma visão do veterinário clínico. **Anais VI SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura** Porto Alegre-RS. p 23-34. 2011.

BELLAVER, C. & SCHEUERMANN, G. **Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte.** Conferência Avesui, Concórdia, SC. 2004.

BONGERS, J.H., FRANSSSEN, F., ELBERS, A.R.W., TIELEN, M.J.M. **Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from the fecal flora of veterinarians with different professional specialities.** The Veterinary Quarterly. 17:146-149. 1995.

BOUDRY, G.; NEMCOVA, R.; GARCANCIKOVA, S. et al. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglets intestine. **Journal of Nutrition**, v.134, n.9, p.2256-2262, 2004.

CHEVION et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 09, p.5119-5123, 2003.

COELHO, C de P. **Avaliação de tratamento homeopático em suínos infectados por *Escherichia coli*.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Tese de doutorado. 144p., 2010.

COSTA, M.M.; SILVA, M.A.; SPRICIGO, D.A. et al. Caracterização epidemiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p.5-8, 2006.

CUSHNIE, T.P. & LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26:343-356. 2005.

DEBROY, C.; MADDOX, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of Veterinary significance. **Animal Health Research Reviews**, v.1, n.2, p.129-140. 2001.

FAIRBROTHER, J.M.; HIGGINS, R.; DESAUTELS, C. Trends in path types and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Quebec. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 2000, Melbourne. **Anais...**Melbourne: International Pig Veterinary Society, 2000. p.17. (Resumo).

FRANCIS, D. H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal Swine Health Production**. Dakota, v. 10, n. 4, p.171-175. 2002a.

FRANCIS, D. H. Post-weaning *Escherichia coli* syndrome – laboratory perspectives. In: ANNUAL SWINE DISEASE CONFERENCE FOR SWINE PRACTITIONERS, 10, 2002, Iowa, EUA. **Proceedings...** Iowa, 2002b.

FREITAS, L.S. de; LOPES, D.C., FREITAS, A.F. de; Carneiro, J. da C.; Corassa, A.; PENA, S. de M.; COSTA L.F. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1711-1719, 2006 (supl.).

GALLO, B.L. VIOLA, E., CONDE, O.R. de A. **Uso do composto de ácidos orgânicos Profitol em dietas de leitões pré e pós desmame.** Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre, RS, 24-28p. 2003.

GAUTHIER, R. Modo de ação dos acidificantes e interesse que geram na fase de crescimento e terminação. **Revista Pork World**. 5(28): 52-58. 2005.

GLATTLEIDER, D.L. Pathologie digestive du porc en croissance et alimentation. **Recueil de Medecine Veterinaire**. 169(8/9):719-32. 1993.

GUEDES, R. **Avanços na detecção de patógenos entéricos de leitões jovens**. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu, Brasil. Palestras... Foz do Iguaçu, p. 157-161. 2006.

GYLES, C.L., FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L., PRESCOTT, J.F., SONGER, J.G., THOEN, C.O. **Pathogenesis in Bacterial Infections in Animals**. Ames: Blackwell Publishing, 2004. p. 193-223, 2004.

HARRELL, R.J.; ANDREWS, J.; ROBINSON, V.; VAZQUEZ-ANON, M.; CARTER, S. Syntetic antioxidant applications in nonruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, supl.2, p.384, 2008.

LAURIDSEN, C. Evaluation of the effect of increasing dietary vitamin e in combination with different fat sources on performance, humoral immune responses and antioxidant status of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v.158, n.1, p.85-94, 2010.

LAZO, P.L. **Comportamiento Epidemiológico de la colibacilosis entérica porcina en la Provincia de Villa Clara, patotipos, genes de virulencia, y resistencia a antibioticos de los aislados de *E. coli***. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Dpto. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villa Clara, Cuba. (2007). Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060612B/PR16.pdf>> Acesso em 20 de dez. de 2014.

MACEDO, N.R., MENZES, C.P.L., LAGE, A.P. RISTO, L.E., REIS, A., GUEDES, R.M.C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, 1117-1123, 2007.

MENIN, A., RECK, C., SOUZA, Daiane de, KLEIN, C., VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella sp*. **Ciencia Rural**. 38(6):1686-1693. 2008.

MINITAB. 2010. User's guide: Meet Minitab, 16:142 p.

MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A.; MOSELY, S.L. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolates from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.210-212, 1986.

MORÉS, N.; MARQUES, J.L.L.; SOBESTIANSKY, J. et al. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. (Eds.). **Suinocultura intensiva - Produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.135-161.

NÉVOA, M.L.; JÚNIOR, J.G.C.; CORRÊA, G.S.S.; ARANTES, V.M.; KAMIMURA, R.; GONÇALVES F.C.; OLIVEIRA, M.S.F.; SANTOS, A.L.; NALON, R.P. **Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, n.2, p.447-454, 2013.

NRC. 1998. **Nutrient requirements of swine**. 10 ed. Washington: National Academy. 189p.

PADAYATTY, S.J., KATZ, A., WANG, Y., ECK, P., KWON, O., LEE, J.H., CHEN, S., CORPE, C., DUTTA, A., DUTTA, S.K., LEVINE, M. Vitamin C as an Antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**. 22(1): 18-35. 2003.

PION, S.J., VAN HEUGTEN, E., SEE, M.T., LARICK, D.K., PARDUE, S. Effects of vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations and meat quality in swine. **Journal of Animal Science**. 82:2004-2012. 2004.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v.51, p.215-236, 1997.

RISLEY, C.R.; KORNEGAY, E.T.; LINDERMANN, M.D. et al. Effects of organics acid with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weaning pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.35, p.259-270, 1991.

SANTOS, W.G.; FILGUEIRAS, E.P.; BERTECHINI, A.G. et al. Manose na alimentação de leitões na fase de creche (desempenho, pH do trato gastrintestinal e peso dos órgãos). **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.696-702, 2003.

SCOCCIA, A.E. et al. Simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. **BMC. Clinical Pathology**, v.1, p.1-5, 2001.

SILVA, G.F. **Digestibilidade ileal de aminoácidos de soja micronizada e de farelo de soja para suínos e avaliação de acidificantes em dietas para leitões**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, A.M.R. da; BERTO, D.A.; LIMA, G.J.M.M. de; WECHSLER, F.S.; PADILHA, P. de M.; CASTROV, S. **Valor nutricional e viabilidade econômica de rações suplementadas com maltodextrina e acidificante para leitões desmamados.** Revista Brasileira de Zootecnia. v.37, n.2, p.286-295, 2008.

STOREY, K.B. Oxidative stress, animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** Ribeirão Preto, v.29, n.12, p.1715-1733, 1996.

TSILOYIANNIS, V.K.; KYRIAKIS, S.C.; VLEMMAS, J. et al. The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. **Research in Veterinary Science,** v.70, p.281-285, 2001a.

WEISS, W.P.; MAHAN, D.C. Oxidative stress during the lifecycle of animals. **Journal of animal Science.** Champaign, v.86, supl.2, p.383, 2008.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN M.E.; AUST, S.D. Deleterious ironmediated oxidation of biomoleculares. **Free Radical Biology & Medicine.** New York, v.32, n.7, p.577-583, 2002.

YAEGER, M.J., KINYON, J.M., SONGER, J.G.A. Prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium Difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** 1:52-59. 2007.

ZLOTOWSKI, P., DRIEMEIER, D., BARCELLOS, D.E.S.N. **Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos.** *Acta Scientiae Veterinariae.*v. 36, p.81-86.2008.

Tabela 1. Determinação dos níveis de enzima creatina quinase (CK) ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas enriquecidas com bioflavonóides e ácido ascórbico.

| Tratamentos (T) | Dia 0 | | Dia 7 | | Dia 14 | | Dia 21 | | Período total | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------|
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| Controle (C) | 1497,3 | 1485,3 | 1517,0 | 1434,0 | 1452,3 | 1481,3 | 1283,0 | 1271,5 | 1437,4 | 1418,0 |
| C+EV | 1324,2 | 1365,0 | 1415,8 | 1362,0 | 1296,8 | 1279,3 | 1157,8 | 1155,3 | 1298,7 | 1290,3 |
| A | 1427,2 | 1422,0 | 1468,0 | 1419,3 | 1347,0 | 1309,0 | 1233,8 | 1165,0 | 1369,1 | 1328,7 |
| C+EV+A | 1427,0 | 1464,8 | 1439,0 | 1378,0 | 1271,0 | 1328,2 | 1267,8 | 1186,0 | 1351,0 | 1339,3 |
| Dpr | 149,1 | 218,8 | 402,3 | 228,2 | 244,5 | 180,2 | 136,8 | 210,0 | 167,3 | 124,4 |
| Probabilidade | | | | | | | | | | |
| T | 0,32 | 0,96 | 0,78 | 0,89 | 0,73 | 0,32 | 0,35 | 0,82 | 0,44 | 0,62 |
| R | 0,83 | 0,49 | 0,17 | 0,27 | 0,84 | 0,71 | 0,48 | 0,86 | 0,35 | 0,51 |

EV=Extratos vegetais; A=Amoxicilina; DPR=desvio padrão residual; R=repetição; M=macho; F=fêmea.

Tabela 2. Avaliação de AST ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico.

| Tratamentos (T) | Dia 0 | | Dia 7 | | Dia 14 | | Dia 21 | | Período total | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|---------------|-------|
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| Controle (C) | 29,25 | 29,5 | 37,75 | 37,83 | 55,00 | 55,17 | 56,75 | 56,67 | 44,69 | 44,79 |
| C+EV | 29,16 | 29,25 | 37,00 | 37,25 | 54,67 | 54,25 | 56,00 | 56,25 | 44,21 | 44,25 |
| A | 29,33 | 29,50 | 37,83 | 37,75 | 54,83 | 54,50 | 56,33 | 56,50 | 44,58 | 44,56 |
| C+EV+A | 29,25 | 29,50 | 37,75 | 37,33 | 54,50 | 55,50 | 56,80 | 56,50 | 44,56 | 44,71 |
| Dpr | 4,15 | 8,67 | 3,13 | 1,50 | 13,39 | 6,46 | 14,68 | 5,18 | 6,34 | 2,58 |
| Probabilidade | | | | | | | | | | |
| T | 0,99 | 0,95 | 0,95 | 0,89 | 1,00 | 0,99 | 0,96 | 0,46 | 0,98 | 0,98 |
| R | 0,48 | 0,17 | 0,53 | 0,42 | 0,38 | 0,82 | 0,55 | 0,01 | 0,36 | 0,22 |

EV=Extratos vegetais; A=Amoxicilina; DPR=desvio padrão residual; R=repetição; M=macho; F= fêmea.

Tabela 3. Avaliação de ALT ($U L^{-1}$) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico.

| Tratamentos (T) | Dia 0 | | Dia 7 | | Dia 14 | | Dia 21 | | Período total | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|---------------|-------|
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| Controle (C) | 45,25 | 45,83 | 40,25 | 40,17 | 54,75 | 54,83 | 54,50 | 54,33 | 48,69 | 48,79 |
| C+EV | 44,00 | 44,50 | 40,67 | 39,75 | 54,67 | 54,00 | 54,00 | 53,75 | 48,33 | 48,00 |
| A | 46,50 | 45,00 | 40,00 | 40,25 | 55,00 | 54,25 | 54,33 | 54,25 | 48,96 | 48,43 |
| C+EV+A | 46,25 | 45,67 | 44,75 | 40,33 | 54,50 | 54,17 | 54,25 | 53,83 | 48,94 | 48,50 |
| Dpr | 3,73 | 8,50 | 8,28 | 4,75 | 5,76 | 3,20 | 6,43 | 4,06 | 2,29 | 2,50 |
| Probabilidade | | | | | | | | | | |
| T | 0,52 | 1,00 | 0,91 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,67 | 0,94 | 0,31 | 0,98 |
| R | 0,09 | 0,74 | 0,26 | 0,97 | 0,46 | 0,81 | 0,03 | 0,12 | 0,01 | 0,39 |

EV=Extratos vegetais; A=Amoxicilina; DPR=desvio padrão residual; R=repetição; M=macho; F=fêmea.

Tabela 4. Avaliação de TBARS (nmol) de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico.

| Tratamentos (T) | Dia 0 | | Dia 7 | | Dia 14 | | Dia 21 | | Período total | |
|-----------------|-------|------|-------|------|--------|------|--------|------|---------------|------|
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| Controle (C) | 0,44 | 0,47 | 0,80 | 0,89 | 1,49 | 1,62 | 2,72 | 2,59 | 1,36 | 1,39 |
| C+EV | 0,44 | 0,45 | 0,66 | 0,71 | 1,49 | 1,41 | 2,68 | 2,57 | 1,32 | 1,28 |
| A | 0,45 | 0,50 | 0,65 | 0,76 | 1,52 | 1,62 | 2,70 | 2,87 | 1,33 | 1,44 |
| C+EV+A | 0,40 | 0,49 | 0,82 | 0,86 | 1,52 | 1,57 | 2,76 | 2,90 | 1,37 | 1,46 |
| Dpr | 0,05 | 0,12 | 0,11 | 0,12 | 0,03 | 0,31 | 0,16 | 0,34 | 0,04 | 0,16 |
| Probabilidade | | | | | | | | | | |
| T | 0,38 | 0,90 | 0,06 | 0,10 | 0,51 | 0,55 | 0,93 | 0,32 | 0,17 | 0,38 |
| R | 0,31 | 0,92 | 0,28 | 0,43 | 0,78 | 0,07 | 0,17 | 0,80 | 0,75 | 0,55 |

EV=Extratos vegetais; A=Amoxicilina; DPR=desvio padrão residual; R=repetição; M=macho; F=fêmea.

CAPÍTULO 4

10 DISCUSSÃO GERAL

As diarreias são frequentes nas criações de suínos e provocam grandes prejuízos econômicos. Em uma rápida reflexão sobre a ocorrência das diarreias de suínos, o que determina sua importância são fatores como o número de doentes, o curso da doença, o grau de desidratação dos leitões afetados, a mortalidade especificamente devida ao problema, a repetição de episódios em diferentes lotes e as quantidades e eficiência das medicações e vacinações em curso (BARCELLOS et al., 2011).

As diarreias cursam com sinais clínicos como perda de solutos e água, depleção de eletrólitos, desequilíbrio ácido-básico e desidratação, que pode ser fatal se não tratada adequadamente (ZLOTOWSKI et al., 2008). Pesquisas têm sido realizadas com prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais (EV). Estes últimos, representado pelos compostos fenólicos (bioflavonóides ou flavonóides) e o ácido ascórbico. Os bioflavonóides são antioxidantes naturais, com ações antiinflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas e imuno-estimulantes (CUSHNIE; LAMB, 2005). O ácido ascórbico participa de diversos processos metabólicos, como a formação do colágeno e síntese de epinefrina, corticosteróides e ácidos biliares (PION et al., 2004). Além de co-fator enzimático, o ácido ascórbico participa dos processos de oxido-redução, aumentando a absorção de ferro e a inativação de radicais livres (PADAYATTY et al., 2003). Embora, em nosso estudo, o desempenho animal não tenha apresentado diferenças entre os tratamentos para peso inicial e final e para ganho diário de peso, a literatura afirma que os benefícios da utilização terapêutica do ácido ascórbico em suínos são observados no desempenho (PION et al., 2004). E ainda, os acidificantes passaram a ser utilizados nas dietas dos suínos nas fases iniciais de crescimento, auxiliando no

desempenho após o desmame (MIGUEL, 2008). Entretanto, em nosso trabalho, os machos do grupo controle apresentaram consumo diário médio de ração (CDMR) 1,8% superior aos demais tratamentos e conversão alimentar (CA) 2,11% superior em relação ao tratamento com EV. É importante salientar que os aspectos nutricionais que envolvem os extratos vegetais têm sido mensurados pelas atividades antimicrobianas, sobre os sistemas enzimáticos, estruturas celulares e moléculas biológicas. Porém, é interessante lembrar que os efeitos biológicos dos antioxidantes naturais são potencializados pelas interações entre os constituintes da fórmula (MIDDLETON et al., 2000). Por exemplo, a biodisponibilidade e eficácia da vitamina C e dos bioflavonóides são inferiores se administrados de forma isolada (NAVARRO et al., 2008). Entre as várias ações, os antioxidantes protegem o sistema imunológico. Os bioflavonóides modulam algumas respostas inflamatórias, como a inibição da PGE₂, IgE e inibição da fagocitose da membrana de mielina no processo de esclerose múltipla (FLÓREZ, 2002).

Foi observado no estudo maior consumo médio diário de ração dos machos do grupo controle e por consequência pior conversão alimentar, se comparado aos demais tratamentos. Em outro trabalho, um dos constituintes da fórmula dos EV, mais especificamente o ácido fumárico, utilizado em dietas para leitões no pós-desmame melhorou o desempenho dos animais, tanto no ganho de peso e conversão alimentar, assim como aumentou o consumo de ração (TEIXEIRA et al., 2003). Já o uso 1,5 a 3,0% de ácido cítrico na dieta de leitões no pós desmame, não apresentou melhora no ganho de peso e na eficiência alimentar (RADECKI et al., 1988). Portanto, as respostas das características de desempenho e dos coeficientes de digestibilidade aparente de nutrientes, frente à suplementação com os extratos vegetais estudados são variáveis e contraditórias (MIGUEL, 2008).

A contagem total de colônias bacterianas do grupo controle foi superior aos tratamentos com A, EV+A e EV, respectivamente. A contagem de colônias pequenas do

grupo controle foi superior aos tratamentos com A, EV+A e EV, respectivamente. Já, a contagem de colônias médias do tratamento com A foi superior aos tratamentos com EV, EV+A e ao grupo controle, respectivamente. Em relação às colônias grandes não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Já, na contagem em meio MacConkey, o grupo tratado com A foi superior aos tratamentos com EV+A, EV e controle, respectivamente.

Inúmeras hipóteses são sugeridas a respeito do mecanismo de ação dos acidificantes e entre elas a redução do pH estomacal, alterações da microflora intestinal (por meio de controle bactericida) ou bacteriostático, melhora na digestibilidade e retenção de nutrientes (MIGUEL, 2008). É importante recordar que a secreção de ácido clorídrico, em leitões jovens é limitada. Isto foi observado em outro trabalho, o qual avaliou dietas líquidas fermentadas ou não e, salientou que a redução do pH favoreceria o aproveitamento dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos orgânicos) e o controle de enterobactérias (CANIBE et al., 2007). Nesse sentido, o uso de acidificantes nas dietas de leitões no pós desmame pode servir como adjuvante no controle do pH estomacal e auxiliar na digestão de alimentos à base de grãos e farelos vegetais (GALLO et al., 2003).

Um dos mecanismos de controle microbiano refere-se à capacidade que os acidificantes possuem de alterar o pH do meio, em função do seu potencial de dissociação (pKa) (PARTANEN; MROZ, 1999). Quando o ácido está na forma ionizada pode difundir-se livremente através da membrana semipermeável do microorganismo para seu citoplasma celular e dentro da célula em um ambiente mais alcalino libera o próton resultando na diminuição do pH intracelular (CANIBE et al., 2001). Este aspecto influencia no metabolismo microbiano, inibindo a liberação de importantes enzimas e forçando a célula bacteriana a usar energia para liberar prótons, conduzindo ao acúmulo intracelular de ânions e em consequência reduz sua taxa de crescimento e isto devido ao consumo de energia através da ação da bomba ATPase que bombeia prótons (H^+) até o esgotamento dessa bactéria (GAUTHIER, 2005).

Esses eventos relatados a cima podem ter acontecido em nosso estudo, pois a contagem total de colônias bacterianas foi favorável aos tratamentos com EV e EV+A. Como exemplo, a contagem total de colônias do tratamento com EV foi 70,9% inferior ao grupo controle, o que nos remete a possibilidade dos EV apresentarem efetivamente propriedades antimicrobianas. Nesse sentido, os resultados obtidos em meio MacConkey permitem diferenciar presuntivamente gêneros e espécies de microorganismos através de coloração ou morfologia das colônias. Em nosso trabalho, foi observado que o grupo que recebeu EV, apresentou redução de 91,78% na contagem de colônias, se comparado ao grupo controle. Através desses resultados e provas bioquímicas realizadas, podemos estimar que essas colônias são do gênero *E coli*. A *E. coli* é o microorganismo mais presente em amostras de fezes e integrante da microbiota saprófita intestinal. A *E. coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa com morfologia bastonete, Gram negativa, fermentadora de lactose e que cresce facilmente em meios de cultura como ágar MacConkey, formando grandes colônias vermelhas (GYLES; FAIRBROTHER, 2004). Sob avaliação bioquímica, ela apresenta reação positiva para o Indol, negativa para a produção de urease e sulfito de hidrogênio e não utilização do citrato como fonte de carbono. Essas provas permitem sua distinção entre as Enterobacteriaceas (DEBROY; MADDOX, 2001).

Na avaliação do antibiograma (dados percentuais), resumidamente, podemos observar que o antibiograma com os discos de Amoxicilina, Norfloxacina e Ampicilina apresentaram maiores percentuais de resistência independente dos tratamentos. Ainda, podemos observar que o antibiograma com discos de neomicina apresentaram 100% de sensibilidade intermediária no tratamento com EV+A e 0% de resistência nos demais tratamentos.

Dentre as medidas para a redução e controle da *E. coli* encontra-se a antibioticoterapia (GLATTLEIDER,1993). Trabalhos de sensibilidade aos antibióticos têm sido realizados com resultados variáveis (WILSON, 1981; BOROWSKI et al., 1993). Em virtude da diversidade

de comportamento da *E. coli* frente aos antimicrobianos, principalmente pelo uso de subdoses de antibióticos e pela fácil transferência da resistência através de plasmídeos entre amostras bacterianas, em nosso estudo foi realizado antibiograma das amostras de fezes de todos os tratamentos. Observamos que os tratamentos efetivamente não influenciaram nos resultados do antibiograma. A sensibilidade observada pode ser o efeito direto dos discos de antibióticos adicionados às amostras.

Os antibióticos Cefepine (CPM), Ceftriaxona (CRO), Meropenem (MPM) foram eficientes em todas as amostras avaliadas. Esses antimicrobianos são mais eficientes provavelmente por inibirem a síntese de parede microbiana, o que resulta na morte bacteriana. Isto é possível porque as células Gram negativas (Ex. *E. coli*) possuem uma parede celular muito mais complexa, o que as torna mais resistentes aos antibióticos, devido a incapacidade de alguns não atravessarem a membrana lipídica que constituem sua parede celular. Para se ter acesso a célula bacteriana, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos de porina embebidos na estrutura lipídica que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim antibióticos com maior atividade frente a gram-negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em sua estrutura química (GUIMARÃES et al., 2010).

O segundo artigo avaliou a dosagem bioquímica CK ($U L^{-1}$), AST ($U L^{-1}$), ALT ($U L^{-1}$), TBARS (nmol) e a frequência dos genes de fímbrias (F41, F6 (987 P), F4 (K88), F18 e F5 (K99) e toxinas (LT, STx, LTa e LTb) de cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia usando a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes.

Observamos no presente trabalho que a CK, AST, ALT e TBARS de leitões em fase de creche alimentados com dietas contendo bioflavonóides e ácido ascórbico, não apresentou diferenças entre os tratamentos. Névoa (2013), não encontrou diferenças entre os valores dos parâmetros bioquímicos séricos analisados dos leitões submetidos a diferentes tratamentos

aditivos alternativos a substituição de antibióticos. Semelhantes resultados encontrou Arantes (2002), em suas pesquisas com leitões desmamados, alimentados com dietas submetidas a diferentes níveis de zinco (zero, 1.500, 3.000 e 4.500 ppm) adicionados à ração. A CK é indicativo de lesão muscular assim como a AST, porém verificamos que não diferenças o que nos leva a pensar que o transporte dos animais e o manejo dos mesmos tenham sido feitos nas condições adequadas e a manutenção dos mesmos durante a condução do experimento tenha sido a ideal em virtude dos valores manterem-se sem alterações significativas.

Não encontramos diferença na avaliação de TBARS em relação aos tratamentos. Sabemos que em determinadas situações de estresse na ativação imune observa-se que as defesas antioxidantes do organismo podem estar sobrecarregadas (STOREY, 1996), provocando um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (WEISS; MAHAN, 2008; HARRELL et al., 2008; STOREY, 1996). Caso este desequilíbrio seja favorável as moléculas oxidantes, pode haver injúrias histológicas e fisiológicas e até morte celular, acarretando na redução do desempenho (HARREL et al., 2008; WELCH, 2002). Isto, caracteriza o estresse oxidativo.

Na fase pós desmame, as concentrações séricas de diversos antioxidantes diminuem acentuadamente nos leitões, modificando o *status* antioxidante do animal, como a diminuição na concentração de alfa-tocoferol na maioria dos tecidos (LAURIDSEN, 2008, 2010; Weiss; Mahan, 2008). Ingredientes de baixa qualidade na dieta, condições de ativação imune, estresse ambiental e elevada taxa de crescimento podem predispor os leitões ao estresse oxidativo (BANDEIRA et al., 2007; HARREL et al., 2008). Nessas condições, é prudente reforçar o sistema antioxidante do animal através da dieta (WEISS; MAHAN, 2008). Outro trabalho em que os leitões desmamados receberam dietas suplementadas com diferentes níveis de zinco (zero, 1.500, 3.000 e 4.500ppm), apresentou resultados semelhantes aos nosso estudo

(ARANTES, 2002). Mais estudos são necessários para que se compreenda o mecanismo de ação dos extratos vegetais com relação ao mecanismo antioxidante.

Foi avaliada a presença positiva de genes para as seguintes fímbrias: F41, F6, F4, F18, F5 e a presença de genes positivos para as seguintes toxinas: LT, STx, STa e STb. Das 64 amostras, 85,93% apresentaram genes para fímbrias e toxinas, 35,93% apresentaram genes somente para fímbrias e somente duas amostras apresentaram genes somente para toxinas. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada ou em associação com outros fatores foi: F41 (10,93%), F6 (21,87%), F4 (37,5%), F18 (70,31%), LT (39,6%), Stx (42,18%), STa (60,93%) e STb (75%). Em todas as 64 amostras não foram encontrados fator de virulência para F5 (k99).

A F4 é encontrada com maior frequência em leitões com mais de 21 dias de vida. Ao contrário Menin (2008), relata em seu estudo que na fase de creche, houve uma maior ocorrência de cepas F4 / (K88) 11,2% e F18 5,4%, respectivamente. O que corrobora com nossos resultados, pois encontramos uma maior porcentagem de F4 (37,5%) e F18 (70,31%).

Nossos resultados não estão de acordo com Lazo (2007), que em seu estudo realizado com leitões diarreicos por *E. coli* no pós-desmame relata que não encontrou achado positivo para F4 apesar de ser um dos fatores de colonização mais frequentes. Segundo o trabalho realizado por Macedo et al (2007), quarenta e duas (29,2%) das 144 amostras estudadas foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência testados (fímbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41; e toxinas: LT, Stb, Sta e Stx). Vinte e três amostras (54,8%) apresentaram genes de fímbria e toxina, sete (16,6%) amostras apresentaram somente genes de toxinas e 12 (28,6%), amostras somente genes de fímbrias. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada ou em associação com outros fatores foi: STb (40,5%), K99 (33,3%), STa (33,3%), LT (19,0%), F18 (19,0%), 987P (14,3%), K88 (14,3%) e F41 (9,5%), contrapondo nossos resultados, onde encontramos fímbrias associadas as toxinas em 85,9% das amostras e

em todas as semanas, exceto em relação a fímbria F5 que não foi detectada a presença de genes para a mesma.

Observamos que a menor percentagem de genes positivos para fímbrias F41, F6 e F4 encontra-se na quarta semana de estudo, assim como a percentagem de genes positivos para as toxinas LT, STx, STa e STb. Guedes (2006), demonstra em seu estudo elevada frequência de isolamento de *E. coli* não patogênicas em leitões com diarreia, estando presente as fímbrias F41, F6 e F4 respectivamente, em 74%, 12,3% e 50% dos casos, resultados confirmados no seu estudo. Moon et al. (1986), Baccaro et al. (1999) e Costa et al. (2006,) relataram que 75% dos resultados confirmados sobre o fator de virulência, em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas, são relacionados a toxina STb. Segundo Fairbrother et al. (2000), genes de fatores de virulência (Sta, Stb, LT, K88, K99, 987P, F18 e F41), foram encontrados em 414 (65,6%) de 633 amostras de *E. coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia após o desmame (21 a 50 dias de idade). Os virotipos (combinação de fatores de virulência associados a *E. coli*) mais frequentemente observados segundo Fairbrother et al. (2000), em seu estudo com *E. coli* em leitões no período pós desmame foram LT e Stb (34%), LT, Stb e Sta (13%), Sta e STb (12%), Stb (10%) e Sta (4%). Quase todos os isolados que apresentaram LT, Stb e LT, Sta, Stb eram F4 (K88) positivos. Entre os isolados que apresentaram Sta e Stb, 12% eram F18 positivos. Entre os que apresentaram Stb, 10% eram F18 positivos, enquanto o restante das amostras foi negativo para todos os genes de fímbrias testados. Entre os que apresentaram a toxina Sta, 70% eram F5 (K99) positivos e o restante eram F6 (987P) positivos. No trabalho de Macedo (2007), os isolados que apresentaram Sta e Stb, e Sta, Stb e LT também apresentaram genes para as fímbrias F18, F6 (987P) ou F4 (K88). As amostras que apresentaram genes para as enterotoxinas Stb e LT, e Stb, eram F41, F18 ou F4 (K88) positivas assim como em nosso trabalho.

Em nossa pesquisa a medida que os animais foram ficando mais velhos observamos que a detecção para as fímbrias F6 (987P) e F41 foram reduzindo ao longo das semanas e F5 não observada em nenhuma das coletas ao contrário do trabalho de Macedo et al (2007), foi relatado a detecção de ETEC com fímbria K99, 987P e F41 em leitões desmamados em todas as amostras. Vale salientar que à medida que os animais ficam mais velhos tornam-se mais resistentes, sendo as fímbrias acima citadas, raramente detectadas em animais desmamados (Macedo et al.2007). As três possíveis explicações para este fato seriam (i) que o manejo de desmama precoce propicia a infecção de animais desmamados ainda jovens; (ii) que esses animais, infectados por cepas possuidoras de fímbrias de adesão e alguns genes de toxinas, tenham tido diarreia por essas amostras anteriormente, mas que essas amostras não estejam envolvidas com o processo diarreico atual; (iii) que a infecção concomitante por outros agentes causadores de diarreia poderia mudar a distribuição por faixa etária (Macedo et al. 2007).

A presença de e.coli assim como Silva (2004), trabalhando com ácido láctico e outros ácidos orgânicos, também observou a presença de *E. coli*, ao contrário de Tsioloyiannis et al. (2001b), que verificaram redução no número de *E. coli* β -hemolítica positiva nas fezes dos animais que receberam ácidos orgânicos no período de 28 dias após o desmame. A *E. coli* K88+ β -hemolítica pode diminuir a taxa de crescimento dos animais e, possivelmente, aumentar a mortalidade em decorrência da doença do edema e da diarreia pós-desmame (PLUSKE et al., 1997; TSILOYIANNIS et al., 2001a). Freitas et al (2006), afirma que proporções de 0,84 de ácidos orgânicos, na fase de 21 a 35 foram eficientes, considerando-se que não foram isoladas as bactérias *E. coli* α -hemólise. No entanto, Risley et al. (1993), não observaram nenhum efeito mensurável da suplementação de 15g de ácido cítrico ou ácido fumárico por quilograma de ração sobre a incidência de diarreia pós-desmame quando os leitões foram inoculados com *E. coli* enteropatogênica.

Julgamos importante avaliar os fatores de virulência na primeira semana, pois caso contrário como no trabalho apresentado por Coelho (2010), teríamos que avaliar somente pela presença ou não de diarreia, mas sem poder afirmar que havia a presença de fatores de virulência presentes nos animais antes do início do estudo. Também é importante lembrar que a percentagem de animais com presença de fatores de virulência foi baixa na última semana principalmente no grupo que recebeu o EV. Em nosso ponto de vista uma diminuição da presença dos fatores de virulência é visto de forma positiva e mesmo ainda encontrando-se fatores de virulência presentes nas amostras de animais que não apresentaram diarreia pode ser indicativo de que estes fatores de virulência presentes não estejam sendo expressos.

A PCR múltipla (multiplex PCR) pode detectar, num único ensaio, vários determinantes de virulência (FRANCIS, 2002a; GUEDES, 2006a; GYLES et al., 2004; HOLLAND, 1990). Embora tenha uma maior demanda técnica, a amplificação gênica elimina o problema da baixa expressão *in vitro* de alguns fatores de virulência. Entretanto, o método não indica se o gene é funcional e se de fato o fator de virulência está sendo expresso, indica apenas que ele está presente (FRANCIS, 2002a; FRANCIS, 2002b), em virtude disso, salientamos que mesmo as amostras tendo apresentado genes positivos para fímbrias e toxinas não significa que estes animais apresentaram diarreia.

O mecanismo de ação dos extratos vegetais não está completamente elucidado, mas podemos verificar que há uma real redução de fatores de virulência e que estes podem contribuir para a ausência de genes para fímbrias e toxinas nas diarreias pós desmame. Adicionalmente, podemos estimar que o uso dos extratos vegetais pode ser uma das alternativas para a redução de altos custos e para as questões de resistência bacteriana que tanto se tem debatido. No entanto, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo de ação dos extratos vegetais e a forma como podem contribuir para a ausência de genes para fímbrias e toxinas nas diarreias pós desmame.

Portanto, na caracterização de um desequilíbrio intestinal, as diarreias aparecem comumente como um importante sinal da complexidade do processo. É interessante lembrar que a dinâmica intestinal é contínua, com respostas imunes de intensidades diferentes sobre substâncias ou agentes ofensivos e inofensivos. Estes desafios impostos, muitas vezes por ações multifatoriais, recursos nutricionais ou alimentares podem ser interessantes para acelerar a recuperação de eventuais danos no sistema digestivo. Para tanto, mais estudos são necessários para avaliar os níveis ideais de inclusão e melhores combinações dos extratos vegetais, tendo em vista a possibilidade de melhorar a resposta imune de leitões na fase de creche.

CAPÍTULO 5

11 CONCLUSÕES GERAIS

O uso de bioflavonóides e ácido ascórbico não alteraram o desempenho de suínos na fase de creche. O uso de extratos vegetais e associados a Amoxicilina reduz a contagem de colônias bacterianas. Também observamos uma alta resistência das amostras estudadas aos antibióticos como a Amoxicilina, a Neomicina e a Norfloxacin. Os antimicrobianos Cefepine, Ceftriaxona e Mepipenem foram os mais eficientes na inibição do crescimento das amostras de *E. coli* isoladas de suínos suplementados com ácido ascórbico e bioflavonóides.

A suplementação de EV à dietas de leitões desmamados não altera os perfis enzimático (ALT, AST), muscular (CK) e oxidativo (TBARS). O grupo de animais que recebeu EV ou sua interação apresentou genes para fímbrias e toxinas. A suplementação de EV à dieta de leitões desmamados não determinou a ausência de genes para a presença de fímbrias e toxinas.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Estatísticas nacionais da suinocultura. Abate de suínos no Brasil. São Paulo, 2013. Disponível em: <associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014.
- ANAMI, R.M.; SANTOS, J.M.G. dos, FERREIRA, S.R. Desenvolvimento e avaliação de uma bacterina contra colibacilose em suínos. *Iniciação Científica CESUMAR*, v. 10, n.02, p. 135-140. 2008.
- ARANHA, F.Q.; BARROS, Z.F.; MOURA, L.S.A.; GONÇALVES, M.D.C.R.; BARROS, J.C.D.; METRI, J.C.; SOUZA, M.S.D. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. *Revista de Nutrição*, v.13, n.2, 2000.
- ARANTES, V.M. **Níveis de zinco na dieta de leitões recém-desmamados sobre: desempenho, incidência e gravidade de diarreia, isolamento de *E. coli*, perfil de parâmetros sanguíneos e avaliação econômica.** 2002. 81f. Tese (doutorado em Zootecnia). Jaboticabal: Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of diarrhea. In: ANDERSON, N.V. **Veterinary gastroenterology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap.10, p.163-172.
- ARGENZIO, R.A. et al. Pathophysiology of swine dysentery: colonic transport and permeability studies. **Journal Infectious Diseases**, v.142, p.676-684, 1980.
- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BRONZONI, P.V.M., et al. **Deteção de genes codificadores de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 9, 1999, Concórdia. Anais...Concórdia: EMBRAPA: CNPSA, 1999.
- BALL, J.M. et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotavirus nonstructural glycoprotein. **Science**, v.272, p.101-104, 1996.
- BANDEIRA, C.M. FONTES, D.O. SOUZA, L.P.O. SALUM, G.M. CORREA, G.S.S. SILVA, M.A.E. **Saúde intestinal dos leitões: um conceito novo e abrangente.** Cadernos Técnicos de veterinária e zootecnia. Belo Horizonte, v.54, p.74-96, 2007.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; SATO, J.P.H; ANDRADE, M.R. Diarreias nutricionais dos suínos: Uma visão do veterinário clínico. **Anais...In: Simpósio Internacional de Suinocultura, Porto Alegre/RS, P.23-34, 2011.**

BARNES, E. Anaerobic bacteria of the normal intestinal microflora of animals. In: MEAD, G.C. **Anaerobic bacteria in habitats other than man**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986. p. 225-238.

BATISTA, S.L. Flavonoides e mananoligossacarídeos em dietas para frangos de corte. Botucatu: Unesp, 2005. 54 f. **Dissertação** (Mestrado)-Curso de Pós-graduação em Zootecnia, universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

BEIER, R. C. et al. Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. **Bulletin of Environment Contamination Toxicology**, v. 75, n. 5, p. 835-844, nov., 2005.

BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Memória...** Buenos Aires: [s.n]. p. 93-108.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. **Aplicações de ácidos orgânicos na produção de aves de corte**. In: CONFERENCIA AVESUI, 3, 2004, Florianópolis, SC. Anais eletrônicos... Concórdia: Embrapa CNPSA, 2004. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_h6n45p3z.pdf> Acessado em: 20 de setembro de 2014.

BENARROCH, E.E. Enteric nervous system. **Neurology**, v.69, p.1953-1967, 2007.

BERKES, J. et al. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. **Gut**, v.52, p.439-451, 2003.

BERTOL, T.M. Nutrição e alimentação dos leitões desmamados em programas convencionais e no desmame precoce. Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**, 2000. 44p.

BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B.E. **Diseases of Swine**. Iowa: Iowa State University Press, 1999. Cap.32. p.431-468.

BEST, P. Como atuam los ácidos como promotores de crecimiento? Problema modo complejo de acción: atacando micróbios patogênicos y ayudando la digestión de amino ácidos. **Alimentos Balanceados para Animales**, p.18-19, 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**, v.77, p.2974-2984, 1999.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; STEPAN, A. L. Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *E. coli* isoladas de suínos recentemente desmamados. **ABRAVES**, Goiânia, MT, p.81. 1993.

BRAZ, D. B., COSTA, L. B., BERENCHTEIN, B., TSE, M. L. P., ALMEIDA, V. V. e MIYADA, V. S. Acidificantes como alternativa aos antimicrobianos promotores do crescimento de leitões. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.231, p.745-756, 2011.

BRAZ, D.B. **Acidificantes como alternativas aos antimicrobianos melhoradores do desempenho de leitões na fase de creche**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em agronomia)-Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BRITO B.G. TAGLIARI, K.C. PIFFER, I.A. LEITE, S.S. SILVA, A.B. Virulência de *Escherichia coli* O139: K82. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.119-122, 2001.

BRITO, B.G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria - RS, v.34, n.2, p. 645-652, 2004.

BRITO, B.G. et al. **Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs**. *Veterinary-Microbiology*. Netherlands, v.65, n.2, p.123-132, 1999.

BRUGALLI, I. **Alimentação alternativa**: a utilização de fitoterapicos ou nutraceuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUINOS, Campinas, 2003. Anais. Campinas: CBNA, 2003. p.167-182.

BRUNET, J.P. et al. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role microvillar actin alteration. **Journal of Virology**, v.74, p.2323–2332, 2000.

BURGESS, M.N.; BYWATER, R.J.; COWLEY, C.M. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. **Infection and Immunity**, Washington, v.21, p.526-531, 1978.

BURNELL, T.W., CROMWELL, G.L., STAHLY, T.S. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, v. 66, p.1100-1108, 1988.

BURROWS, N.R.; RANKIN, J.D. A further examination of the survival of pathogenic bacteria in cattle slurry. **The British Veterinary Journal**. Eglan, v.116, n.8, 1970.

CANIBE, N.; HOJBERG, O.; BADSBERG, J.H.; JENSEN, B. B. Effect of feeding fermented liquid feed and fermented grain on gastrointestinal ecology and growth performance in piglets. **Journal of Animal Science**, v. 85, p.2959-2971, 2007.

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

CASOLA, A. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXCL1 and CXCL2 chemokines. **Gastroenterology**, v.114, p.947-955, 1998.

CASTILLO, J.R. et al. Rotavirus infection alter Na⁺ and K⁺ homeostasis in MA104 cells. **Journal of General Virology**, v.72, p.541-547, 1991.

CERA, K.R.; D.C.; CROSS, R.F.; REINHART, G.A.; WHITMOYER, R.R. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal of animal Science**. v.66, n.1, p.574-584, 1988.

CHANG, E.B. et al. α 2-Adrenergic receptor regulation of ion transport in rabbit ileum. **American Journal Physiology**, v.242, p. G237-G242, 1982.

CHAUDHURI, R.R.; HENDERSON, I.R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.214-226, 2012.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; MEAD, G.C.; CHOPRA, I. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, n.32, p.87-108, 1991.

CHOI, C.; H.A.M, H.J.; KWON, D.; KIM, J.; CHEON, D.S.; MIN, K.; CHO, W.S.; CHUNG, H.K.; JUNG, K.; CHAE, C. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, n.1, p.71-73, 2002.

COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; SPRICIGO, D.A.; WITT, N.M.; MARCHIORO, S.B.; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

CRENSHAW, T.D., COOK, M.E., ODLE, J., *et al.* Effect of nutritional status, age at weaning and room temperature on growth and systemic immune response of weaning pigs. **Journal of Animal Science**, v. 63, n.6. p. 1845-1853, 1986.

CROMWELL, G. In: **Swine Nutrition**. By MILLER, E., ULREY, D.E., LEWIS, A.J. Butterworth-Heinemann. Boston, p. 297-314. 1991.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 450p.

CUSHNIE, T. P. & LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p.343-356, 2007. DOI: doi:10.1016/j.ijantimicag.3152005.09.002

DEBROY, C.; MADDIX, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of Veterinary significance. **Animal Health Research Reviews**, v.1, n.2, p.129-140, 2001.

DE GRAAF, F.K.; MOOI, F.R. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 28, p. 65-143, 1986.

DRASAR, B.S.; HILL, M.J. Human intestinal flora. London: Academic Press, Ltd, 1974, p.36-43.

DUBREUIL, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, p.137-145, 2008.

DUBREUIL, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and prostaglandin production. **Microbiology**, v.145, p.1507–1508, 1999.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v.24, n. 10, p.851-874. 2004.

EWING, W.N.; COLE, D.J.A. **The living gut**: an introduction to microorganisms in nutrition. Context Dungannon, 1994. 200p.

EXARCHOU, V. et al. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Cidade do Porto, Portugal, v.50, n.19, p.5294-5299, 2002.

FAIRBROTHER, J.M.; HIGGINS, R.; DESAUTELS, C. Trends in path types and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Quebec. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 2000, Melbourne. **Anais...**Melbourne: International Pig Veterinary Society, 2000. p.17. (Resumo).

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**, v.6, p.17-39, 2005.

- FLÓREZ, S.M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Ciudad Industrial Venecia, Madrid, Espanha, v. 6, p.271-278. 2002
- FORTE, L.R. et al. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. **American Journal Physiology**, v.263, p. 607- 615, 1992.
- FRANÇA, M.I. **Uso de formiato de sódio e potássio em rações para frangos**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná - Curitiba, PR.
- FREITAS, L.S.; LOPES, D.C.; FREITAS, A.F.; CARNEIRO, J.C.; CORASSA, A.; PENA, S.M.; COSTA, L.F. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1711-1719, 2006.
- GALLO, B. L.; VIOLA, E.; CONDE, O.R. DE A. Uso do composto de ácidos orgânicos: Profitol em dietas de leitões pré e pós desmame. **Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre,RS,p. 24-28.2003. Disponível em:
<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39404/000394202.pdf?sequence=1>>
Acesso em 10 jun. 2014.
- GALYOV, E.E. et al. Secreted effector protein of Salmonella dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. **Molecular Microbiology**, v.25, p.903-912, 1997.
- GANNON, V.; GYLES, C. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.89-100, 1990.
- GAUTHIER, R. Modo de ação dos acidificantes e interesse que geram na fase de crescimento e terminação. **Revista Pork World**, v.5, n.28, p.52-58, 2005.
- GLATTLEIDER, D. L. Pathologie digestive du porc en croissance et alimentation. **Recueil de Medecine Veterinaire**. v. 169, n.8/9, p.719-32. 1993.
- GIANNELLA, R.A. et al. Pathogenesis of Salmonella-mediated intestinal fluid secretion. Activation of adenylate cyclase and inhibition by indomethacin. **Gastroenterology**, v.69, n.6, p.1238-1245, 1975.
- GOMES, F.E.; FONTES, D.O.; SALIBA, E.O.S. Ácido fumárico e sua combinação com os ácidos butírico ou fórmico em dietas de leitões recém-desmamados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1270-1277, 2007.

GOLIN-BISELLO, F. et al. STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v.289, n.3, p.708-716, 2005.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M.J. Propiedades anti-inflamatórias de los flavonoides de la dieta. **Nutrición Hospitalaria**, Ciudad Industrial Venecia, Madrid, Espanha, v.22, n.3, p.287-293, 2002.

GRECCO, H.A.T. **Acidificantes em dietas de leitões desmamados**: desempenho, peso de órgãos, pH, morfometria e microbiota intestinal. Universidade estadual paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Câmpus de Botucatu. Dissertação de mestrado. 75p. 2014.

GRONDAHL, M.L. et al. Secretory pathways in *Salmonella* Typhimurium-induced fluid accumulation in the porcine small intestine. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, n.2, p.151-157, 1998.

GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.734-746, 1992.

GYLES, C.L.; BARNUM, D.A. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. **The Journal Infectious Diseases**, v.120, p.419-426, 1969.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. In: GYLES, C.L. et al. *Escherichia coli* In: Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3ed. Ames, Iowa State University Press, p.193-214, 2004.

GYLES, C.L. ***Escherichia coli* in domestic animals and human**. Wallingford: CAB International, 1994. 672p.

GUEDES, R. **Avanços na detecção de patógenos entéricos de leitões jovens**. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu, Brasil. Palestras... Foz do Iguaçu, p. 157-161. 2006.

GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L. da S., PUPPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. vol.33, n.3, p.667-679, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

HALAIHEL, N. et al. Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114–135) peptide on the Na(+)-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. **Journal Virology**, v.74, p.9464-9470, 2000b.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. Ed. Oxford; Clarendon Press, 1999. 543p.

HAMILTON, D.L. et al. The effect of cholera toxin and heat labile and heat stable *Escherichia coli* enterotoxin on cyclic AMP concentrations in small intestinal mucosa of pig and rabbit. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v.42, p.327-331, 1978.

HAMPSON, D. J. Postweaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **CAB International**: Oxon, p.171-91, 1994.

HARRELL, R.J.; ANDREWS, J.; ROBINSON, V.; VAZQUEZ-ANON, M.; CARTER, S. Syntetic antioxidant applications in nonruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, supl.2, p.384, 2008.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Londres, Inglaterra, v.55, n.6, p.481-504, 2000.

HENRY, P.; AMMERMAN, C.B.; CAMPBELL, D.R.; MILLES, R.D. Effect of antibiotics on tissue trace mineral concentration and intestinal tract weight of broiler chicks. **Poultry Science**, v.66, n.6, p.1014-1018, 1987.

HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS, W.D. et al. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: *Bacterological Analytical Manual*. Gaithersbrug: AOAC International, 1995. p.4.01-4.29.

HOLT, P.R.; YEH, K.Y. Effects of starvation and refeeding on jejunal dissacaridase activity. **Digestive Diseases and Science**, v.37, p.827-832, 1992.

HOMMA, M. et al. Inhibitory effects of lignans and flavonoids in saiboku-to, a herbal medicine for bronchial asthma, on the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes. **Planta Medica**, New York, E.U.A., v.66, n.1, p.88-91, 2000.

HUYGHEBAERT, G. **Replacent of antibiotics in poultry**. In: Eastern Nutrition CONFERENCE, 2003, Quebec CITY. Anais. Quebec City: UON, 2003, p.1-23.

HUR, J. & Lee, J.H. Development of a novel live vaccine delivering enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens to prevent post-weaning diarrhoea in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.146, p.283-288, 2012.

ISHIWA, J. et al. A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, Canadá, v.27, n.1, p.20-25, 2000.

IMBERECHTS, H.; DE GREVE, H.; LINTERMANS, P. The pathogenesis of edema disease in pigs: a review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.31, p.221-233, 1992.

JONES, S.L.; BLIKSLAGER, A.T. Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.222-228, 2002.

JOHNSON, J.R. et al. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v.185, p.774-784, 2002.

KAMEL, C. **A novel look a classic approach of plat extracts**. *Feed Mix*, v.9, n.6, p.19-24, 2000.

KAPER, J. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, England, v.295, n.6-7, p.123-140, 2004.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro818

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006. 991p.

KEELY, S.J.; BARRETT, K.E. Regulation of chloride secretion. Novel pathways and messengers. **Annual New York Academic Science**, v.915, p.67-76, 2000.

KIDDER, D.E.; MANNERS, M.J. **Digestibility**. In digestion in the pig. Bath UK: Kingeton Press, p.190, 1978.

KIL, Dong Yong K; KWON, Woong Bi. Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.24, p.231-247, 2011.

KIM, Y.Y.; KIL, D.Y.; OH, H.K.; HAN, I.K. Acidi® er as an alternative material to antibiotics in animal feed. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.18, p.1048-1060, 2005.

KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X. **Fumaric acid as a feed additive in pig nutrition**. *Pig News Information*, v.3, p.259-263, 1982.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SHINDLER, G.; GRAEFE, E.U.; VEIT, M. **Bioavailability and pharmokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans.** *Planta Medica*, Stuttgart, v. 66, n.6, p. 495-505, 2000.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, Washington, v.18, n.3, p.775-779, 1977.

KORDASTI, S. et al. Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhea. **Gut**, v.53, p.952-957, 2004.

KRABBE, E.L. Alternativas aos promotores de crescimento convencionais: potencial e viabilidade. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: AVES E SUÍNOS, **Anais...** Santa Maria, RS, p.61-69, 2001.

KRAUSE, D.O., HARRISON, P.C. and EASTER, R.A. **Characterization of the nutritional interactions between organic-acids and inorganic bases in the pig and chick.** *Journal of Animal Science*, v.72, p.1257-1262. 1994.

KRINSKY, N.I. et al. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**, Washington, E.U.A.: Ed. National Academy Press, 2000, p.95-185.

KRYGIEROWICZ, E.C. **Taxa linear de tamponamento como estimadora de efeitos nutricionais da acidificação da dieta para leitões.** 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná - Curitiba, PR.

KYRIAKIS, S.C.; TSILOYIANNIS, V.K.; SARRIS, K. *et al.* The effect of cid lac dry in the feedon the metaphylaxis of post-weaning diarrhea syndrome of piglets. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, 1996, Bologna. **Proceedings...** Bologna: Faculty of Veterinary Medicine/ University of Bologna, 1996. p.430.

LANFERDINI, E.; LOVATTO, P.A.; ANDRETTA, I. et al. **Ácido fumárico na alimentação de leitões em creche: uma meta-análise.** In: SEMINÁRIO: SISTEMAS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA. 3. 2009. Dois Vizinhos. **Anais...** Dois vizinhos: UTFPR, 2009. p.689-694.

LANGHOUT, P. New additives for broiler chickens. Alternatives to antibiotics. **Feed Mix Special**, p.24-27, 2000.

LORROT, M.; VASSEUR, M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? **Virology Journal**, v.4, n.31, p.1-6, 2007.

LAURIDSEN, C. Bioavailability of natural and synthetic vitamin E in sows and their progeny **Journal of animal Science**, Champain, v.86, supl.2, p.383, 2008.

LAURIDSEN, C. Evaluation of the effect of increasing dietary vitamin E in combination with different fat sources on performance, humoral immune responses and antioxidant status of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v.158, n.1, p.85-94, 2010.

LAZO, P.L. **Comportamiento Epidemiológico de la colibacilosis entérica porcina en la Provincia de Villa Clara, patotipos, genes de virulencia, y resistencia a antibióticos de los aislados de *E. coli***. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Dpto. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villa Clara, Cuba. (2007). Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060612B/PR16.pdf>> Acesso em 20 de dez. de 2014.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. - **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Editora Sarvier, 1990. 725p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4 ed. São Paulo, Ed. Sarvier, 2007. 1232p.

LINDEMAN, M.D. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in piglets. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1298-1307, 1986.

LUNDGREN, O. et al. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**, v.287, p.491-495, 2000.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2000 de CIÊNCIA e AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais**. Campinas: FACTA, v.2, p.161-174, 2000.

MACEDO, R.N. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1117-1123, 2007.

MANZANILLA, E.G., NOFRARÍAS, M., ANGUITA, M., CATILLO, M., PEREZ, J.F., MARTÍN-ORÚE, S.M., KAMEL, C., GASA, J. **Effects of butyrate, avilamycin, and plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs**. **Journal of Animal Science**, v.84, p. 2743-2751, 2006.

MANZANILLA, E.G.; PEREZ, J.F.; MARTIN, M.; KAMEL, C.; BAUCCELLS, F.; GASA, J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3210-3218, 2004.

MARIANO, S. **Antioxidante biomoleculares em nutrición animal-calidad de la carne con bioflavonoides**. In: II SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO, MERCADO E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS, Florianópolis, 2003. Anais... Florianópolis, 2003.

MARTINEAU, G.P.; VAILLANCOURT, J.P.; BROES, A. Principal neonatal diseases. In: VARLEY, M.A. **The neonatal pig - development and survival**. [S.I.]: Cab International, [s.n], p. 239-268, 1995.

MATINS, E.R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D.C. et al. **Plantas Mediciniais**. Viçosa, MG: UFV, 2000, 220p.

MAXWELL, F.J.; STEWART, C.S. **The microbiology of the gut and the role of probiotics**. In the Neonatal Pig: Development and Survival. Wallingford Oxon: CAB International, p.155-186, 1995.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, DAIANE D.E.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. **Ciencia Rural**. v.38, n.6, p.1686-1693.2008. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000600030>>.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, E.U.A., v.4, n.673-751, 2000.

MIGUEL, W.C. **Suplementação de acidificantes em rações de leitões desmamados: desempenho e digestibilidade**. 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo - Pirassununga, SP.

MOLLY, K. Formulation to solve the intestinal puzzle. **Pig Progress**, v.17, p.20-22, 2001.

MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A.; MOSELY, S.L. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolates from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.210-212, 1986.

MOON, H.W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.172, n.4, p.443-448, 1978.

MORÉS, N.; MARQUES, L.L.J.; SOBESTIANSKY, J.; OLIVEIRA, A.; COELHO, S.S.L. Influência do nível protéico e/ou da acidificação da dieta sobre a diarreia pós desmame em leitões causada por *Escherichia coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, n.3/4, p.85-88, 1990.

MORRIS, J.A.; SOJKA, W.J. *Escherichia coli* as a pathogen in animals. In: SUSSMAN, M. **The virulence of *Escherichia coli***. Oxford: Academic, p.47-77, 1985.

MORRIS, A.P. et al. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca²⁺ mediated I influx into intestinal crypts of CF mice. **American Journal Physiology**, v.277, p. 431-444, 1999.

MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. **Advances in Pork Production**, Dordrecht, v.16, p.169-182, 2005.

NABUURS, M.J. et al. Oedema disease is associated with metabolic acidosis and small intestinal acidosis. **Research Veterinary Science**, v.70, p.247-253, 2001.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v.30, p.259-284, 1999.

NAVARRO, M. ; GRANIZO, J. ; SEBASTIAN, M. **Publicación para veterinarios y técnicos del sector de animales de producción extractos vegetales como fuente de antioxidantes naturales en la alimentación animal**. Alb_itar - Foro empresas: Probená,S.L., Zaragoza, Espanha. v.116,p.64-65.2008.

NATARO, K.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.156, n.1, p.7-17, 2012.

NÉVOA, M.L.; JÚNIOR, J.G.C.; CORRÊA, G.S.S.; ARANTES, V.M.; KAMIMURA, R.; GONÇALVES F.C.; OLIVEIRA, M.S.F.; SANTOS, A.L.; NALON, R.P. **Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, n.2, p.447-454, 2013.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A.M. Flavanoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, **American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v.74, p.418-25, 2001.

OETTING, L.L. **Extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém-desmamados**. Tese (Doutorado). 66f. Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, 2005 Piracicaba, SP.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. **The Journal of Hygiene**, Cambridge, v.95, p.551-575, 1985.

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.K.; LEVINE, M. Vitamin C as an Antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n.1, p.18-35, 2003. DOI: 10.1080/07315724.2003.10719272.

PAPATSIROS, V.G.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; FILIPPOPOULOS, L.C. The use of organic acids in monogastric animal (swine and rabbits). **Journal of Cell and Animal Biology**, v.6, p. 154-159, 2012.

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

PARTANEN, K. H. Using organic acids in pig feeding as an alternative to antibiotics feed additives. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de aves e suínos e tecnologia na produção de rações, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, p.45-62, 2002.

PELZER, L.E. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids II, **Farmaco**, Società chimica italiana, Itália, v.53, n.6, p.421-424, 1998.

PENATTI, M.P.A.; SILVA, A.S.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S. Occurrence of F42 colonization factor in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.1, p.31-33, 2005.

PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. Barueri, SP: Manole, 2000. 600p.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Metabólitos Secundárieose beneficios antioxidants. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v.3, n.4, p.146-152, 2012.

PEREZ, J.F. et al. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. **Virology**, v.252, p.17-27, 1998. Disponível Em: <<http://dx.doi.org/10.1006/viro.1998.9433>>

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, Orlando, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

PETERSON, J.W.; WHIPP, S.C. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.63, p.1452-1461, 1995.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A.S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, Norwich, Inglaterra, v.17, n.11, p. 579-590, 2006.

PION, S. J.; VAN HEUGTEN, E.; SEE, M.T.; LARICK, D. K.; PARDUE, S. Effects of vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations and meat quality in swine. **Journal of Animal Science**, v. 82, p.2004-2012, 2004.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B., CARTER, G.R. *Enterobacteriaceae*. In: **Clinical veterinary microbiology**. [S.I.]: Wolf Publishina, [s.n]. p. 209-236, 1994.

RADECKI, S. V.; JUHL, M.R.; MILLER, E.R. Fumaric and citric acids feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. **Journal of animal Science**, v.66, p.2598-2605, 1988.

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

REYNOLDS, D.J. et al. Pathology of natural rotavirus infection in clinically normal calves. **Research Veterinary Science**, v.38, p.264-269, 1985.

RISLEY, C.R., KORNEGAY, E.T., LINDERMANN, M.D., WEAKLAND, S.M. Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weanling pigs. **Animal Feeding Science and Technology**, v.35, p.259-270, 1991.

ROCHA, E.V.H.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T. et al. Utilização de ácidos orgânicos e fitase em dietas para leitões na creche. **Arquivo Brasileiro de Medicina. Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.719-724, 2008.

RODRIGUES, H.G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, Campinas, SP, v.16, n.3, p.315-320, 2003.

RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Los ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos. In: XVI CURSO DE ESPECIALIZACIÓN FEDNA: Avances in **Nutrición y Alimentación Animal**, 16, 2000, Barcelona. Proceedings... Barcelona: 2000. p.155-167.

ROGERS, C.S. et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. **Science**, v.321, p.1837-1841, 2008.

ROSE, R. et al. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits and lambs. **Veterinary Pathology**, v.24, p.71-79, 1987.

ROSTAGNO, H.S. e Pupa, J.M. 1998. Fisiologia da digestão e alimentação de leitões. Simpósio sobre Nutrição e Manejo de Leitões. **Anais...** CBNA. Campinas, SP. 60-87.

RUMESSEN, J.J. Fructose and related food carbohydrates and proteins. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.27, p.819-828, 1992.

RYCKE, J.; OSWALD, E.; BOIVIN, R. An in vivo assay for the detection of cytotoxic strains of *Escherichia coli*. **Annales de Recherches Veterinaires**, Paris, v.20, n.39-40, 1989.

SAIF, L. et al. Comparative studies of the pathogenesis, antibody immune responses, and homologous protection to porcine and human rotaviruses in gnotobiotic piglets. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.412, p.397-403, 1997.

SANTOS, W.G.; FILGUEIRAS, E.P.; BERTECHINI, A.G. et al. Manose na alimentação de leitões na fase de creche (desempenho, pH de trato gastrointestinal e peso dos órgãos). **Ciência Agrotecnica**, v.27, n.3, p.696-702, 2003.

SANTOS, W.G.; FILGUEIRAS, E.P.; SILVA, H.O. **Efeito da manose como prebiótico sobre a morfologia intestinal (relação vilosidade/cripta) de leitões na fase de creche**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, Recife: Anais. SBZ, 202, CD-ROM.

SAVARINO, S.J. et al. Enteroggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.90, p.3093-3097, 1993.

SCHIERACK, P.; STEINRUCK, H.; KLETA, S. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 72, n. 10, p. 6680-6686, 2006.

SCHÖNER, F.J. Nutritional effects of organic acids. In: BRUFAU, J. (Ed). **Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food**. Conference of Feed. Manufacturers of the Mediterranean, Zaragoza: CIHEAM, n.54, p.55-61. 2001.

SEAB. Secretária de Estado Agricultura e do Abastecimento. **Análise da Conjuntura Agropecuária**. Fevereiro de 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf>

SEBASTIÁN, M. Antioxidantes biomoleculares en nutrición animal-calidad de la carne con bioflavonoides. In: **SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO, MERCADO E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS**, 2, 2003, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis, SC: [s.n.], 2003, p.5-9.

SILVA, G.F. **Digestibilidade ileal de aminoácidos de soja micronizada e de farelo de soja para suínos e avaliação de acidificantes em dietas para leitões**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa.

SILVA JR., A. Interações químico-fisiológicas entre acidificantes, probióticos, enzimas e fosfolípidios na digestão de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p. 238-245, 2009.

SINDIRAÇÕES. **Guia de aditivos**. São Paulo. 2005, 44p.

SMINK, W. Oregano oil boost. **Pig Progress**, v.19, p.24-26, 2003.

SMITH, H.W and JONES, J.E.T. Observations on the alimentary tract and its bacterial in healthy and diseased pigs. **Journal Pathology and Bacteriology**, v.86, p.387-412, 1963.

SMITH, H.W.; GREEN, P.; PARSELL, Z. Vero cell toxins in *Escherichia coli*, and related bacteria: transfer by phage and conjugation, and toxic action in laboratory animals, chickens, and pigs. **Journal General Microbiology**, v.129, p.3121-3137, 1983.

SMITH, H.W.; GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v.3, n.387-401, 1970.

SMITH, H.W.; HALLS, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.93, p.499-529, 1967.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.S.N. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. 770p.

SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S.; KONOWALCHUK, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.16, n.2, p.617-622, 1977.

SPILLER, R.C. Role of nerves in enteric infection. **Gut**, v.51, p.759-762, 2002. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/cgi/reprint/51/6/759>>. Acesso em: 28 jan.. 2015.

STADTMAN, E. R. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, E.U.A., v.54, n.6, p.1125-1128, 1991.

STOREY, K.B. Oxidative stress; animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v.29, n.12, p.1715-1733, 1996.

STROHL, W.A.; ROSE, H. & FISHER, B.D. Bacilos entéricos Gram-negativos in: **Microbiologia Ilustrada**. 1 ed. Porto Alegre: Art Méd, 2004, p.189-204.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* in human and animal disease. The virulence of *Escherichia coli*. Oxford: Academic, [s.n], p.7-45. 1985

TEIXEIRA, M.P.; SILVA, G.F.; LOPES, D.C.; CORASSA, A.; 372 TEIXEIRA, A.O.; BUNZEN, S.; PENA, S.M.; GATAS, G.; COSTA, L.F. Avaliação de ácidos orgânicos e inorgânicos em dietas para leitões desmamados as 21 dias de idade. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Santa Maria, RS. 2003. CD ROM.

THEROND, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, Paris, França, v.3, n.5, p.373-384, 2000.

TIEN, X.Y. et al. Activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by cGMP in the human colonic cancer cell line, Caco-2. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.51-54, 1994.

TRABULSI, R.L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 780p. 2005.

TSILOYIANNIS, V.K.; KYRIAKIS, S.C.; VLEMMAS, J. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.287-293, 2001.

TSILOYIANNIS, V.K.; KYRIAKIS, S.C. et al. (2001a). The effect of organic acids on the control of porcine post-wedding diarrhea. **Research in Veterinary Science**. v.70, n.3, p.287-293, 2001.

TSILOYIANNIS, V.K.; KYRIAKIS, S.C. et al. (2001b). The effect of organic acids on the control of post-weaning edema disease of piglets. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.281-285, 2001.

TURRENS, J.F.; FREEMAN, B.A.; LEVITT, J.G.; CRAPO, J.D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. **Archives of biochemistry and Biophysies**. New York, v.217, n.2, p. 401-410, 1982.

VAN DEN BROEK, G.: Alternatives to antibiotics. **Feed Mix Special**, 2000.

VANUCCI, F.A.; GUEDES, R.M.C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p. 2233-2242, 2009.

WADDELL, T.E. et al. Localization of potential binding sites for the edema disease verotoxin (VT2e) in pigs. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.62, p.81-86, 1998.

WADDELL, T.E.; GYLES, C.L. Sodium deoxycholate facilitates systemic absorption of verotoxin 2e from pig intestine. **Infection and Immunity**, v.63, p.4953-4956, 1995.

WEBER, G.M.; ANTIPATIS, C. Qualidade da carne suína e dieta de vitamina E. In: **Anais CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA**, Concórdia, SC, Anais... Concórdia, SC: [s.n.], 2001.

WEISS, W.P. MAHAN, D.C. Oxidative stress during the lifecycle of animals. **Journal of Animal Science**. Champaign, v.86, supl.2, p.383, 2008.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN M.E.; AUST, S.D. Deleterious ironmediated oxidation of biomoleculares. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, v.32, n.7, p.577-583, 2002.

WILSON, M. R . Enteric Colibacillosis. Leman, A. D. et al. Diseases of swine. In: Leman,A.D. et al. **Diseases of Swine**. 5. ed. State University Press. Iowa. 1981. p. 477.

WIMER-MACKIN, S. et al. Characterization of receptormediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa heatlabile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. **Infection and Immunity**, v.69, p.7205-7212, 2001.

VELLENGA, L. et al. Intestinal permeability in pigs during rotavirus infection. **American Journal Veterinary Research**, v.53, p.1180-1183, 1992.

WELSH, M.J. et al. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. **Science**, v.218, p.1219, 1982.

WHIPP, S.C. Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. **American Journal of Veterinary**, v.52, n.5, p.734-737, 1991.

VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.1097-1104, 2007.

WRIGHT, E.M. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. **Annual Review Physiology**, v.55, p.575-589, 1993.

WRIGHT, E.M.; LOO, D.D.F. Coupling between Na⁺, sugar and water. Transport across the intestine. **Annual New York Academic Science**, v.915, p.54-66, 2000.

ZACHOS, N.C. et al. Molecular physiology of Na⁺/K⁺ exchange. **Annual Review Physiology**, v.67, p.411-443, 2005.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.145-152, 2007.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIR, D.; BARCELLOS, D.E.S.N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.81-86, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Instalações Setor de Zootecnia UFSM



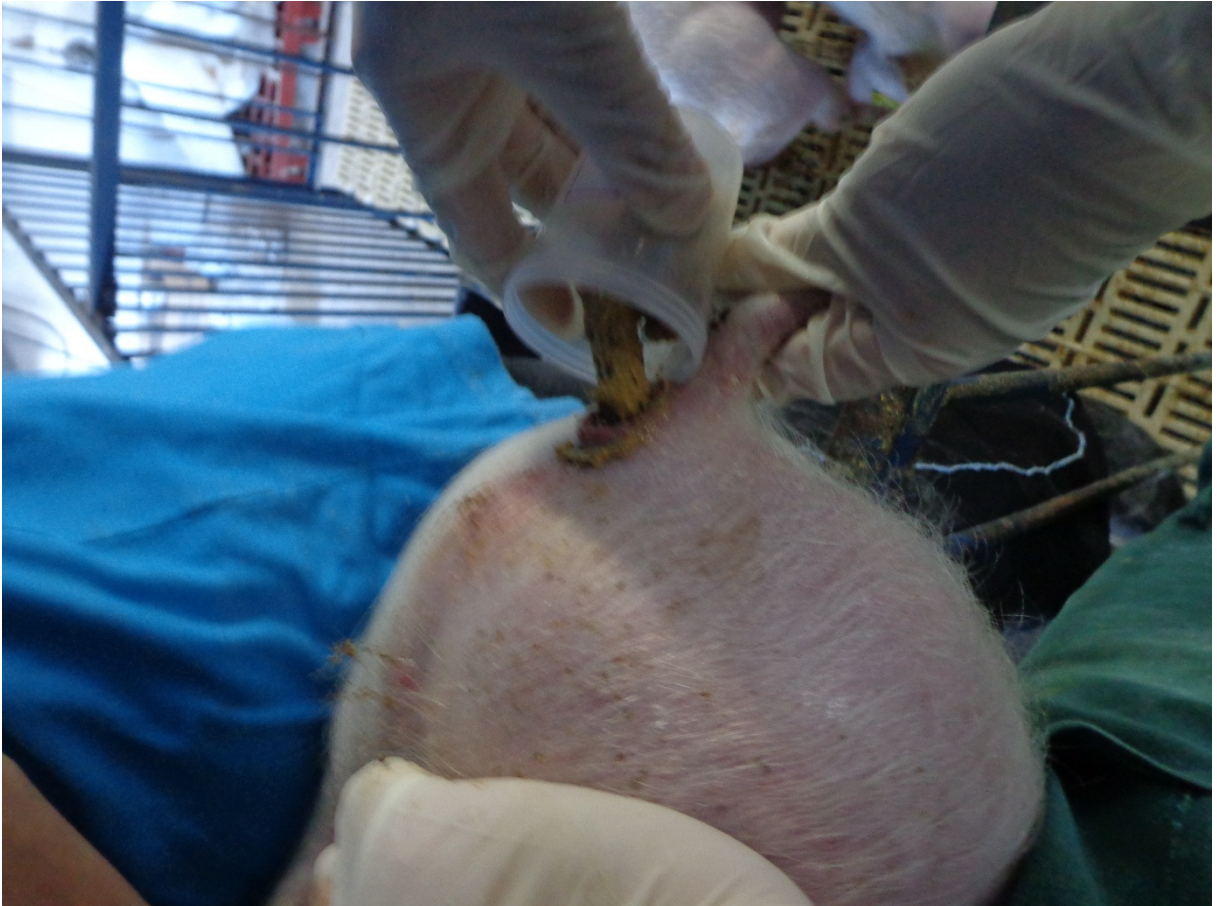
APÊNDICE B - Instalações do Setor de Zootecnia UFSM. Ambiente climatizado

APÊNDICE C- Comedouro

APÊNDICE D - Coleta de sangue para avaliação bioquímica



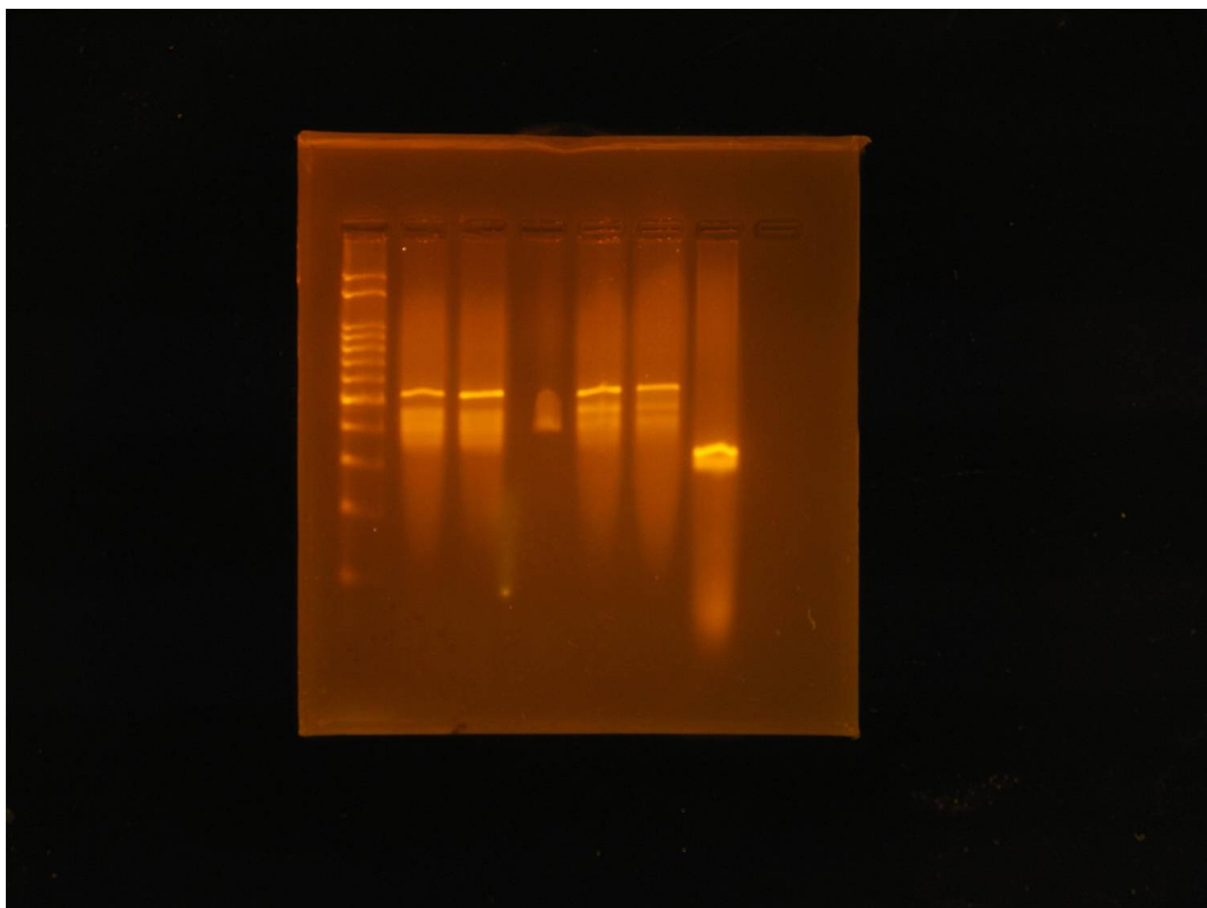
APÊNDICE E - Coleta de fezes para avaliação microbiológica e posterior PCR

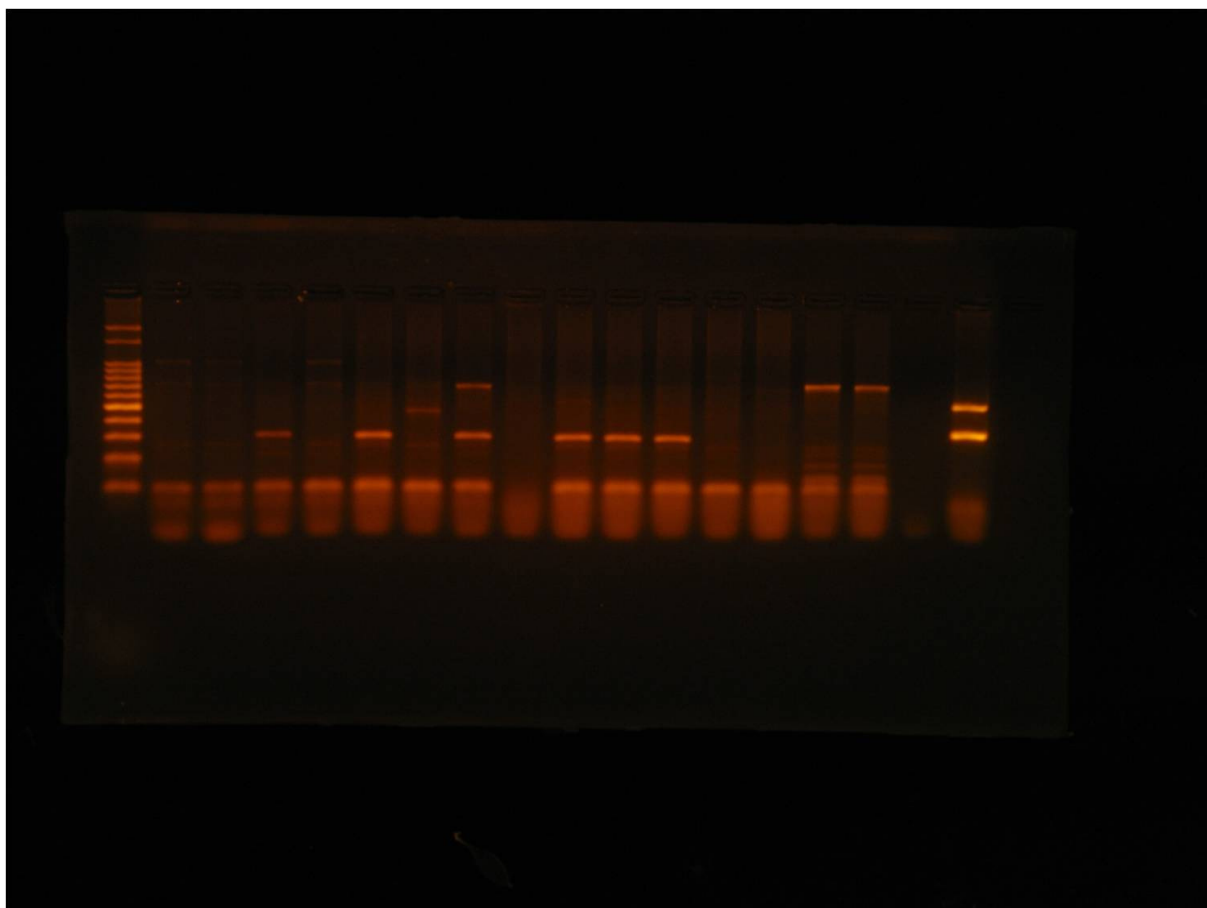


APÊNDICE F - Frasco para coleta de fezes com identificação da baia, tratamento, identificação do animal e sexo

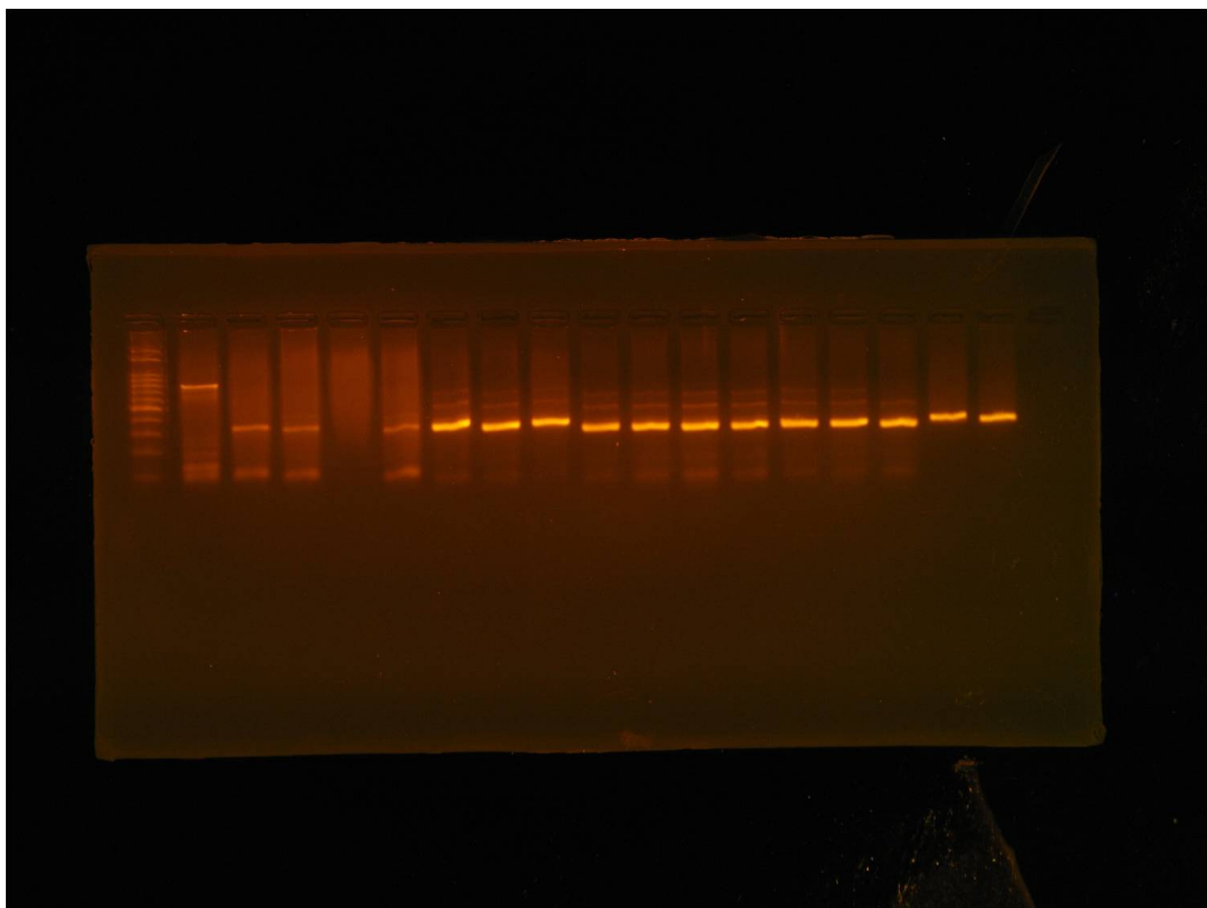


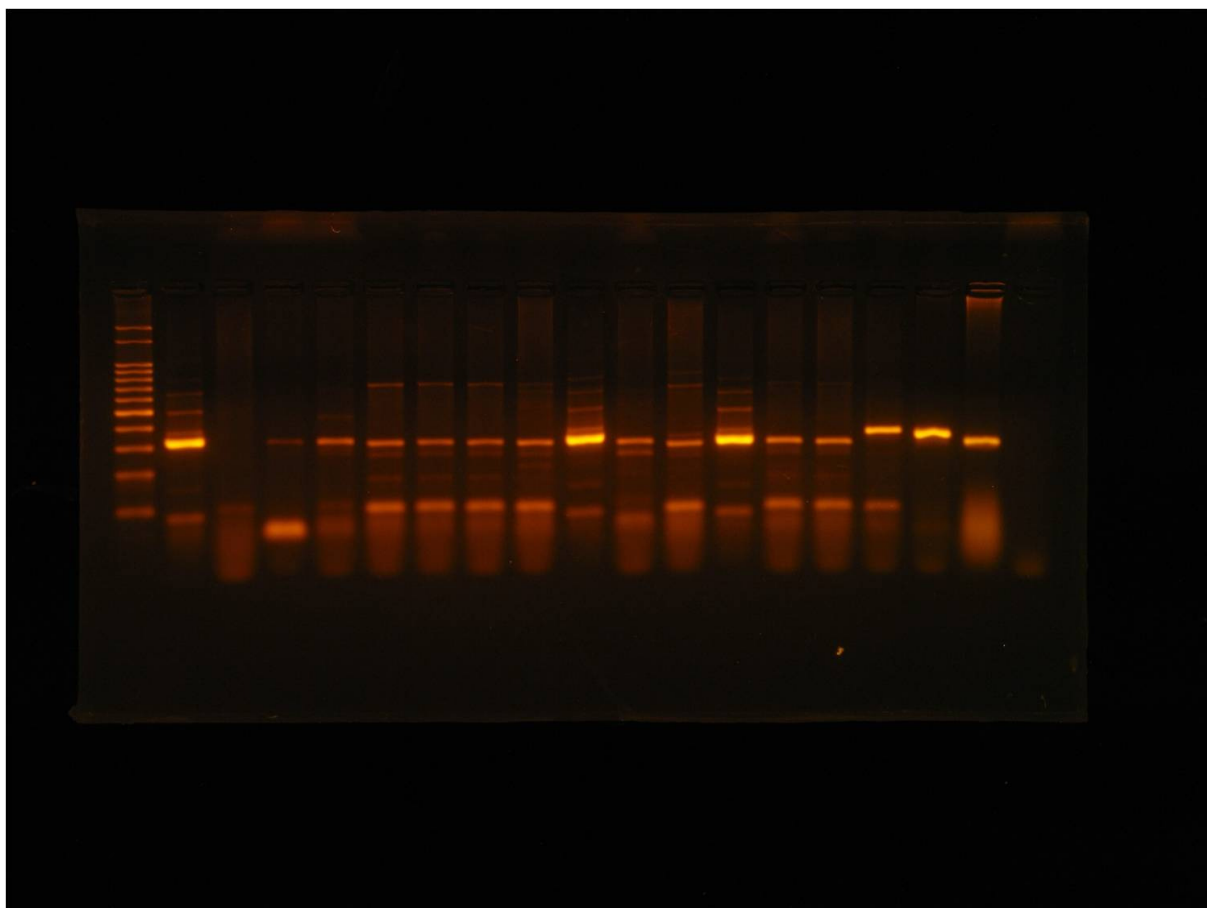
APÊNDICE G - Gel para identificação das fímbrias da amostra 01 a 04



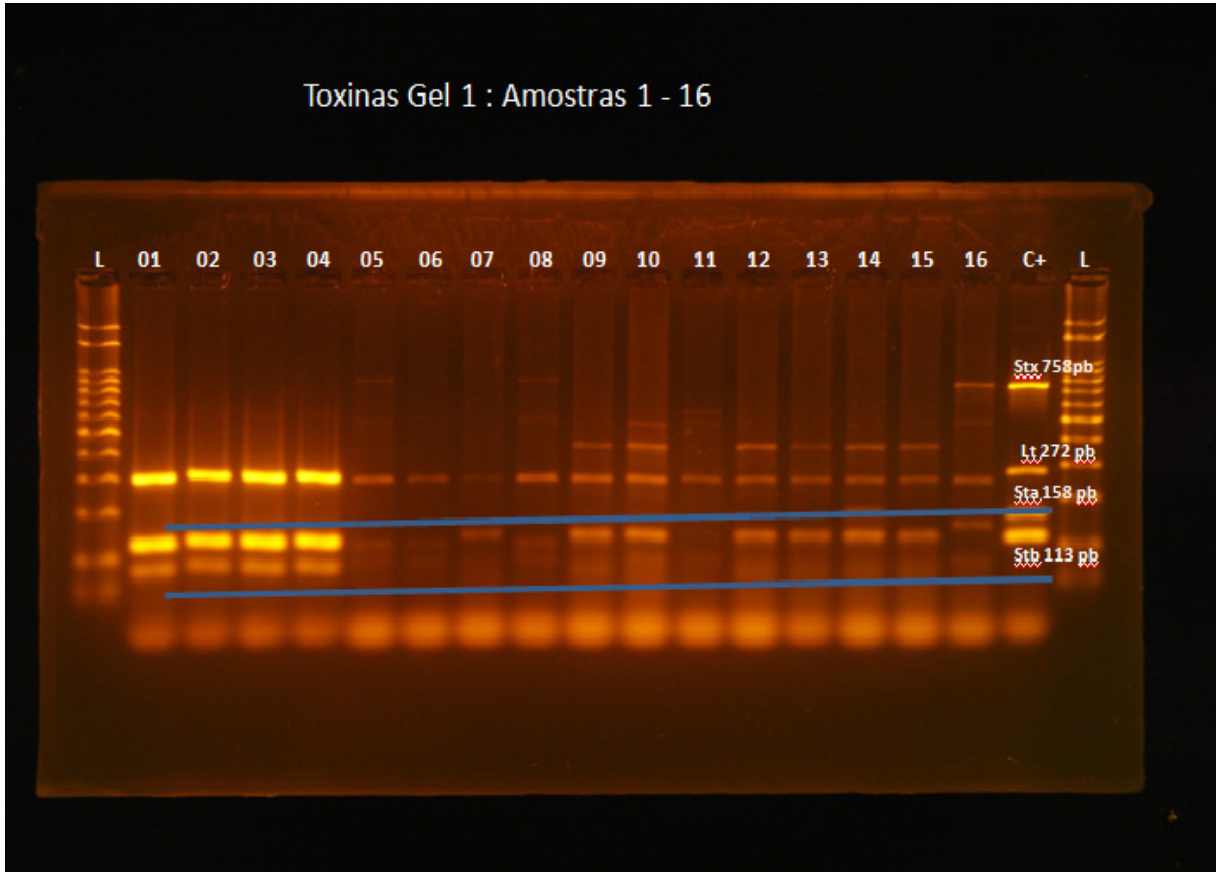
APÊNDICE H - Gel com identificação de fímbrias para amostras de 5 a 19

APÊNDICE I - Gel com identificação de fímbrias para amostras de 20 a 34

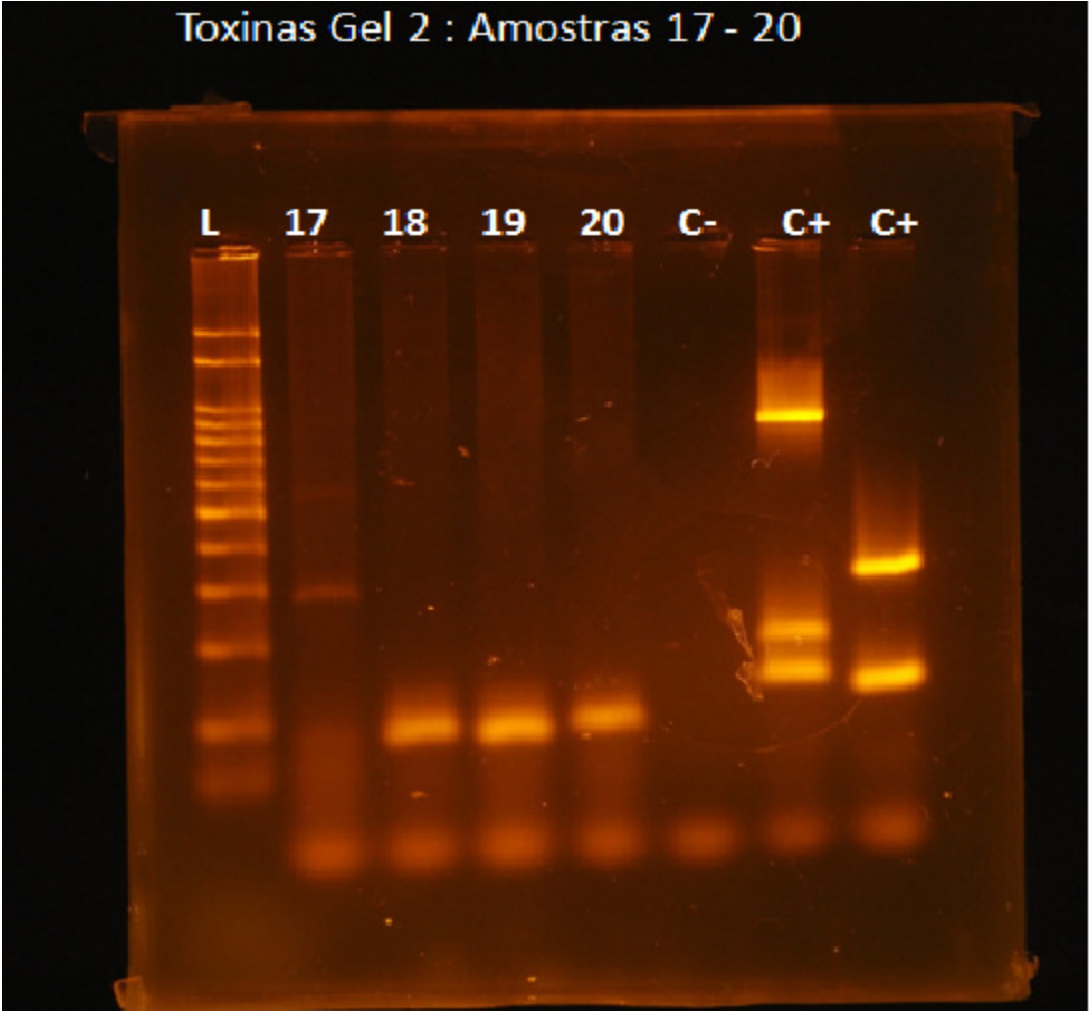


APÊNDICE J - Gel com identificação de fímbrias para amostras de 35 a 49

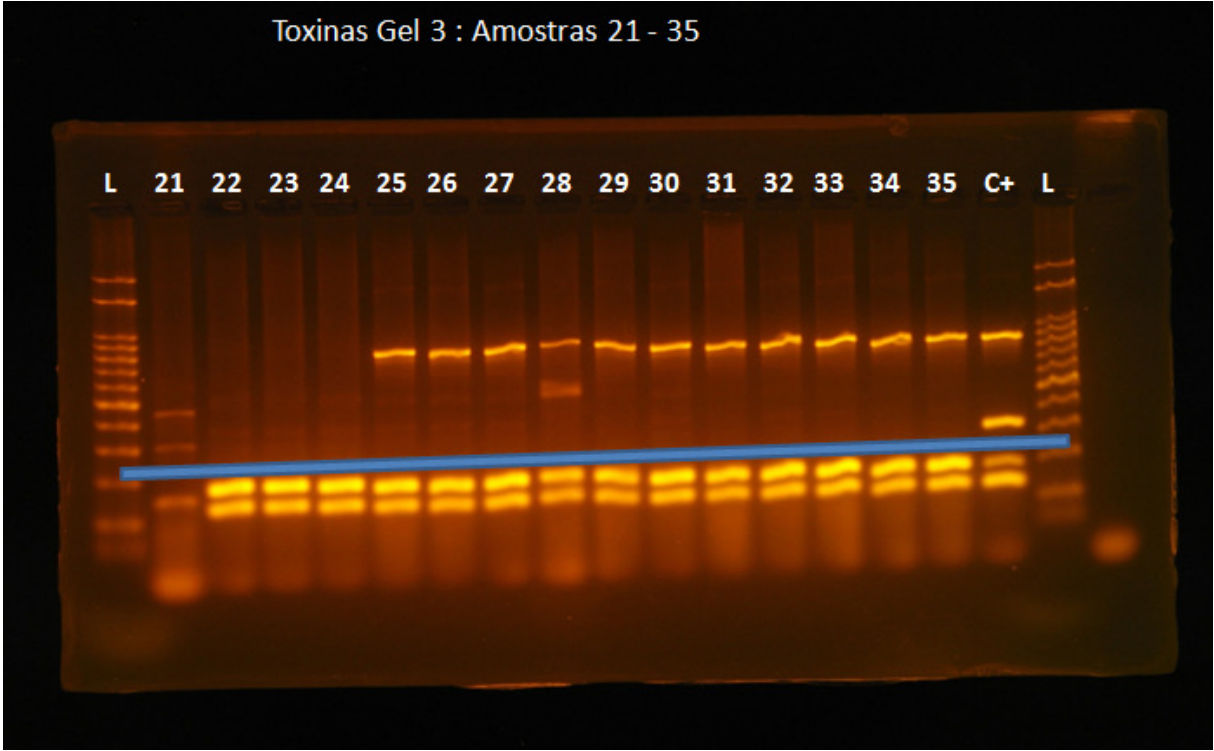
APÊNDICE K: Gel com identificação de toxinas para amostras de 1 a 16



APÊNDICE L - Gel com identificação de toxinas para amostras de 17 a 20



APÊNDICE M - Gel com identificação de toxinas para amostras de 21 a 35



APÊNDICE N - Gel com identificação de toxinas para amostras de 21 a 35

