

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CAMILA DEMARCO MAITO

Efeito do butirato de cálcio associado ao extrato de tanino (*Castanea sativa*) ou extrato de papaia (*Carica papaya*) na saúde intestinal, desempenho e qualidade de carne de leitões na fase de creche

Effect of calcium butyrate associated with tannin (*Castanea sativa*) or papaya (*Carica papaya*) extracts on intestinal health, performance and meat quality of nursery pigs

CURITIBA

2017

CAMILA DEMARCO MAITO

Efeito do butirato de cálcio associado ao extrato de tanino (*Castanea sativa*) ou extrato de papaia (*Carica papaya*) na saúde intestinal, desempenho e qualidade de carne de leitões na fase de creche

Effect of calcium butyrate associated with tannin (*Castanea sativa*) or papaya (*Carica papaya*) extracts on intestinal health, performance and meat quality of nursery pigs

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Batista Costa

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	x
RESUMO GERAL.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
CAPÍTULO 1	
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1. Produção de suínos.....	15
2. Desmame.....	16
3. Saúde intestinal.....	17
3.1 Morfologia.....	17
3.2 Processo Inflamatório.....	18
3.2.1 Cicloxigenase 2 – COX 2.....	19
3.2.2 Fator de Necrose Tumoral α – TNF α	20
4. Uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho.....	21
4.1 Banimento do uso de antimicrobianos como aditivo alimentar.....	22
4.2 Alternativas ao uso de antimicrobianos sintéticos.....	22
5. Aditivos Fitogênicos.....	23
5.1 Extrato de Tanino.....	24
5.2 Extrato de Papaia.....	24
6. Ácidos Orgânicos.....	25
6.1 Butirato de Cálcio.....	25
7. Objetivos.....	27
7.1 Objetivo Geral.....	27
7.2 Objetivos específicos.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO 2	
Effect of the association of calcium butyrate with the tannin extract (<i>Castanea sativa</i>) or papaya extract (<i>Carica papaya</i>) on performance, intestinal health and meat quality of piglets in the	

nursery phase.....	40
ABSTRACT.....	40
INTRODUCTION.....	41
MATERIAL AND METHODS.....	43
Animals, housing, experimental diets and management.....	43
Performance, incidence of diarrhea and slaughter of the animals.....	45
Intestinal morphology.....	46
Structural analysis - optical microscopy.....	46
Ultrastructural analysis - scanning electron microscopy (SEM).....	47
Immunohistochemistry.....	47
Lipid oxidation, pH and color analysis in the ham.....	48
Statistical analysis.....	49
RESULTS.....	50
Performance and incidence of diarrhea.....	50
Intestinal morphology	52
Immunohistochemistry.....	52
Lipid oxidation, pH and color analysis in the ham.....	54
DISCUSSION.....	54
Performance	54
Incidence of diarrhea.....	56
Intestinal morphology.....	58
Immunohistochemistry.....	59
Lipid oxidation, pH and color analysis in the ham.....	61
CONCLUSION.....	62
REFERENCES.....	63
CAPÍTULO 3	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
ANEXO A.....	76
ANEXO B.....	77
ANEXO C.....	78
ANEXO D.....	79
ANEXO E.....	80

Aos meus amados pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela oportunidade, por guiar meus passos, por ser meu alento nas horas difíceis e pelo seu dom de “escrever certo por linhas tortas”.

Meu especial agradecimento aos meus pais, Norvan e Rosimar, por todos os momentos de apoio, incentivo, carinho, paciência, amor e motivação, e por tornarem possível a realização do meu sonho. Obrigada por sempre me ampararem e encorajarem. Vocês são meus exemplos, minha base, minha razão, meu alicerce, minha força, o significado de amor e os tesouros mais preciosos da minha vida.

Aos meus familiares (tios, tias, primos, primas e avós) por acreditarem em mim, me incentivarem e por estarem sempre torcendo e rezando pelo meu sucesso. Um obrigado especial à minha madrinha Tati, que mesmo longe sempre esteve presente me encorajando, me aconselhando e que pacientemente me escutou nos momentos de desabafos. Ao meu vô Archiles, que sempre demonstrou interesse pelo meu trabalho com os “porquinhos” e que me ensinou que “porco não tem cheiro ruim, tem cheiro de dinheiro!”

Aos meus amigos, pelas palavras de apoio, por me fazerem rir das minhas “façanhas” (mesmo quando eu queria na verdade chorar), pela paciência de me escutarem mil vezes falando sobre meus “porquinhos” e por compreenderem meus muitos momentos de ausência, e que mesmo assim não me esqueceram.

Gostaria ainda de agradecer a Impextraco Latin America pelo financiamento de toda pesquisa, e em especial ao Augusto e a Luciana que representaram a empresa e acompanharam todas as etapas de desenvolvimento do projeto.

À Capes pela taxa de isenção e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (PPGCA), pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos e por todos os aprendizados que não ficam apenas no âmbito acadêmico.

Aos professores do programa, que me acompanharam durante toda trajetória. Agradecimento especial à professora Kelly Mazutti por todo apoio e

ajuda com os animais, a professora Renata Ernlund Freitas de Macedo e ao professor Jair Rodini Engracia Filho que me auxiliaram na execução das análises e interpretação dos resultados e ao professor Saulo Henrique Weber, pelas diversas reuniões para análises estatísticas.

Ainda pertencente ao PPGCA eu gostaria de agradecer a pós-doutoranda Tâmara, pelo apoio, incentivo e ajuda na hora de organizar as ideias que “caiam de bungee jump” no papel e por me ajudar a desenvolver segurança para apresentação.

À secretária do curso Caroline Nocera Bertton por toda ajuda durante o período do mestrado, pelo apoio e preocupação.

Aos colegas de mestrado, Diego Brandão, Geovane Oliveira, Maria Christine Cintra e Angela Oliveira pelo apoio, pela ajuda, pela amizade e pelos valiosos momentos de descontração.

Um especial agradecimento ao meu orientador, Professor Dr. Leandro Batista Costa, pela oportunidade, por todos ensinamentos, pelo apoio, ajuda e pela infinita paciência.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os alunos, professores e funcionários (da fazenda e dos laboratórios) que auxiliaram e acompanharam cada etapa do meu trabalho.

“Pouco conhecimento faz com que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias a baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE

A presente dissertação é composta por capítulos, sendo que o capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, a justificativa e os objetivos do presente estudo; o capítulo 2 é composto pelo artigo científico completo, intitulado: **“Effect of the association of calcium butyrate with the tannin extract (*Castanea sativa*) or papaya extract (*Carica papaya*) on performance, intestinal health and meat quality of piglets in the nursery phase”**, contendo referências e formatado conforme normas da revista Research in Veterinary Science, para a qual será submetido; e o capítulo 3 aborda as considerações gerais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

RESUMO

O desmame precoce dos suínos promove diminuição da altura das vilosidades, aumento da profundidade de criptas com insuficiente ativação de enzimas digestivas, acarretando em digestão inadequada, redução da capacidade absorptiva, diarreia e, conseqüentemente, queda do desempenho zootécnico. Uma das alternativas para minimizar este problema é a inclusão de doses subterapêuticas de antimicrobianos na ração destes animais. No entanto, o mercado vem restringindo o uso de antimicrobianos sintéticos como melhoradores de desempenho. Diante disso, objetiva-se verificar o efeito do butirato de cálcio associado ao extrato de tanino (*Castanea sativa*) ou papaia (*Carica papaya*) sobre o desempenho zootécnico, incidência de diarreia, histologia intestinal, imunoexpressão de citocinas pró-inflamatórias ciclooxigenase 2 (COX 2) e fator de necrose tumoral α (TNF α) e qualidade de carne de leitões em fase de creche.. Foram utilizados 96 leitões na fase de creche, sendo 48 machos castrados e 48 fêmeas, com idade média de 28 ± 2 dias e peso médio inicial de $7,17 \pm 1,07$ kg, distribuídos em 4 tratamentos com 8 repetições cada. Os tratamentos foram: CN - controle negativo – ração basal sem a adição de aditivos melhoradores de desempenho; CP – controle positivo – ração basal + 40 mg/kg de sulfato de colistina; BP - ração basal + butirato de cálcio + extrato de papaia; BT- ração basal + butirato de cálcio + extrato de tanino, sendo o nível de inclusão dos aditivos (%) na fase pré inicial foi 0,15% e na fase inicial foi 0,075%. O período experimental durou 35 dias no qual foram utilizadas duas dietas experimentais: dieta pré-inicial fornecida do 1º ao 14º dia e a dieta inicial fornecida do 15º ao 35º dia de experimentação. Os animais e a ração fornecida foram pesados semanalmente, a incidência de diarreia foi verificada diariamente e aos 14 e 35 dias de experimento um animal de cada unidade experimental foi abatido para coleta de duodeno e jejuno, sendo que aos 35 dias também foram coletadas amostras de pernil. Os dados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA e teste de Tukey, apenas a incidência de diarreia foi analisada pelo teste do qui-quadrado e foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas para o desempenho zootécnico e a histologia intestinal. O tratamento BT proporcionou a menor incidência de diarreia, menor

imunoexpressão de COX 2 aos 14 dias e de TNF α aos 35 dias no duodeno e diminuição no índice de luminosidade da carne ($P < 0.05$). Sendo assim, o butirato de cálcio associado ao extrato de tanino mostrou ser uma possível alternativa para reduzir a incidência de diarreia e diminuir a imunoexpressão de citocinas pró-inflamatórias no duodeno de leitões na fase de creche.

Palavras chave: aditivos naturais, alternativa aos antimicrobianos, morfologia intestinal, nutrição animal, suínos.

ABSTRACT

Early weaning of pigs promotes a decrease in the intestinal villi height, increase crypts depth, insufficient activation of digestive enzymes, resulting in inadequate digestion, reduced absorptive capacity, diarrhea and, consequently, decreased zootechnical performance. One alternative to minimize this problem is the inclusion of subtherapeutic doses of antimicrobial in the feed of these animals. However, the global market restricts the use of synthetic antimicrobials to improve pig's performance. The objective of this work was therefore to verify the association of calcium butyrate with the extract of tannin (*Castanea Sativa*) or papaya (*Carica papaya*), on the performance, incidence of diarrhea, intestinal histology, immunoexpression of the pro-inflammatory cytokines cyclooxygenase-2 (COX 2) and tumor necrosis factor α (TNF α) and meat quality of piglets in the nursery phase. A total of 96 piglets were used, 48 males and 48 females, mean age of 28 ± 2 days, with an initial mean weight of 7.17 ± 1.07 Kg in a randomized complete block design with 4 treatments and 8 replicates. The treatments were: NC - negative control - basal diet without the addition of performance additives; PC - positive control - basal diet + 40 mg/ kg colistin sulfate; BP - basal diet + calcium butyrate + papaya extract; BT - basal diet + calcium butyrate + tannin extract. The inclusion level of butyrate + extracts in the pre-initial phase was 0.15%; and in the initial phase was 0.075%. The experimental period lasted 35 days and two experimental feeds were used: pre-initial feed provided from the 1st to the 14th day and the initial feed provided from the 15th to 35th day of experiment. The animals and feed provided were weighted weekly and the incidence of diarrhea was checked daily and at 14 and

35 days of experiment, one animal from each experimental unit was slaughtered to sample duodenum and jejunum tissue. On the 35th day ham samples were collected. The data obtained was submitted to ANOVA and the Tukey test, and only the incidence of diarrhea was analyzed by the chi-square test, with a significance level 5% ($P < 0.05$). No significant differences were observed for performance and intestinal histology. The BT treatment provided a lower incidence of diarrhea, lower immunoexpression of COX-2 at 14 days and the TNF α at 35 days in the duodenum, and decrease in the brightness index of the ham ($P < 0.05$). Therefore, calcium butyrate the associated with the tannin extract is a possible alternative to decrease the incidence of diarrhea and lower immunoexpression of pro inflammatory cytokines in the duodenum of nursery piglets.

Key words: natural additives, alternatives to antimicrobials, intestinal morphology animal nutrition, swine.

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1. Percent composition and calculated values of the base diets.....	45
Table 2. Averages of the initial body weight (P1), body weight at 14 days (P14), body weight at 35 days (P35), daily weight gain (DWG), daily feed intake (DFI), feed conversion (FC) and incidence of diarrhea (ID) for the 1 to 14 and 1 to 35 day experimental periods.....	51
Table 3. Percentage of the stained area in μm^2 for COX-2 and mean count of stained cells for $\text{TNF}\alpha$ in the analysis of immunohistochemistry in the duodenum and jejunum of piglets at 14 days and 35 days of experimentation.....	53
Table 4. Evaluation of the ham quality via analysis of lipid oxidation (TBARS), pH and color.....	54

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. Produção de suínos

O Brasil em 2016 abateu 42,32 milhões de cabeças de suínos (IBGE, 2017), mantendo a posição de quarto maior produtor mundial de carne suína, totalizando uma produção de 3.731 mil toneladas, ficando atrás apenas da China, da União Europeia e dos Estados Unidos, respectivamente (ABPA, 2017).

Quanto às exportações, em 2016, o Brasil ocupou o mesmo ranking da produção mundial, totalizando uma exportação de 732,9 mil toneladas de carne suína. Neste mesmo ano, a região sul abateu 66,1% dos suínos, sendo que o Paraná foi responsável pelo abate de 22,29%, ficando apenas atrás de Santa Catarina, que abateu 26,35% dos animais (ABPA, 2017; IBGE, 2017).

Os principais produtos exportados foram: cortes (83,42%), miúdos (10,10%) e carcaças (2,36%). É interessante ressaltar que os estados da região sul do país, além de serem os principais produtores de carne suína brasileira, também são responsáveis pelo maior volume de exportação, correspondendo a 81,30% das exportações (ABPA, 2017).

Em relação à receita gerada, a exportação em 2016 resultou em um saldo de US\$ 1,483 bilhão, 16% a mais que em relação ao faturamento quando comparado ao ano de 2015. A exportação brasileira de carne suína em 2016 apresentou um aumento de 33,0% em termos de volume quando comparado ao ano anterior (ABPA, 2017; IBGE, 2017).

O ano de 2015 foi marcado pelo maior consumo *per capita* de carne suína dos últimos nove anos, totalizando um consumo *per capita* de 15,1 Kg no Brasil, porém no ano de 2016 o consumo de carne suína foi de 14,4 Kg de carne por habitante por ano (ABPA, 2017).

Ainda em 2016, o Brasil alojou um total de 2.067.704 matrizes industriais (ABPA, 2017). Cada matriz produziu em média 12,66 leitões nascidos vivos por parto, sendo desmamados 27,14 leitões por porca por ano e 25,40 suínos terminados por porca por ano (AGRINESS, 2016). Para que os suínos cheguem à fase de terminação, estes deverão passar por várias etapas: primeiramente os leitões ficam na maternidade junto com as matrizes até os 21

à 28 dias de idade, momento em que ocorrerá o desmame. Os leitões recém-desmamados são então transferidos para a creche, caracterizando o período mais crítico de toda a produção da suinocultura, devido a todos os fatores de estresse e desafios ao qual os leitões são expostos, com duração média de 42 dias. Logo após a fase de creche os animais são realojados em baias de crescimento, onde permanecem até atingirem 110 dias de idade, permanecendo na mesma instalação ou sendo novamente realojados para a fase final, caracterizada como terminação. Nesta, permanecerão até 150 dias em média onde seguirão para o abate (FERREIRA, 2012). A presente dissertação terá como foco de revisão o desmame e pós-desmame por se tratar de tema emergente e com graves consequências dentro da suinocultura. Além disso, o experimento desenvolvido, cujo artigo resultante está no capítulo 2 desta dissertação, foi realizado com leitões na fase de creche.

2. Desmame

Dentro do sistema de produção de suínos, o período pós desmame é denominado de creche, que abrange leitões com média de 21 a 63 dias de vida em média (KUMMER et al., 2009). Neste período os suínos são submetidos a diversos fatores estressantes como, por exemplo, a mudança de alimentação, a separação da mãe e da leitegada, a mudança de ambiente, a exposição a novos agentes patogênicos, tensão social devido ao reagrupamento, instalações com deficiência de controle ambiental e dificuldade de adaptação com comedouros e bebedouros (PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS, 1997; HEO et al., 2013; LEE et al., 2016).

Considera-se o período entre 7 e 14 dias após o desmame como crítico, pois são observados menor consumo de ração e menor ganho de peso (KUMMER et al., 2009; VONDRUSKOVA et al., 2010). Como consequência disso, ocorrem diminuição na altura das vilosidades intestinais e aumento da profundidade das criptas, bem como insuficiente produção de ácido clorídrico e insuficiente produção e ativação de enzimas digestivas, acarretando em baixa capacidade de digestão e redução da capacidade absorviva do intestino (PLUSKE, WILLIAMS e AHERNE, 1996; PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS,

1997). Esses fatores, em conjunto, ocasionam a “síndrome da diarreia pós desmame” (SDPD) (KUMMER et al., 2009; VONDRUSKOVA et al., 2010).

Dentre os principais agentes causadores da diarreia, destaca-se a bactéria *Escherichia coli*, patógeno também presente na chamada “doença do edema” (KUMMER et al., 2009) que, assim como a SDPD, gera diarreia, afetando diretamente o desempenho zootécnico destes animais e, conseqüentemente, acarretando em expressivas perdas econômicas para o produtor (PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS, 1997; VONDRUSKOVA et al., 2010). Todos os eventos citados acima interferem diretamente na saúde intestinal dos leitões recém-desmamados, com efeitos negativos no crescimento dos animais.

3. Saúde intestinal

3.1 Morfologia

O intestino, além de atuar na digestão, absorção dos nutrientes, também desempenha importante papel no sistema imunológico dos animais por possuir cerca de 70% das células imunes do organismo. Além disso, forma uma barreira física que previne a passagem de patógenos, antígenos e toxinas bacterianas para a circulação sistêmica (PIÉ et al., 2003; BLIKSLAGER et al., 2007; LIU, 2015).

O intestino delgado caracteriza-se por possuir em seu revestimento uma grande quantidade de vilosidades, que se estende por toda a superfície que têm como função a digestão final e a absorção de substâncias e nutrientes oriundos dos alimentos ingeridos (PLUSKE, WILLIAMS e AHERNE, 1996; PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS, 1997). Na base das vilosidades encontram-se as criptas que possuem algumas células, como as caliciformes e endócrinas. As criptas são estruturas que seguem até a túnica muscular da mucosa (PLUSKE, WILLIAMS e AHERNE, 1996; PLUSKE, HAMPSON e WILLIAMS, 1997; ROBBINS, 1999).

As células da mucosa do intestino delgado (enterócitos) são renovadas em um intervalo de 2 a 7 dias, garantindo a integridade da mucosa, como resultado de dois eventos citológicos associados: a renovação celular que

ocorre através da atividade mitótica, por meio da proliferação e diferenciação das células totipotentes presentes na cripta e ao longo das vilosidades; e a perda de células através de apoptose, que ocorre no ápice dos vilos (MACARI e MAIORKA, 2000; MAIORKA, 2001; CLAUS, GUNTHER e LETZGUB, 2007).

A quantidade e a altura das vilosidades são diretamente proporcionais ao número de enterócitos que as compõem, ou seja, quanto mais células, maior será a vilosidade e consequentemente maior a superfície de contato, aumentando a área e a capacidade de absorção de nutrientes (MACARI e MAIORKA, 2000). É importante salientar que o prolongamento das vilosidades pode ocorrer devido à maior taxa de renovação (multiplicação celular na cripta) ou inibição da descamação celular no topo dos vilos, enquanto a atrofia das vilosidades ocorre concomitantemente ao aumento do número de células na cripta, o que consequentemente acarreta em um aumento na profundidade desta (PLUSKE, 2001; CHAVEERACH et al., 2004; VAN IMMERSEEL et al., 2004). O aumento das criptas e o encurtamento das vilosidades são características presentes em processos inflamatórios no epitélio intestinal.

3.2 Processo Inflamatório

O processo inflamatório ocorre como resposta à injúria celular tecidual e esse processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos, tais como o extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, lise tecidual e reparo (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998).

Em consequência da lesão aguda da mucosa intestinal, ocorrem três eventos locais que resultam na restauração da continuidade epitelial e da permeabilidade normal: a) a contração dos vilos para promover a redução da área superficial exposta, b) a migração de células epiteliais para reparar a membrana basal exposta e c) o fechamento dos espaços existente entre as células epiteliais, que irão ficar mais próximas (BLIKSLAGER et al., 2007; LIU, 2015).

A ativação do sistema imune gastrointestinal gera a produção de diversas células especializadas e moléculas sinalizadoras que possuem importante papel na regulação das respostas imunes e inflamatórias. Entre essas células

especializadas e moléculas sinalizadoras podemos destacar as citocinas pró inflamatórias, como a cicloxigenase 2 (COX 2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Entretanto, a produção exacerbada destas moléculas pode resultar em degradação da integridade do epitélio intestinal e, conseqüentemente, afetar suas funções, como, a permeabilidade de macromoléculas e o transporte de nutrientes e íons (PIÉ et al., 2003; LIU et al., 2012; LIU, 2015).

3.2.1 Cicloxigenase 2 – COX 2

O ácido araquidônico é um ácido graxo de 20 carbonos, e é um metabólito liberado pelos fosfolípidos da membrana plasmática através da ação da enzima fosfolipase A2, sendo que esta pode ser ativada por diferentes estímulos, entre eles os processos inflamatórios, que promovem a injúria celular que acarreta na lise dos fosfolípidos da membrana (KUMMER e COELHO, 2002). O ácido araquidônico irá ativar uma cascata metabólica, que se inicia pela prostaglandina G/H sintase citosólica, também conhecida como cicloxigenase (COX), sendo que a via da cicloxigenase é mediada por duas enzimas diferentes, a COX 1 e a COX 2 (MENDES et al., 2012)

As COX's são enzimas que formam um endoperóxido de prostaglandina instável, a PGH₂, a partir do ácido araquidônico. A PGH₂ sofre transformação através de mecanismos não enzimáticos e enzimáticos em tromboxane e em diferentes prostaglandinas denominadas prostanoídes. A COX atua nas duas primeiras etapas da síntese dos prostanoídes que caracterizam-se como importantes mediadores inflamatórios (WILLIAMS e PECK, 1977; MENDES et al., 2012).

A COX 1 é denominada fisiologicamente constitutiva e possui ação crioprotetora gástrica e auxilia na homeostase renal e plaquetária, sendo encontrada em quase todos os tecidos normais. Durante processos inflamatórios sua atividade não é alterada e sua expressão aumenta de 2 a 4 vezes nesses casos (KUMMER e COELHO, 2002)

Já a COX 2, ou cicloxigenase indutiva apresenta níveis baixos à indetectáveis nos tecidos normais, sendo mais facilmente encontradas em alguns tecidos como intestinos, rins e pâncreas. O aumento da sua expressão ocorre na presença de citocinas e, mediante quadros inflamatórios, sua

expressão aumenta cerca de 20 vezes ou mais (KUMMER e COELHO, 2002). A COX 2 participa ativamente na formação de prostaglandinas associadas à dor e a febre do processo inflamatório, acarretando em vasodilatação e aumento de edema (ROBBINS, 1999), sendo basicamente uma enzima responsável por fenômenos do processo inflamatório e se expressa após ser estimulada por fatores de crescimento, citocinas e mitógenos (FELIN et al., 2008).

3.2.2 Fator de Necrose Tumoral α – TNF α

O TNF α são pequenas moléculas de peptídeos expressas em baixas concentrações no tecido epitelial normal e possui importante papel na regulação das respostas imunes e inflamatórias. Esta citocina pró inflamatória é secretada por macrófagos, linfócitos, neutrófilos ou monócitos, recrutados pelo sítio da lesão, sendo também estimulados pela presença de lipopolissacarídeos presentes em membranas de bactérias gram-negativas (VITALE et al., 2007). É pertencente a um grupo de citocinas quimiotáticas que são fundamentais para o processo inflamatório, além de possuir uma gama de funções biológicas (GOETZ, PLANAS e MACKENZIE, 2003).

O TNF α exerce papel central na estimulação do processo inflamatório, iniciando a cascata de produção de outras citocinas e fatores da reação imune (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998), uma vez que ativam a quimiotaxia de leucócitos e induzem a síntese de moléculas de aderência endotelial e mediadores químicos. Além disso, atuam também no crescimento, diferenciação, sobrevivência e função fisiológica de diferentes células, incluindo algumas que não participam do sistema imunológico.

O TNF α é um fator peliotrópico, ou seja, desempenha um importante papel em diferentes vertentes, tendo sua principal função na resposta imune, mas também atua em outros processos fisiológicos, como o metabolismo e a reprodução (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998; GOETZ, PLANAS e MACKENZIE, 2003).

Visando assegurar a saúde intestinal dos leitões e a manutenção de um adequado sistema imune com consequente crescimento, utilizou-se por várias décadas antimicrobianos como melhoradores de desempenho adicionados à

ração destes animais. Estes compostos atuam diretamente sobre o metabolismo animal promovendo melhoria na saúde intestinal e, consequentemente, em seu desempenho (SINDIREÇÕES, 2005; COSTA et al., 2011).

4. Uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho

Os antibimicrobianos são compostos de origem natural ou sintética que possuem duas classificações distintas, de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo elas: bactericidas que causam a morte do microrganismo ou bacteriostáticos que inibem o crescimento microbiano (SOUSA e SILVA., 2008).

Os antibióticos podem ter sua origem sintética como no caso das sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas, ou origem natural e derivados semi-sintéticos que podem ser classificados como β – lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, peptídeos cíclicos entre outros (GUIMARÃES et al., 2010).

Na produção animal são utilizados vários antimicrobianos, constituindo-se no setor que lidera mundialmente o consumo desses produtos (COSTA et al., 2007). Palaniappan e Holley (2010), comentam que 50% dos antibióticos produzidos nos Estados Unidos são administrados em animais, e a maioria em doses subterapêuticas. Entretanto, muita discussão sobre os efeitos negativos do uso dos antimicrobianos como aditivos alimentares tem ocorrido, principalmente por contribuir com a resistência bacteriana.

Diante destes fatos, os consumidores têm exigido a restrição ao uso destes aditivos, e esta pressão tem aumentado a busca por produtos alternativos que garantam máximo crescimento dos animais sem interferir na qualidade do produto final (OETTING et al., 2006). Desde a constatação da resistência bacteriana a estes compostos convencionais, a indústria vem pesquisando fontes naturais como alternativas aos antimicrobianos conhecidos, entre essas fontes podemos citar microrganismos marinhos como actinobactérias, bactérias do solo e as plantas. As plantas fazem a biossíntese de metabólitos antimicrobianos para prevenir e combater a ação de bactérias e fungos sobre elas (GUIMARÃES et al., 2010).

238 **4.1 Banimento do uso de antimicrobianos como aditivo alimentar**

239
240 O Regulamento (CE) nº 1831/2003 do Parlamento Europeu de 22 de
241 setembro de 2003 (Diário Oficial da União Europeia), estabeleceu o banimento
242 de todos os antimicrobianos como aditivo alimentar em toda União Europeia a
243 partir do dia 1º de janeiro de 2006. No Brasil, vários antimicrobianos já foram
244 suspensos da produção animal e a Instrução Normativa nº 45, de 22 de
245 novembro de 2016 (MAPA, 2016) passou a proibir o uso do sulfato de colistina
246 como aditivo zootécnico adicionado às rações animais.

247 Palaniappan e Holley (2010) demonstraram que bactérias como
248 *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* apresentaram resistência aos seis
249 antimicrobianos sintéticos testados: penicilina, tetraciclina, eritromicina,
250 ampicilina, bacitracina e novobiocina. Os autores comentam que o uso extenso
251 desses compostos na medicina humana, o uso indiscriminado para terapia
252 animal e em sub-doses como melhoradores de crescimento para os animais
253 são os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento da resistência
254 bacteriana aos antibióticos. É importante ressaltar que as bactérias resistentes
255 podem ser transferidas para humanos diretamente, através da cadeia
256 alimentar, ou de forma indireta, através da disseminação desses agentes
257 etiológicos no campo pelos resíduos dos animais. Em relação a forma direta de
258 transmissão, o principal método de transmissão desses microrganismos é
259 através da carne *in natura* e ou pelos produtos cárneos contaminados por
260 fluidos e secreções do animal durante o processo de abate, o que caracteriza
261 um risco a saúde pública.

262 **4.2 Alternativas ao uso de antimicrobianos sintéticos**

263
264
265 Os aditivos antimicrobianos de origem natural agem como melhoradores
266 de desempenho de animais criados de forma intensiva, auxiliando na
267 manutenção da saúde intestinal, permitindo maior ganho de peso diário e
268 melhorando a conversão alimentar destes animais (VETRANO et al., 2010).
269 Estes aditivos vêm sendo testados nas dietas de suínos como potenciais
270 alternativas aos antibióticos e quimioterápicos melhoradores de desempenho
271 (COSTA et al., 2011).

A melhora no desempenho de animais de produção que recebem aditivos alimentares pode ocorrer devido ao aumento na digestibilidade e absorção de nutrientes, estímulo da secreção de enzimas digestivas (CHAVEERACH et al., 2004; VONDRUSKOVA et al., 2010; COSTA et al., 2011), e pela melhora na saúde intestinal por meio da manutenção da microbiota benéfica e pelos efeitos benéficos no epitélio intestinal (VAN DER WIELEN et al., 2000; CLAUS et al., 2006).

Diante da importância do setor suinícola para o agronegócio brasileiro, sabendo-se das condições sanitárias de muitas das granjas produtoras de suínos no Brasil, e diante da proibição dos antimicrobianos melhoradores de desempenho, destacando o sulfato de colistina, uma lacuna científica se forma, fazendo-se necessário estudos de produtos alternativos aos antibióticos melhoradores de desempenho. O desenvolvimento de substâncias que substituam esses antimicrobianos com a mesma eficácia, para que possam garantir a manutenção da saúde intestinal e o máximo crescimento dos animais, sem interferir na qualidade do produto final é tema atual e prioritário. Entre esses produtos alternativos podemos destacar os aditivos fitogênicos e os ácidos orgânicos.

5. Aditivos fitogênicos

Os aditivos fitogênicos são definidos como compostos derivados de plantas que são incorporados às dietas animais com a finalidade de promover melhor desempenho e melhor qualidade dos produtos obtidos destes animais. Estes, classificam-se de acordo com a sua origem e processamento em: extratos, condimentos, óleos essenciais (compostos lipofílicos extraídos por vaporização ou destilação a álcool) e oleoresinas (compostos extraídos por solventes não aquosos) (WINDISCH et al., 2007).

Os extratos vegetais são ricos em princípios ativos, sendo que estes variam muito em concentração e em atividade antibacteriana, de acordo com a espécie botânica e parte da planta que são extraídas (COSTA et al., 2007; CHENG et al., 2014). Esses compostos são conhecidos por seus efeitos antiinflamatório, antiviral, (COSTA et al., 2011) antioxidante, antiparasitário, coccidiostáticas, antihelmínticas e efeito imunomodulador, sendo que suas

propriedades multifuncionais dependem dos compostos bioativos presentes em cada extrato (CHENG et al., 2014; ZENG et al., 2015).

Os extratos vegetais são produzidos como um mecanismo de defesa da planta contra fatores externos, tais como estresse fisiológico (falta de água ou nutriente, por exemplo), fatores ambientais (variações climáticas) e proteção contra predadores e patógenos (OETTING, 2005). Suas adições à dieta podem aumentar a secreção salivar, secreção biliar e o suco gástrico e pancreático, melhorando a atividade enzimática e aumentando a digestibilidade e a absorção de nutrientes (JANG et al., 2004; OETTING et al., 2006; UTIYAMA et al., 2006; VONDRUSKOVA et al., 2010, ERNANI et al. 2012).

5.1 Extrato de Tanino

O extrato de tanino possui propriedades antimicrobianas, antihelmínticas e antiinflamatórias (LOGUERCIO et al., 2005). Sua ação antimicrobiana deve-se a três possíveis mecanismos de ação: a) a inibição das enzimas bacterianas, b) ação sobre a membrana celular causando a modificação do metabolismo celular, e c) a capacidade de ligar-se a íons metálicos, reduzindo a disponibilidade desses íons necessários para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991; PATRICIO, 2006).

Antigamente o tanino era considerado um fator antinutricional, porém, após a descoberta da diversidade estrutural dos taninos, sabe-se que além das propriedades já citadas acima, o tanino possui ação antioxidante, combatendo os radicais livres do organismo. Porém essa capacidade *in vivo* depende da sua absorção e do seu efeito sobre o trato gastrintestinal (FRANKIC e SALOBIR, 2011).

5.2 Extrato de Papaia

O extrato de papaia é utilizado na nutrição humana para aliviar distúrbios intestinais e melhorar o processo digestório (MUSS et al., 2013). De acordo com os trabalhos de Dinkova-Kostova (2005), Kothari e Seshadri (2010); Pinto (2013), Natarjan e Sudhakar (2014), Sagnia et al. (2014) e Vuong et al. (2015), o extrato proveniente de diversas partes do *Carica Papaya*

apresenta propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, ação citoprotetora e tem a capacidade de inativação de radicais livres, impedindo os danos causados por esses componentes.

O potencial antioxidante dos extratos de papaia se deve a presença de substâncias como a quercitina, o β sitosterol, a glutathione peroxidase, a glutathione transferase, a glutathione reductase e a catalase (VIJ e PRASHAR, 2015; OLOYEDE, 2005). Na literatura existem vários estudos este extrato comprovando sua ação anti-helmíntica sobre diferentes espécies parasitárias, entre elas o *Ascaris suum* (KRIMPEN et al., 2010), no entanto, sua eficácia em relação à melhora da saúde intestinal em suínos ainda não foi confirmada.

6. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos devido a sua capacidade de reduzir o pH gastrintestinal e por possuírem a capacidade de penetrar na parede celular de alguns microrganismos quando em sua forma não dissociada (MILTENBERG, 2000; NAMKUNG et al, 2004; BRAZ et al., 2011). Alguns estudos (VONDRUSKOVA et al., 2010; SOUZA et al., 2015) demonstraram também eficácia antibacteriana sobre a *Escherichia coli*, importante patógeno gastrintestinal dos leitões.

Além disso, os ácidos orgânicos (como o ácido butírico) exercem efeitos sobre o sistema imunológico, promovem o esvaziamento gástrico, atuam na motilidade intestinal, aumentam a atividade enzimática e auxiliam na absorção de água, minerais e demais nutrientes (SINDIRAÇÕES, 2005; VONDRUSKOVA et al., 2010; BOAS et al., 2016).

6.1 Butirato de Cálcio

O ácido butírico é líquido, e o butirato de cálcio, seu sal, se apresenta em forma de pó, o que trás vantagens para o processo de fabricação de rações, já que é mais fácil de manusear, estável e possui odor mais fraco (KOTUNIA et al., 2004; SINDIRAÇÕES, 2005), além de ser menos corrosivo.

O butirato é uma substância natural presente em fluidos biológicos e tecidos, encontrado biologicamente ativo em mamíferos, quando naturalmente

são produzidos pela microbiota gastrointestinal, principalmente no cólon, ou quando ingeridos pela via oral como aditivo alimentar (CLAUS et al., 2006; CELASCO et al., 2014). O cólon possui amplo número e diversidade de bactérias (Pedroso et. al., 2005), alta disponibilidade de substrato e pH próximo à neutralidade (Breves, Kock e Schroder, 2007; Hamer et. al., 2007; Silva, 2015). A produção de butirato é reduzida ou até mesmo ausente no intestino delgado (Bergman, 1990), uma vez que este órgão possui pH mais ácido, reduzida população microbiana e menor quantidade de substrato disponível para produção de AGV (Mentschel e Claus, 2003; Claus, Gunthner e Letzgub, 2007). Este composto é uma importante fonte de energia para os colonócitos e possui função de barreira intestinal por meio da manutenção epitelial (Van Beersschreurs et al., 1998; Plöger et al., 2012; Thibault et al., 2007), inibindo a apoptose das células da mucosa, atuando na renovação celular (Bartholome et al., 2004; Breves, Kock e Schroder, 2007; Woodward et al., 2012;) e contribuindo para sua homeostase a partir da regulação da expressão de genes ligados a processos celulares, incluindo proliferação e diferenciação (Hamer et al., 2007; Celasco et al., 2014; Silva, 2015).

No trato digestório, o butirato pode atuar diretamente (trato gastrointestinal superior ou inferior) ou indiretamente (intestino delgado) no desenvolvimento e reparo tecidual. O butirato também tem sido relacionado à regulação da virulência bacteriana, tanto através de efeitos diretos na expressão de genes de virulência (GANTOIS et al., 2006), quanto pela ação na proliferação celular das células do hospedeiro (NAZARI, KARKOODI e ALIZADEH, 2012).

Quando adicionado à ração, como aditivo alimentar, o butirato desempenha a mesma função nas células do epitélio do intestino delgado (enterócitos) (BERGMAN, 1990; MENTSCHEL e CLAUS, 2003). O fornecimento para leitões neonatais, via ração, assegurou a estimulação da regeneração tecidual em até 80% para o segmento jejuno-íleo (CLAUS, GUNTHNER e LETZGUB, 2007).

Uma vez que os efeitos positivos da suplementação alimentar com butirato e extratos vegetais adicionados individualmente à ração de suínos já se encontram reportados na literatura, a busca por compostos que apresentem ação aditiva ou sinérgica, proporcionando benefícios aos animais, ainda é algo

a ser explorado. Neste contexto, a suplementação de butirato e extratos vegetais se torna interessante, uma vez que ainda não foi demonstrada nenhuma ação comprovada entre estes aditivos.

Acredita-se que o efeito conjunto existente entre os extratos vegetais de tanino (*Castanea sativa*) ou papaia (*Carica papaya*) e o butirato de cálcio apresente efeito benéfico sobre a saúde intestinal de leitões. Dessa maneira, a associação desses aditivos pode vir a substituir o uso de antimicrobianos, contribuindo para a melhora na saúde intestinal e consequentemente no desempenho produtivo dos suínos.

7. Objetivos

7.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi verificar o efeito da administração do butirato de cálcio associado ao extrato de tanino (*Castanea sativa*) ou ao extrato de papaia (*Carica papaya*) sobre o desempenho, incidência de diarreia, saúde intestinal e qualidade da carne de leitões recém-desmamados.

7.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação entre o butirato de cálcio e o extrato de tanino ou extrato de papaia sobre o desempenho dos leitões recém desmamados por meio dos parâmetros: peso vivo aos 14 e 35 dias, ganho diário de peso, consumo diário de ração e conversão alimentar para o período de 1 a 14 dias e 1 a 35 dias de experimento;
- Avaliar a associação entre o butirato de cálcio e o extrato de tanino ou extrato de papaia sobre a incidência de diarreia nos períodos de 1 a 14 e 1 a 35 dias de experimento;
- Avaliar a associação entre o butirato de cálcio e o extrato de tanino ou extrato de papaia sobre a morfologia intestinal através dos parâmetros: altura de vilosidade, profundidade de cripta,

largura de vilosidade, densidade de vilos e relação altura de vilosidade/profundidade de cripta no duodeno e jejuno aos 14 e 35 dias de experimento;

- Avaliar a associação entre o butirato de cálcio e o extrato de tanino ou extrato de papaia sobre a saúde intestinal através da análise de imunexpressão de COX 2 e TNF α no duodeno e jejuno aos 14 e 35 dias de experimento;
- Avaliar a associação entre o butirato de cálcio e o extrato de tanino ou extrato de papaia sobre a qualidade da carne de leitões na fase de creche através da avaliação de oxidação lipídica, pH e análise de cor em pernil.
- Verificar, mediante todas as análises a serem realizadas, se a combinação destes aditivos poderá ser uma alternativa aos antimicrobianos melhoradores de desempenho, destacando neste projeto o sulfato de colistina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual de 2017**. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf
- ALLEN, C. D.; RUSSELL, S. M.; FLETCHER, D. L. The relationship of broiler breast meat color and pH to shelf-life and odor development. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1042-1046, 1997.
- ARAUJO, J. C. et al. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. **Journal of electron microscopy**, v. 52, n. 4, p. 429-433, 2003.
- AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76, 2007.
- BARBOSA, L. et al. Avaliação de característica de qualidade da carne de suínos por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1639-1645, mar. 2006.
- BARREIRA, J. C. M. et al. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1106-1113, set. 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécie reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, mar. 2006.
- BARTHOLOME, A. L. et al. Supplementation of total parenteral nutrition with butyrate acutely increases structural aspects of intestinal adaptation after an 80% jejunoileal resection in neonatal piglets. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 210-222, 2004.
- BEGUM, M.. **Phytochemical and Pharmacological Investigation of Carica Papaya Leaf**. 2014. Tese de Doutorado. East West University.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.
- BIAGIA G.; CIPOLLINI I.; PAULICKS B. R.; et al. Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 121-135, 2010.

- BILIĆ-ŠOBOT, D. et al. Effect of hydrolysable tannins on intestinal morphology, proliferation and apoptosis in entire male pigs. **Archives of animal nutrition**, v. 70, n. 5, p. 378-388, 2016.
- BLIKSLAGER, A. T. et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. **Physiological reviews**, v. 87, n. 2, p. 545-564, 2007.
- BOAS, A. D. C. V. et al. Organic acids in diets of weaned piglets: performance, digestibility and economical viability. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 1015-1022, 2016.
- BOAS, A. D. C. V.; BUDIÑO, F.; TRINDADE NETO, M. A. T. "Suplementação de ácidos orgânicos em dietas para leitões na fase de creche." Instituto de Zootecnia. **Programa de Pós-Graduação em produção animal sustentável**, Nova Odessa, Janeiro, (2014).
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000.
- BRASIL, **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal (atualizado em 25/04/2015) <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados> Acesso em: 09 de julho de 2015, às 16:11.
- BRAZ, D.B., et al. Acidificantes como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento de leitões. **Archivos de zootecnia**. v. 60, n.231, p.745-756, 2011.
- BREVES, G.; KOCK, J.; SCHRÖDER, B. Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs. **Livestock Science**, v. 109, n. 1, p. 4-13, 2007.
- BREWER, M. S.; NOVAKOFSKI, J.; FREISE, K. Instrumental evaluation of pH effects on ability of pork chops to bloom. **Meat science**, v. 72, n. 4, p. 596-602, 2006.
- BRIDI, A. M.; SILVA, C. A. da. **Métodos de Avaliação da Carcaça e da Carne Suína**. 1 ed. LONDRINA: MIDIOGRAF, 2007. 97 p.
- CAIRO, P. L. G. et al. Effects of dietary supplementation of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017.
- CARBONEZI, C. A. et al. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 319-324, 2007.

CARVALHO, Wilson Andrade; LEMÔNICA, Lino. Mecanismos Celulares e Moleculares da dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**.

CHAVEERACH, P. et al. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 330-334, 2004.

CHENG, G. et al. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.

CLAUS, R.; GÜNTHER, D.; LETZGUSS, H. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 91, n. 7-8, p. 312-318, 2007.

COSTA, L. B. et al. Aditivos fitogênicos e butirato de sódio como alternativas aos antibióticos para leitões desmamados. **Archivos de zootecnia**, v. 60, n. 231, p. 733-744, 2011.

COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; MIYADA, V.S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 589-595, 2007.

COTRAN, S.R.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; Robbins Patologia Estrutural e Funcional. Sexta Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.

CUFF, M. A.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. The human monocarboxylate transporter MCT1: gene structure and regulation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, n. 5, p. G977-G977, 2005.

DINKOVA-KOSTOVA, Albena T. et al. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 12, p. 4584-4589, 2005.

ELIZONDO A. M.; MERCADO E. C.; RABINOVITZ B. C.; et al. Effect of tannins on the *in vitro* growth of *Clostridium perfringens*. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 308-314, 2010.

FELIN, C.A.; ROCHA, A.B.; FELIN, I.P.D.; et al. Expressão de proteína p53 e Cox-2 em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente. **Revista Brasileira de Croloproctologia**, Rio de Janeiro, vol. 28, n. 1, jan./fev. 2008.

FERRARI, C. K. B. Oxidação Lipídica em alimentos e sistemas biológicos: Mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, jan./jun. 1998.

FRANKIC, T.; SALOBIR, J.. In vivo antioxidant potential of Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract in young growing pigs exposed to n-3 PUFA - induced oxidative stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1432-1439, mar. 2011.

FROLLINI, Anelena Bueno et al. EXERCÍCIO FÍSICO E REGULAÇÃO DO LACTATO: PAPEL DOS TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO (PROTEÍNAS MCT)-DOI: 10.4025/reveducfis. v19i3. 6007. **Journal of Physical Education**, v. 19, n. 3, p. 453-463, 2008.

GANTOIS I.; DUCATELLE R.; PASMANSF.; et al. Butyrate Specifically Down-Regulates Salmonella Pathogenicity Island 1, Gene Expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.946-949, 2006.

GOETZ, F. W.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S.. Tumor necrosis factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 487-497, 2004.

GUIMARÃES, D. O., et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAMER, H. M. et al. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health?. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 1, p. G1-G9, 2012.

HAMER, H. M. et al. The role of butyrate on colonic function. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008.

HANCZAKOWSKA, E. et al. Effect of herbal extracts on piglet performance and small intestinal epithelial villi. **Czech Journal of Animal Science**, v. 9, p. 420-429, 2012.

HARADA E.; KATO S. Effect of short-chain fatty acids on the secretory response of the ovine exocrine pancreas. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 244, G284-G290, 1983.

HEO, J. M. et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 2, p. 207-237, 2013.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE – Estatística de Produção Pecuária, Março de 2017**, p39-43. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf

JANG, A. et al. Antioxidative potential of raw breast meat from broiler chicks fed a dietary medicinal herb extract mix. **Poultry Science**, v. 87, n. 11, p. 2382-2389, 2008.

- KOTHARI, V.; SESHADRI, S.. Antioxidant activity of seed extracts of annona squamosa and carica papaya. **Nutrition & Food Science**, v. 40, n. 4, p. 403-408, jan. 2010.
- KOTUNIA, A. et al. Effect of sodium butyrate on the small intestine. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, p. 59-68, 2004
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.
- KUMMER, R.; et al.. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 195-209, 2009.
- LEE, I. K. et al. Stress, nutrition, and intestinal immune responses in pigs—a review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 8, p. 1075, 2016.
- LIU, Y. et al. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. **Animal Science Journal**, 2017.
- LIU, Y. et al. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 11, p. 2017-2024, 2012.
- LIU, Y.. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 41, 2015.
- LOGUERCIO, A.P.; et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells) **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n 2, p. 371-376, 2005.
- MACARI, M. e MAIORKA, A. (2000), Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: Conferência APINCO'2000 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas. *Anais...* Campinas, Brazil.
- MAIORKA, A. et al. Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascórbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, 2005.
- MAIORKA, A. et al. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 487-490, 2001.
- MATTIOLI, T. M. F. et al. Utilização de brocas trefina para a confecção de tissue microarray. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 2, p. 161-167, 2011.

- MENDES, Reila Tainá et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Rev. bras. reumatol**, v. 52, n. 5, p. 774-782, 2012.
- MENTSCHER, J.; CLAUS, R. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. **Metabolism**, v. 52, n. 11, p. 1400-1405, 2003.
- MILTEMBERG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, **Campinas**. Anais... Campinas: IAC, 2000. p.87-100
- MUSS, C.; MOSGOELLER, W.; ENDLER, T. Papaya preparation (Caricol®) in digestive disorders. **Biogenic Amines**, v. 26, n. 1, p. 1–17, 2013.
- NAMKUNG, H. et al. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 697–704, 2004.
- NANCEY S, MOUSSATA D, GRABER I, et al. (2005) Tumor necrosis factor α reduces butyrate oxidation in vitro in human colonic mucosa: a link from inflammatory process to mucosal damage? *Inflamm Bowel Dis* 11, 559–566. Dietary protein and gene expression in pigs 617
- NAZARI, M.; KARKOODI, K.; ALIZADEH, A. Performance and physiological responses of milk-fed calves to coated calcium butyrate supplementation. **South African Journal of Animal Science**, v. 42, n. 3, p. 296-303, 2012.
- OETTING, L.L. et al Efeitos de Extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p. 1389-1396, 2006.
- OLOYEDE, O. I. Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 6, p. 379-381, 2005.
- PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2, p. 164-168, 2010.
- PATRICIO V. M. I. et al. Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de taninos para leitões na fase de creche. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1406-1415, 2006.
- PEDROSO, A. A. et al. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, vol.34, nº 4, 2005

PIÉ, S. et al. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 641-647, 2004.

PINTO, L. A. et al. Antiulcerogenic activity of Carica papaya seed in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 388, n. 3, p. 305-317, 2015.

PINTO, L. G. Q. et al. Desempenho do Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado com dietas contendo diferentes teores de tanino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1171-2001, mai. 2001.

PINTO, L. A. et al. Antiulcerogenic activity of Carica papaya seed in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 388, n. 3, p. 305-317, 2015.

PLÖGER S, STUMPF F, PENNER GB, et al. (2012) Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 1258, 52–59.

PLUSKE, J. R. et al. Early feeding for lifetime performance of pigs. **Recent advances in animal nutrition in Australia**, v. 15, p. 171-181, 2005.

PLUSKE, J. R. et al. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pig. **Nutrition Research Reviews**, v. 15, n. 2, p. 333-371, 2002.

PLUSKE, J. R. Invited review: Aspects of gastrointestinal tract growth and maturation in the pre-and postweaning period of pigs. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 7supplement3, p. 399-411, 2016.

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, n. 1, p. 215-236, 1997.

PLUSKE, J. R.; WILLIAMS, I. H.; AHERNE, F. X. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. **Animal Science**, v. 62, n. 1, p. 131-144, 1996.

RIBEIRO R.F., F.A.Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tnf-alpha) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, vol. 73, n.1, jan./fev. 2007.

RIST VTS, WEISS E, EKLUND M, et al. (2013) Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. *Animal* 7, 1067–1078.

RITZHAUPT A, et al. (1998) The characterization of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *J Physiol* 507, 819–830.

- RIZZO, Pr. V. et al. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 801-807, 2010.
- ROSTAGNO, H.S. et al. 2011. **Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements**, 3 ed. UFV, Viçosa.
- SAGNIA, B. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from cassia alata, eleusine indica, eremomastax speciosa, carica papaya and polyscias fulva medicinal plants collected in camerron. **PLOS ONE**, Spain, v. 9, n. 8, p. 1-10, ago. 2014.
- SAKATA T.; VON ENGELHARDT W. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol** v. 74, p. 459–462, 1983.
- SANTANA, M. B. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters for weanling pigs. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1093-1098, 2015.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991
- SEGAIN, J. P. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 397-403, 2000.
- SHIMOKOMAKI, M. et al. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. 1 ed. SÃO PAULO: VARELA, 2006. 236 p.
- SILVA JÚNIOR, Cláudio Donizete da. Aditivo alternativo, associado ou não ao antimicrobiano, na dieta de leitões recém-desmamados. Dissertação de mestrado. **Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena**. Dracena, 2016.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A.. Métodos de avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, abr. 1999.
- SILVA, Jessica Lima. Avaliação morfológica e morfométrica do jejuno, e zootécnica de frangos de corte suplementados com butirato de cálcio microencapsulado. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal**. Recife, 2015.
- SILVA, Jessica Lima. Avaliação morfológica e morfométrica do jejuno, e zootécnica de frangos de corte suplementados com butirato de cálcio microencapsulado. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal**. Recife, 2015.

SINDIRAÇÕES. Guia de Aditivos. Ácidos Orgânicos, aminoácidos, enzimas, microminerais, vitaminas. **Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal**, Julho, 2005.

SONG, M.; XIA, B.; LI, J. Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1 β , and nuclear factor κ B in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. **Postgraduate medical journal**, v. 82, n. 964, p. 130-135, 2006.

SOUSA, R. V., V. de A. SILVA. "Implicações do uso de aditivos na alimentação animal: resíduos e barreiras às exportações." **Embrapa Caprinos e Ovinos- Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso nordestino de produção animal, 5; Simpósio nordestino de alimentação de ruminantes, 11.; Simpósio sergipano de produção animal, 1., 2008, Aracaju. Anais: Sociedade Nordestina de Produção Animal; Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2008. 10 f. 1 CD-ROM., 2011.

SUDHAKAR, N.; THEIVANAI V. R. Potential medicinal properties of carica papaya linn. - a mini review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1-4, fev. 2014.

THIBAUT, R. et al. Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 1916-1927, 2007.

TUDELA, C. V. et al. Down-regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) gene expression in the colon of piglets is linked to bacterial protein fermentation and pro-inflammatory cytokine-mediated signalling. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 4, p. 610-617, 2015.

VAN BEERS-SCHREURS, Hetty MG et al. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 6, p. 947-953, 1998.

VAN DER WIELEN P.W.; et al. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2536-2540, 2000.

VAN IMMERSEEL, F. et al. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with Salmonella enteritidis in young chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 1, p. 69-74, 2004.

VAN KRIMPEN, M. M. et al. Anthelmintic effects of phytogenic feed additives in Ascaris suum inoculated pigs. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 3, p. 269-277, 2010.

VASSALO, M. et al. Probióticos para leitões dos 10 aos 30 kg de peso vivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.1, p.131-138, 1997.

- VELASCO, M. V. R. Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico. Dissertação. **Universidade de São Paulo: São Paulo**, 1993.
- VETRANO, P., et al. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 801-807, 2010.
- VIEIRA, R.H.S.F. et al. Microbicidal Effect of Medicinal Plant Extratcts (*Psidium guajava* Linn. And *Carica papaya* Linn.) Upon Bacteria Isolated From Fish Muscle and Known to Induce Diarrhea in Childre. **Revista do Instituto de Medicina Triopical de São Paulo**, São Paulo, v 43, n 3, Mai/jun 2001.
- VIJ, T.; PRASHAR, Y.. A review on medicinal properties of carica papaya linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, [S.L], v. 5, n. 1, p. 1-6, jun. 2015.
- VITALE, Rodrigo Faller; RIBEIRO, Fernando de Andrade Quintanilha. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 1, n. 1, p. 123-127, 2007.
- VONDRUSKOVA H., et al: Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 55, p. 199–224, 2010.
- VOUNG, Q. V. et al. Antioxidant and anticancer capacity of saponin-enriched Carica papaya leaf extracts. **Food Science**, v. 50, p. 169-177, fev. 2014.
- VUONG, Q. V. et al. Antioxidant and anticancer capacity of saponin-enriched Carica papaya leaf extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 169-177, 2015.
- VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 72, n. 12, p. 1084-1087, 1970.
- WILLIAMS, T. J.; PECK, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v. 270, n. 5637, p. 530-532, 1977.
- WINDISCH, W.M.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 140-148, 2007.
- WOODWARD AD, REGMI PR, GÄNZLE MG, et al. (2012) Slowly digestible starch influences mRNA abundance of glucose and short-chain fatty acid transporters in the porcine distal intestinal tract. **Journal of Animal Science** 90, 80–82.
- XU, Z. R. et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry science**, v. 82, n. 6, p. 1030-1036, 2003.

ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2015.

CAPITULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico Research in Veterinary Science)

Running title: Phytobiotic and organic acid additives in weanling pig diets

Effect of the association of calcium butyrate with the tannin extract (*Castanea sativa*) or papaya extract (*Carica papaya*) on performance, intestinal health and meat quality of piglets in the nursery phase

ABSTRACT

BACKGROUND: Newly weaned pigs undergo changes in intestinal morphology with consequent diarrhea and decreased performance. To minimize these alterations antimicrobials are added to the diet of these animals as performance enhancers, however government agencies have restricted the use of these compounds. This restriction has caused the need to develop alternatives to synthetic antimicrobials. The objective of this work was to verify the effect of the association of calcium butyrate with the extract of tannin (*Castanea sativa*) or papaya (*Carica papaya*), replacing antimicrobials, on the performance, incidence of diarrhea, intestinal histology, immunoexpression of the pro-inflammatory cytokines cyclooxygenase 2 (COX-2) and tumor necrosis factor α (TNF α), and the meat quality of piglets in the nursery phase.

1030 RESULTS: No significant differences were observed for performance and
1031 intestinal histology. The calcium butyrate + tannin treatment provided a lower
1032 incidence of diarrhea, lower immunoexpression of COX-2 at 14 days and the
1033 TNF α at 35 days in the duodenum, and decrease in the brightness index of the
1034 ham ($P < 0.05$).

1035 CONCLUSION: Therefore, calcium butyrate associated with the tannin extract
1036 is a possible alternative for the substitution of synthetic antimicrobials in the diet
1037 of nursery piglets.

1038
1039 **Keywords:** antimicrobial alternatives, immunoexpression of the pro-
1040 inflammatory cytokines, intestinal morphology, organic acids, plant extracts,
1041 swine.

1042 1043 INTRODUCTION

1044
1045 During the weaning period, pigs undergo several stressors such as
1046 feeding changes, separation from the mother and litter, change of environment
1047 and exposure to new pathogens (Heo et al., 2013; Lee et al., 2016; Pluske et
1048 al., 1997). These factors, associated with insufficient enzyme activity and
1049 reduction of the absorptive capacity, with consequent alterations in intestinal
1050 histology (Pluske et al. 1996) cause “post-weaning diarrhoea syndrome”
1051 (PWDS), directly affecting the zootechnical performance of these animals
1052 (Kummer et al., 2009; Vondruskova et al., 2010).

1053 In addition to its role in the absorption and metabolization of nutrients, the
1054 intestine also plays an important role in the immune system, containing about

70% of the body's immune cells. The intestine acts as a physical barrier that prevents the passage of pathogens, antigens and bacterial toxins into the systemic circulation (Blikslager et al., 2007; Liu et al., 2015; Pié et al., 2004). Therefore, the use of antimicrobials as performance enhancers added to the diet of these animals aims to ensure the intestinal health of piglets, adequate maintenance of the immune system, and consequently the guarantee of good zootechnical performance.

Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament of September 22/2003 banned the use of antimicrobials as a food additive throughout the European Union (EU) in January 1, 2006. Brazil, like the EU, has been following this trend and restricting the use of performance-enhancing compounds. Given these facts, it is necessary to study alternative additives to performance-enhancing antibiotics, as organic acids and plant extracts.

Butyrate it is a short chain fatty acid produced in the colon by the gastrointestinal microbiota (Celasco et al., 2014; Gantois et al., 2006), which has antimicrobial properties, stimulates cell epithelial proliferation, acts as an anti-inflammatory agent and assists in intestinal motility (Celasco et al., 2014; Gantois et al., 2006; Nazari et al, 2012).

In recent years the tannin extract, formerly known only for its antinutritional factor in monogastric animals, has presented antimicrobial, anthelmintic and anti-inflammatory properties (Louguercio et al., 2005), as well as antioxidant capacity (Frankič and Salobir, 2011).

Another plant extract that deserves attention is papaya, being used in human nutrition to alleviate intestinal disorders and improve the digestive process (Muss et al., 2013). This extract exhibits anti-inflammatory,

antimicrobial and antioxidant properties (Sudhakar and Theivanai, 2014; Vij and Prashar, 2015).

However, there are few studies in which these extracts have been added to animal feeds and to date there are no reports in literature of the association of calcium butyrate with papaya or tannin extracts in piglet feeding. The objective of this study was therefore to evaluate the potential of these compounds in the substitution of performance-enhancing antimicrobials on zootechnical performance, incidence of diarrhea, intestinal histology, immunoexpression of the pro-inflammatory cytokines COX-2 and TNF α , and meat quality of piglets in the nursery.

MATERIAL AND METHODS

The present study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (*Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA*) of the Pontifical Catholic University of Paraná (*Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR*), Brazil, under protocol number 875A.

Animals, housing, experimental diets and management

A total of 96 piglets in the nursery phase were used (48 castrated males and 48 females) distributed in 4 treatments, with 8 replicates per treatment and 3 animals per experimental unit (bay), with initial age of 28 ± 2 days and initial weight of 7.17 ± 1.07 kg. The weight of the animals was verified at the beginning of the experiment and used to distribute them equally in the different blocks, as well as the sex, adopting the randomized complete block design.

The experimental treatments used were: NC: negative control – basal diet without the addition of performance enhancing additives; PC: positive control - basal diet + 40 mg/kg of colistin sulphate; BP: basal diet + calcium butyrate + papaya extract (inclusion levels: pre-initial phase: 0.15%, initial phase: 0.075%); BT: basal diet + calcium butyrate + tannin extract (inclusion levels: pre-initial phase: 0.15%, initial phase: 0.075%).

The papaya extract used was derived from *Carica papaya*, popularly known as *papaya*, and the tannin extract from *Castanea sativa*, known as the sweet chestnut. The additives were microencapsulated to be added to the piglet diet.

The experimental period was 35 days, during which the animals were housed in suspended nursery stalls (1.2m x 1.6m), with a plastic floor, manual feeders and nipple waterers. The piglets received the pre-initial diet (from the 1st to the 14th day) and initial diet (from the 14th to the 35th day) and water *ad libitum*.

The experimental diets were isonutritives, differing only with regards to inclusion of the evaluated products, composed mainly of corn, soybean meal and vitamins - minerals, added to meet the nutritional requirements of the species, according to the recommendations of Rostagno et al. (2011). The composition of the basal diet and the calculated values are shown in Table 1. All management practices were performed according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC, 1993).

Table 1. Percent composition and calculated values of the base diets

Ingredients	Pre-initial diet (1 to 14 days)	Initial diet (14 to 35 days)
Corn (80 g kg ⁻¹)	435.9	513.0
Soybean meal (460 g kg ⁻¹)	260.0	250.0
Vitamix®*	276.8	202.7
Soy oil	15.0	17.0
Calcareous	9.0	9.0
Dicalcium phosphate	-	3.0
L- Lysine (780 g kg ⁻¹)	2.0	3.8
DL- Methionine (990 g kg ⁻¹)	0.4	0.5
L-Threonine (980 g kg ⁻¹)	0.9	1.0
Calculated values (g kg⁻¹)		
Crude protein	197.6	187.6
Ethereal extract	22.9	23.3
Lactose	60.3	44.1
Lysine	15.1	14.4
Methionine	4.7	4.4
Methionine+cystine	7.5	7.0
Tryptophan	2.7	2.5
Threonine	9.8	9.2
Metabolizable energy (Kcal kg ⁻¹)	3.341,50	3.335,06

*Vitamix: quantity per kg of product: 155.7 (g kg⁻¹) crude protein, 75.9 (g kg⁻¹) ethereal extract, 119.3 (g kg⁻¹) mineral material, 5.7 (g kg⁻¹) crude fiber, 217.8 (g kg⁻¹) lactose, 54.3 (g kg⁻¹) milk protein, 16.4 (g kg⁻¹) calcium, 14.9 (g kg⁻¹) total phosphorus, 13.4 (g kg⁻¹) available phosphorus, 12.2 (g kg⁻¹) sodium, 13.9 (g kg⁻¹) potassium, 20.0 (g kg⁻¹) chlorine, 16.9 (g kg⁻¹) lysine, 7.0 (g kg⁻¹) methionine, 9.6 (g kg⁻¹) methionine+cystine, 2.9 (g kg⁻¹) tryptophan, 10.3 (g kg⁻¹) threonine, 8.0 (g kg⁻¹) arginine, 13.0 (g kg⁻¹) leucine, 7.2 (g kg⁻¹) isoleucine, 3.6 (g kg⁻¹) histidine, 7.5 (g kg⁻¹) valine, 6.3 (g kg⁻¹) phenylalanine, 3.373,07 kcal kg⁻¹ of metabolizable energy, 50,000 IU of vitamin A, 10,000 IU of vitamin D3, 160 mg vitamin E, 12 mg vitamin K3, 12 mg vitamin B1, 20 mg vitamin B2, 12 mg vitamin B6, 0.10 mg vitamin B12, 2.40 mg folic acid, 140 mg nicotinic acid, 88 mg pantothenic acid, 0.40 mg biotin, 1248 mg choline, 800 mg iron, 800 mg copper, 220 mg manganese, 3.20 mg cobalt, 5000 mg zinc, 7.20 mg iodine, 1.20 mg selenium, 1.20 mg chromium.

Performance, incidence of diarrhea and slaughter of the animals

All feed provided to the animals was weighed, as well as the remaining and wasted portions so as to obtain a calculation of daily feed intake (DFI). The animals were weighed at 14 and 35 days of the experiment so as to calculate the daily weight gain (DWG) and the feed conversion ratio (FCR).

Daily monitoring of the incidence of diarrhea (ID) was performed by in the morning by indicating a score, assigning 0 for normal stools, 1 - pasty stools, 2 -

soft stools (creamy) and 3 - aqueous stools, according to the procedure described by Vassalo et al. (1997). Scores of 2 and 3 were considered diarrhea and the percentage of diarrhea was calculated in relation to the total number of feces counted.

After 14 and 35 days of the experiment, one animal from each experimental unit was slaughtered after a 12-hour fasting period and a water diet to collect samples for histological and morphological analyses of the intestinal epithelium. The animal chosen was that whose weight was closest to the average of the animals in each experimental unit. The animals were slaughtered in a commercial slaughterhouse subjected to the State Sanitary Inspection, according to the standards of humane slaughter recommended for animal welfare, consisting of desensitization by electrocution followed by bleeding (cutting of the large vessels that emerge from the heart).

Intestinal morphology

Structural analysis - optical microscopy

Immediately after slaughter, fragments measuring approximately 5 cm long were collected from the duodenum (collected at 15 cm from the pyloric sphincter) and from the jejunum at the distal part (collected approximately 150 cm from the ileocecal junction). The samples were stored in a 10% formaldehyde solution and subsequently processed and stained with hematoxylin and eosin (HE), according to the methodology of Touchette et al. (2002).

The slides were photographed using an AxioCam MRC camera (Carl Zeiss®, Göttingen, Germany), coupled to the Axio Scope A1 microscope (Carl Zeiss®, Jena, Germany) and later the Axionvision Se 64 software (Carl Zeiss®, Thornwood, USA) was used to measure the height of 12 villi (VH), the respective crypt depths (CD), villus width (WID) and calculation of the villi height/crypt depth ratio (VH/CD).

Ultrastructural analysis - scanning electron microscopy (SEM)

In the same region where fragments were collected for structural analysis, another segment (5 cm) of the duodenum and jejunum was removed and fixed in Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde and 0.1 M sodium trihydrate cacodylate) for one hour. It was cut into 0.25 cm² pieces (0.50 x 0.50 cm) and maintained within the same solution until the drying process, carried out with hexamethyldisilazane (HMDS) for 10 minutes. Subsequently, the samples were submitted to SEM analysis, as described by Araujo et al. (2003). In the images obtained by SEM the villi density (VD) was measured in an area of 1,110,619.52 µm² using the scanning electron microscope VEGA3 LMU (Tescan, Brno, Czech Republic). For counting of the villi 3 photos were selected per repetition.

Immunohistochemistry

The same samples used for the structural analysis were used for confection of the blocks via the TMA technique (tissue microarray), described by Mattioli et al. (2017). Paraffin blocks containing 24 sample fragments were made for subsequent confection of the slides.

Immunoexpression of cyclooxygenase-2 (COX 2) was assessed using the polyclonal anti-Cox-2 antibody (Dako, Glostrup, Denmark). Then the slides were scanned on the Axio Scan.Z1 scanner (Carl Zeiss®, Jena, Germany) and analyzed with the Image Pro Plus 4 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, USA). The area percentage immunolabeled with COX-2, in μm^2 , was calculated by evaluating seven images for each replicate according to the methodology of Costa Filho et al. (2017).

For the identification of tumor necrosis factor α (TNF α) in the fragments, the anti-TNF α primary antibody (ABCam, Cambridge, UK) was used for preparation of the slides. Counting of the TNF α -positive cells was performed using images obtained from the Olympus BX40 microscope with a 40x objective lens. Five random fields were photographed for both segments (duodenum and jejunum) in each replicate, and subsequently the mean count of immunolabeled cells was obtained.

Lipid oxidation, pH and color analysis in the ham

For the physico-chemical analyses of the ham, the treatments negative control (NC), calcium butyrate + papaya extract (BP) and calcium butyrate + tannin extract (BT) were evaluated. Samples were collected from five animals per treatment, identified, coated with aluminum foil, vacuum packed and frozen. Subsequently, the samples were thawed under refrigeration (4°C) for a period of approximately 15 hours. All analyses were performed in triplicate.

For evaluation of lipid oxidation, the TBARS index (thiobarbituric acid reactive substances) was used. From each sample 5 grams were weighted, by taking small cuts of different areas. Samples were transferred to a Becker to

which 25 mL of TCA (trichloroacetic acid – 7.5%) were added and homogenized for 1 minute. Thereafter the obtained material was filtered to separate the solids from the liquids. The clear filtrate was transferred to tubes where 1 mL of 7.5% TCA and 5 mL of 0.02 M TBA (thiobarbituric acid) were added. The tubes were immediately placed in a water bath for 40 minutes, then cooled, and measured with a spectrophotometer (Spectronic 21D from Milton Roy, USA) at 538 nm, utilizing a blank sample and a curve. The results obtained were expressed as malonaldehyde concentration in mg/kg of sample, and the method used was described by Vyncke (1970).

For color analysis the portable Chroma Meter CR 410 colorimeter was used (Konica Minolta, New Jersey, USA). The following parameters were evaluated: L* (brightness), a* (red ratio), b* (yellow ratio), C* (chroma) and h (color hue), being expressed in the CIELAB color system, in triplicate.

Verification of pH was performed at three different points of the sample by insertion of the electrode with a penetrating tip, using the Hanna pH meter (HI 99163, Romania). The result was obtained from the average of the three measurements.

Statistical analysis

Data obtained in the analyses of performance, intestinal morphology, immunohistochemical analysis, lipid oxidation, pH and color analysis were submitted to the Shapiro-Wilk test for normality evaluation and the Levene test to evaluate the homogeneity of the variances. As these requirements were met, the effect of the treatments on the variables evaluated was verified via the analysis of variance (ANOVA). For the immunohistochemistry and color

analyses, the Tukey test was performed upon identification of significant effects. In order to verify possible differences between the treatments on the incidence of diarrhea, the values of the scores obtained during the experimental period were submitted to the Chi - Square test. The Statgraphics Centurion XVI Statistical Software was used and the significance level of 5% ($P<0.05$) was adopted for all variables analyzed.

RESULTS

Performance and incidence of diarrhea

The variables weight at 14 and 35 days, daily weight gain, daily feed intake and feed conversion were not influenced by the treatments (Table 2). The BT treatment reduced the incidence of diarrhea ($P<0.05$) in piglets during the periods from 1 to 14 days and from 1 to 35 days in comparison with the other treatments. In the period from 1 to 35 days, the BP treatment had a higher incidence of diarrhea ($P<0.05$) when compared to the BT and NC treatments (Table 2).

Table 2. Averages of the initial body weight (P1), body weight at 14 days (P14), body weight at 35 days (P35), daily weight gain (DWG), daily feed intake (DFI), feed conversion (FC) and incidence of diarrhea (ID) for the 1 to 14 and 1 to 35 day experimental periods

Variable	Treatments ¹				Mean	<i>p-value</i>	SEM ²
	NC	PC	BP	BT			
1-14 days							
P1 (Kg)	7.00	7.26	7.24	7.20	7.17	-	-
P14 (Kg)	11.87	12.09	12.24	11.92	12.03	0.73	0.25
DWG (g)	0.35	0.34	0.36	0.34	0.35	0.81	0.01
DFI (g)	0.47	0.48	0.48	0.45	0.47	0.37	0.01
FC	1.36	1.40	1.35	1.35	1.36	0.75	0.04
ID (%)	11.63 a	14.61 a	14.90 a	8.35 b	12.37	-	-
1-35 days							
P35 (Kg)	25.05	26.81	26.25	25.48	25.90	0.64	0.10
DWG (g)	0.52	0.56	0.54	0.52	0.53	0.73	0.03
DFI (g)	0.84	0.88	0.89	0.83	0.86	0.49	0.03
FC	1.66	1.58	1.64	1.59	1.62	0.58	0.04
ID (%)	6.75 b	8.26 ab	10.34 a	4.88 c	7.56	-	-

¹NC= negative control – basal diet; PC = positive control – basal diet + colistin sulfate; BP= basal diet + calcium butyrate + papaya extract; BT= basal diet + calcium butyrate + tannin extract

²Standard error of the mean.

^{a-b}Different letters on the same line are statistically different by the Chi Square Test (P<0.05).

Intestinal morphology

There was no difference ($P>0.05$) between the treatments regarding the villi height, crypt depth, villi height/crypt depth, villi width and villus density in the duodenum and jejunum of piglets at 14 and 35 days of the experiment (Table 3).

In the duodenum, at 14 days the animals presented a general mean of 414.95 μm for the villus height, 418.08 μm for crypt depth, mean ratio of the villus height to crypt depth of 1.00, mean villi width of 161.71 μm and mean villus density of 33.48. For the same period, in the jejunum, the animals had a mean overall villus height of 370.87 μm , crypt depth of 341.56 μm , mean ratio of the villus height to crypt depth of 1.10, mean width of 143.22 μm and villus density of 34.79.

In the duodenum at 35 days the animals had a mean overall villus height of 447.15 μm , crypt depth of 444.88 μm , mean ratio of the villus height to crypt depth of 1.02, mean villi width of 177.66 μm and mean villus density of 28.21. For the same period, in the jejunum, the animals presented a general mean of 408.58 μm for the villus height, 293.19 μm for the crypt depth, the mean ratio of the villus height to crypt depth was 1.26, the mean width was 128.63 μm and the villi density was 22.69.

Immunohistochemistry

In the duodenum, at 14 days of experimentation, the BT treatment presented a lower percentage of cells stained for COX-2 in relation to the NC treatment ($P<0.05$); on the other hand, at 35 days the BP treatment had a higher percentage of cells stained for COX-2 compared to the NC treatment

($P < 0.05$). For the jejunum, at 14 days the PC treatment showed a lower percentage of cells stained for COX-2 in relation to the BP treatment ($P < 0.05$) (Table 3).

For the analysis of $\text{TNF}\alpha$, a statistical difference was observed in the duodenum at 35 days of experimentation, in which the BT treatment presented lower cellular expression when compared to the NC treatment ($P < 0.05$) (Table 3).

Table 3. Percentage of the stained area in μm^2 for COX-2 and mean count of stained cells for $\text{TNF}\alpha$ in the analysis of immunohistochemistry in the duodenum and jejunum of piglets at 14 days and 35 days of experimentation

Variable	Treatments ¹				<i>p-value</i> ²	SEM ³
	NC	PC	BP	BT		
<u>Cox 2 (%)</u>						
14 days						
Duodenum	6.89 a	5.59 ab	5.87 ab	2.75 b	0.04	0.94
Jejunum	3.76 ab	1.98 b	6.00 a	3.54 ab	0.04	0.88
35 days						
Duodenum	3.30 b	5.05 ab	6.39 a	5.28 ab	0.02	0.58
Jejunum	1.83	1.49	1.74	1.86	0.49	0.18
<u>TNF α</u>						
14 days						
Duodenum	65.05	53.33	53.49	27.05	0.21	12.07
Jejunum	67.47	53.5	69.11	48.34	0.56	12.18
35 days						
Duodenum	76.20 a	63.82 ab	40.62 ab	32.49 b	0.02	9.51
Jejunum	64.96	39.74	44.54	34.86	0.48	14.09

¹NC= negative control – basal diet; PC = positive control – basal diet + colistin sulfate; BP= basal diet + calcium butyrate + papaya extract; BT= basal diet + calcium butyrate + tannin extract.

³Standard error of the mean.

^{a-b}Different letters on the same line are statistically different ($P < 0.05$) according to the Tukey test.

Lipid oxidation, pH and color analysis in the ham

The animals that consumed the diet containing BT presented higher brightness ($P < 0.05$) than those that received the BP, and the NC treatment presented intermediate brightness (Table 4). Regarding lipid oxidation, color (a^* , b^* , C^* , H) and pH no differences were observed among the treatments.

Table 4. Evaluation of the ham quality via analysis of lipid oxidation (TBARS), pH and color

Variable	Treatments (mean $\pm$ standard deviation) ¹			
	CN	BP	BT	<i>p</i> -valor
Malonaldehyde concentration (g kg⁻¹ of sample)	0.000410 $\pm$ 0.00015	0.000534 $\pm$ 0.00015	0.000481 $\pm$ 0.00008	0.47
pH	6.22 $\pm$ 0.29	6.23 $\pm$ 0.23	5.97 $\pm$ 0.26	0.24
L*	50.86 $\pm$ 2.44 ab	47.2 $\pm$ 1.63 b	51.52 $\pm$ 2.73 a	0.03
a*	18.07 $\pm$ 1.66	19.13 $\pm$ 1.55	16.81 $\pm$ 1.24	0.09
B*	3.35 $\pm$ 2.62	2.50 $\pm$ 2.49	3.05 $\pm$ 3.05	0.77
C*	18.53 $\pm$ 1.87	19.32 $\pm$ 1.62	17.09 $\pm$ 1.35	0.13
H	10.15 $\pm$ 7.69	7.02 $\pm$ 2.78	10.17 $\pm$ 4.52	0.60

¹NC= negative control – basal diet; BP= basal diet + calcium butyrate + papaya extract; BT= basal diet + calcium butyrate + tannin extract.

^{a-b}Different letters on the same line are statistically different ($P < 0.05$) according to the Tukey test.

DISCUSSION

Performance

For the performance analyses there were no differences between treatments. The present work corroborates with Biagi et al. (2015) who when

providing different concentrations of tannin (0.113%, 0.225% and 0.450%) to weaned piglets, observed no significant effects on the body weight at 56 days of age, DWG and DFI. Boas et al. (2016) also found no significant difference in weight at 66 days of age, DFI, DWG and FC of the animals that received a blend of organic acids (0,5%), and sodium butyrate (0,1%) and the association of organic acids and sodium butyrate (0,5%¹ + 0,1%, respectively) compared to the control treatment.

Candek-Potokar et al. (2015) when providing different concentrations (1%, 2% and 3%) of hydrolysable tannin extract to male pigs in the finishing phase also observed no significant difference in the final body weight (193 days old), DWG and FC, however the animals that received the diet with 3% tannin extract presented lower DFI. According to the authors, the lower feed intake is due to the fact that the high tannin concentrations worsen the appeal of the feed due to its astringent taste. Zeng et al. (2015), when using a blend of essential oil containing thymol and cinemaldehyde (0.025%) in the piglet diet observed better results of DWG and FC when compared to animals of the negative control treatment. The authors associated these results with several factors, such as improvement of the apparent digestibility of the diet, improvement of the intestinal morphology in the jejunum and composition of the intestinal microbiota.

The effect of antimicrobials is proportional to the challenges to which the animals are subjected (Oetting et al., 2006). In this work, the animals were housed in previously disinfected experimental facilities, closed and maintained empty for a period of 50 days before receiving the animals. This sanitary conditions may have reduced environmental contamination, and may indicate

that the animals were submitted to a low immunological challenge. It is known that the environmental conditions of commercial farms differ from those of experimental farms, in which the challenges imposed on pigs are intensified by different management, microbial concentration and population density. These may be possible explanations for the absence of significant results regarding the performance of animals that received the different additives. Costa et al. (2007) also comment that the provision of highly digestible diets may decrease the antimicrobial potential of the additives, since these diets result in little substrate available for bacterial growth, thus limiting the development of microorganisms in the gastrointestinal tract. The piglets of the present study received complex and digestible diets, which may also be an explanation for the lack of positive results regarding animal performance.

Incidence of diarrhea

The BT treatment was that which provided the lowest incidence of diarrhea in the piglets when compared to the other treatments. It was also observed that the BP treatment was not efficient in reducing the incidence of diarrhea in the piglets.

Data of the present study corroborated with that of Zeng et al. (2015), in which a blend of essential oils containing 0.025% of cinnamaldehyde and thymol added to the animals' diet reduced the incidence of diarrhea in piglets. However, Júnior et al. (2017) evaluated a blend of different plant extracts and benzoic acid (0.3%), with or without addition of colistin sulphate (40 ppm), and for weaned piglets, no decrease in the incidence of diarrhea among the animals was observed. Cairo et al. (2017). studying 0.05 %; 0.1% or 0.15% of Brazilian

red pepper essential oil in the diet of weaned pigs observed that pigs that received 0.15% of red pepper essential oil shown lower incidence of diarrhea than the other treatments.

Organic acids inhibit the development of pathogenic microorganisms because of their ability to reduce the gastrointestinal pH and because they have the ability to penetrate the cell wall of some microorganisms when in their non-dissociated form (Namkung et al., 2004; Vondruskova et al., 2010). They may also present an antibacterial effect on *Escherichia coli*, an important gastrointestinal pathogen of the pigs (Souza, 2015), and also have effects on the immune system, promote gastric emptying, assist in intestinal motility and absorption of water, minerals and other nutrients, and increase enzyme activity (Boas et al., 2016; Vondruskova et al., 2010).

Butyrate acts as an acid-forming agent that has anti-inflammatory and anticarcinogenic properties (Celasco et al., 2014; Hamer et al., 2008). This additive acts as the main source of energy for colonocytes, and can also act on enterocytes. Hamer et al. (2008) reported that butyrate has an antidiarrheal effect and that its therapeutic effect on inflammatory processes in the human colon is already known.

In vitro and *in vivo* studies have demonstrated that some plant extracts, among them the tannin extract, presented high anti-inflammatory and antimicrobial potential against several gram (+) and gram (-) pathogens, preventing the occurrence of enteritis or intestinal disorders, such as diarrhea (Elizondo et al., 2010; Hanczakowska and Swiatkiewicz, 2012). Among these pathogens are *Escherichia coli* and *Salmonella spp* (Biagi et al., 2015; Frankič et al., 2009; Scalbert, 1991).

Therefore, the piglets that presented the lowest incidence of diarrhea may have benefited from the associated action mechanisms of calcium butyrate and the tannin extract, which together may have acted on pathogens present in the intestinal lumen.

Intestinal morphology

In the morphological analyses no statistical differences were observed between the treatments for all parameters evaluated. During the lactation period, piglets have well developed villi; however immediately after weaning the small intestine of pigs undergoes gradual biochemical and histological changes, such as decreased villus height, hyperplasia of crypt cells and increased depth of the crypts (Pluske, 2016; Pluske et al., 1996). These changes occur due to the stress caused by separation from the mother, the change in environment, the mixture with animals of other litters and alteration of the diet, resulting in reduction of the digestive and absorptive functions of the intestine (Tucci et al., 2011; Xu et al., 2003), directly influencing the intestinal health, and consequently the growth of animals.

Biagi et al. (2010) observed no significant difference regarding villus height and crypt depth in the jejunum of piglets that received 0.113%, 0.225% and 0.450% of tannin in the diet. Liu et al. (2017), when using a blend composed of organic acids (citric, fumaric, malic and sorbic) and essential oils (thymol, vanillin and eugenol) in the diet of broilers (0.30 g/kg) did not observe differences in the VH, CD and VH/CD ratio in the duodenum. However, in the jejunum the animals that received the mixture of essential oils and organic acids presented higher VH and CD when compared to the negative control treatment.

The authors indicated that the intestinal efficiency of digestion and nutrient absorption is related to an adequate morphology of the intestinal epithelium. Bilic-Sobot et al. (2016) provided hydrolysable tannin at concentrations of 1%, 2% and 3% to male pigs in the growth and finishing phases and did not observe differences regarding the VH, CD, WID and VH/CD ratio for the jejunum, however in the duodenum they observed a significant difference in villus height, where the treatment with the 3% concentration presented higher VH when compared to the negative control. The authors reinforced the idea that the greater the villi height, the greater the area of absorption, and also that in the duodenum there occurs the actuation of pancreatic secretions with food coming from the stomach and that the jejunum is characterized as the site with the highest absorption of nutrients.

Immunohistochemistry

The lower COX-2 immunoexpression in the BT group at 14 days of experimentation in the duodenum is indicative of reduced tissue injury and lower inflammatory response. Likewise, the lower TNF α immunoexpression for the same group reveals a reduced presence of macrophages, and a possible decrease in the presence of pathogenic microorganisms in the segment.

Free radicals are naturally produced in the body, or originate due to some biological dysfunction, such as inflammatory processes. The most important compounds are called reactive oxygen species (ROS) (Barreiros et al., 2006). The ROS are responsible for reactions that compromise the health and productivity of animals, and are factors for formation of ulcerative and

erosive lesions along the gastrointestinal tract (Borrelli and Izzo, 2000; Muss et al., 2013).

According to studies conducted by Louguercio et al. (2005), Barreira et al. (2008) and Frankic and Salobir (2011), the tannin extract has antioxidant capacity, aiding in the neutralization process of free radicals produced during *in vivo* oxidative stress, which may indicate that the antioxidant action of the tannin extract helps prevent inflammatory events. It also has the ability to couple to other molecules such as proteins and polysaccharides, forming a protective layer composed of the tannin-protein or tannin-polysaccharides complex, which is associated with a tissue repair process in the case of wounds, burns and inflammation (Barreira et al., 2008; Pinto et al., 2001).

Butyrate is a product of the animal metabolism itself, produced by the intestinal microbiota, mainly in the colon (Bartholome et al., 2004). It is an important source of energy for colonocytes, aiding in the intestinal barrier function through epithelial maintenance (Plöger et al., 2012; Thibault et al., 2007), inhibiting apoptosis of mucosal cells, acting in cell renewal (Bartholome et al., 2004; Breves et al., 2007; Woodward et al., 2012) and contributing to its homeostasis by regulating the expression of genes linked to cellular processes, including cell proliferation and differentiation (Celasco et al., 2014; Silva, 2015), where the same effects are expected in enterocytes (Claus et al., 2007).

Butyrate can exert immunomodulatory effects, such as the ability to suppress the nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Hamer et al., 2008), which is a transcription factor responsible for controlling the expression of pro-inflammatory cytokine genes. Therefore, butyrate-induced suppression of NF- κ B contributes to decreased COX-2 and TNF α concentrations (Segain et al.,

2000; Song et al., 2006). In view of the above, a joint effect between the tannin extract and calcium butyrate is perceived, in which they act by reducing the immunoexpression of COX-2 and TNF α .

In the jejunum, the reduced COX-2 expression at 14 days for the positive control (PC) treatment indicated lower inflammatory activity. Pedroso et al. (2005) explained that colistin sulphate protects the jejunum of piglets against inflammatory processes and increases the use and absorption of available nutrients.

As shown by Sudhaker et al. (2014), Vij and Prashar (2015), Sagnia et al. (2014), Vuong et al. (2015) and Pinto et al. (2015), the papaya extract provides several beneficial characteristics to the organism, such as cytoprotective action, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. In a study performed by Pinto et al. (2015) in rats with gastric lesions, a gastroprotective effect was observed on the mucosa. Van Krimpen et al. (2010) observed anthelmintic action on *Ascaris suum* when using the compound in the diet of pigs. However, greater COX-2 expression observed in the BP treatment in the jejunum at 14 days and in the duodenum at 35 days indicates a greater inflammatory response. No justification was found in literature for the greater inflammatory reaction when pigs received the papaya extract.

Lipid oxidation, pH and color analysis in the ham

The piglets that received the BT showed higher brightness in the ham compared to animals of the BP group ($P<0.05$). When analyzing the pH values, it was possible to observe that the meat of the BT treatment animals maintained

the pH similar to that of fresh meat (5.9), while the treatments NC and BP presented pH values of 6.2, considered the maximum limit for consumption.

At pH 6.2 the myofibrillar proteins are more distant and the fluid is trapped between the muscle fibers (Brewer et al., 2006; Fletcher et al., 2000). The pH 5.9 is close to the isoelectric point of the proteins, where the myofibrillar proteins are more united causing a liquid accumulation in the surface of the part. This liquid reflects the light and increases brightness, justifying the result obtained for the BT group.

Oxidative stress can compromise the health and productivity of animals, and negatively influence the quality and shelf life of the meat and its derivatives (Muss et al., 2013). According to Louguercio et. al. (2005), Frankic and Salobir (2011), Pinto et. al. (2001) and Barreira et. al. (2008), the tannin extract, obtained from different vegetable sources, contains polyphenol groups that are related to antioxidant effects which aid in the process of neutralization of the free radicals produced during *in vivo* oxidative stress. It is known that the lower concentration of free radicals in the animal metabolism is directly related to better meat quality after slaughter. However, in the present study lipid oxidation was not decreased when the animals received the association of butyrate with extracts.

CONCLUSION

The use of colistin and the association of calcium butyrate with papaya and tannin extracts did not alter the performance of weaned piglets or the intestinal morphology, but the association between calcium butyrate and the tannin extract resulted in a significant decrease in the frequency of diarrhea and

reduced the inflammatory process in the duodenum of piglets in the nursery phase. Thus, the combination of butyrate and tannin can be a promising alternative for maintaining intestinal health in post-weaning and an alternative to antimicrobials used in piglets in the nursery phase.

REFERENCES

Araujo, J.C., Téran, F.C., Oliveira, R.A., Nour, E.A., Montenegro, M.A., Campos, J.R., Vazoller, R.F., 2003. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *J Electron Microsc* 52 (4), 429-433.

Barreira, J.C., Ferreira, I.C., Oliveira, M.B.P., Pereira, J.A., 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem*, 107 (3), 1106-1113.

Barreiros, A.L.B6S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécie reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29 (1), 113-123.

Bartholome, A.L., Albin, D.M., Baker, D.H., Holst, J.J., Tappenden, K.A., 2004. Supplementation of total parenteral nutrition with butyrate acutely increases structural aspects of intestinal adaptation after an 80% jejunoileal resection in neonatal piglets. *Jpen-Parenter Enter*, 28 (4), 210-222.

1579 Biagi, G., Cipollini, I., Paulicks, B.R., Roth, F.X., 2010. Effect of tannins on
 1580 growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. Arch Anim
 1581 Nutr, 64 (2), 121-135.

1582

1583 Bilić-Šobot, D., Kubale, V., Škrlep, M., Čandek-Potokar, M., Prevolnik Povše,
 1584 M., Fazarinc, G., Škorjanc, D., 2016. Effect of hydrolysable tannins on intestinal
 1585 morphology, proliferation and apoptosis in entire male pigs. Arch Ani Nutr, 70
 1586 (5), 378-388.

1587

1588 Blikslager, A.T., Moeser, A.J., Gookin, J.L., Jones, S.L., Odle, J., 2007.
 1589 Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. Physiol Res 87 (2),
 1590 545-564.

1591

1592 Boas, A.D.C.V., Budiño, F.E.L., T, Neto, M.A., Schmidt, A., Dadalt, J.C., 2016.
 1593 Monferdini RP, Pizzolante CC. Organic acids in diets of weaned piglets:
 1594 performance, digestibility and economical viability. Arquivo Brasileiro de
 1595 Medicina Veterinária e Zootecnia, 68 (4), 1015-1022.

1596

1597 Borrelli, F., Izzo, A.A., 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer
 1598 remedies. Phytother Res, 14 (8), 581-591.

1599

1600 Breves, G., Kock, J., Schröder, B., 2007. Transport of nutrients and electrolytes
 1601 across the intestinal wall in pigs. Livest Sci, 109 (1), 4-13.

1602

1603 Brewer, M.S., Novakofski, J., Freise, K., 2006. Instrumental evaluation of pH
 1604 effects on ability of pork chops to bloom. *Meat Sci*, 72 (4) 596-602.

1605

1606 Cairo, P.L.G., Gois, F.D., Sbardella, M., Silveira, H., de Oliveira, R.M., Allaman,
 1607 I.B., Costa, L.B., 2017. Effects of dietary supplementation of red pepper
 1608 (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal
 1609 morphology and microbial counts of weanling pigs. *J Sci Food Agricul*, 98
 1610 (2), 541-548.

1611

1612 Čandek-Potokar, M., Škrlep, M., Lukač, N.B., Zamaratskaia, G., Povše, M. P.,
 1613 Bolta, Š.V., Bee, G., 2015. Hydrolysable tannin fed to entire male pigs affects
 1614 intestinal production, tissue deposition and hepatic clearance of skatole. *The*
 1615 *Veterinary Journal*, 204 (2), 162-167.

1616

1617 Celasco, G., Moro, L., Aiello, C., Mangano, K., Milasi, A., Quattrocchi, C., Di
 1618 Marco, R., 2014. Calcium butyrate: anti-inflammatory effect on experimental
 1619 colitis in rats and antitumor properties. *Biomed Reports* 2 (4), 559-563.

1620

1621 Claus, R., Günthner, D., Letzguss, H., 2007. Effects of feeding fat-coated
 1622 butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. *J*
 1623 *anim physiol anim nutr*, 91 (7), 312-318.

1624

1625 Costa Filho, O.A.A.D., Ribas Filho, J.M., Ariede, B.L., Cavalcanti, T., Scapini,
 1626 J.G.S., Pasetto, C.V., 2017. Comparative efficacy of immunohistochemical

1627 markers in surgical healing. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 44 (4),
 1628 367-373.
 1629
 1630 Costa, L.B., Tse, M.L.P., Miyada, V.S., 2007. Extratos vegetais como
 1631 alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões
 1632 recém-desmamados. Rev Bras de Zootecn, 36 (3), 589-595.
 1633
 1634 Elizondo, A.M., Mercado, E.C., Rabinovitz, B.C., Fernandez-Miyakawa, M.E.,
 1635 2010. Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. Vet
 1636 Microbiol 145 (3), 308-314.
 1637
 1638 Fletcher, D. L., Qiao, M., Smith, D.P., 2000. The relationship of raw broiler
 1639 breast meat color and pH to cooked meat color and pH. Poultry Science, 79 (5),
 1640 784-788.
 1641
 1642 Frankič, T., Salobir, J., 2011. In vivo antioxidant potential of Sweet chestnut
 1643 (*Castanea sativa* Mill.) wood extract in young growing pigs exposed to n-3
 1644 PUFA-induced oxidative stress. J Sci Food Agr 91 (8), 1432-1439.
 1645
 1646 Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., Rezar, V., 2009. Use of herbs and spices and
 1647 their extracts in animal nutrition. Acta Agric Slov 94, 95-102.
 1648
 1649 Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I.,
 1650 Thompson, A., Van Immerseel, F., 2006. Butyrate specifically down-regulates

1651 Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. Appl Environ Microb 72 (1),
 1652 946-949.
 1653
 1654 Hamer, H.M., Jonkers, D.M.A.E., Venema, K., Vanhoutvin, S.A.L.W., Troost,
 1655 F.J., Brummer, R.J., 2009. The role of butyrate on colonic function. Aliment
 1656 Pharm Ther 27 (2), 104-119.
 1657
 1658 Hanczakowska, E., Swiatkiewicz, M., 2012. Effect of herbal extracts on piglet
 1659 performance and small intestinal epithelial villi. Czech J Anim Sci, 9, 420-429.
 1660
 1661 Heo, J.M., Opapeju F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J., Nyachoti,
 1662 C.M., 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of
 1663 feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed
 1664 antimicrobial compounds. J Anim Phys and Anim Nutr 97, 207-237.
 1665
 1666 Júnior, C.D., Martins, C.C.S., Dias, F.T.F., Ferracioli, L.B., Sitanaka, N.Y.,
 1667 Moraes, J.E., Ruiz, U.S., 2017. Alternative feed additive, associated or not with
 1668 antibiotic, in weaned piglets feeding: Diarrhea incidence, intestinal mucosa
 1669 morphology, and digestive organs weight. J Anim Sci, 95 (2), 104-105.
 1670
 1671 Kummer, R., Gonçalves, M.A.D., Lippke, R.T., Marques, B.M.F., Mores, T.J.,
 1672 2009. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche.
 1673 Acta Sci Vet 37(1), 195-209.
 1674

1675 Lee, I.K., Kye, Y.C., Kim, G., Kim, H.W., Gu, M.J., Umboh, J., Maaruf, K., Kim,
 1676 S.W., Yun, C.H., 2016. Stress, nutrition and immune regulation in pigs. Asian-
 1677 Australas. J Anim Sci 29, 1075–1082.
 1678
 1679 Liu, Y., 2015. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. J Anim Sci
 1680 Biotechno 6 (1), 41- 49.
 1681
 1682 Liu, Y., Yang, X., Xin, H., Chen, S., Yang, C., Duan, Y., Yang, X., 2017. Effects
 1683 of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth
 1684 promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut
 1685 microflora in broilers. Anim Sci J, 88 (9), 1414–1424.
 1686
 1687 Loguercio, A.P., Battistin, A., de Vargas, A.C., Henzel, A., Witt, N.M., 2005.
 1688 Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão
 1689 (Syzygium cumini (L.) Skells). Cienc Rural 35 (2), 371-376.
 1690
 1691 Mattioli, T.M.F., de Noronha, L., de Lima, A.A.S., Grégio, A.M.T., Machado,
 1692 M.Â.N., de Azevedo, M.L.V., Azevedo-Alanis, L.R., 2017. Utilização de brocas
 1693 trefina para a confecção de tissue microarray. Archives of Oral Research 7 (2).
 1694
 1695 Muss, C., Mosgoeller, W., Endler, T., 2013. Papaya preparation (Caricol®) in
 1696 digestive disorders. Neuro endocrinology letters 34 (1), 38-46.
 1697
 1698 Namkung, H., Gong, M.L.J., Yu, H., Cottrill, M., de Lange, C., 2004. Impact of
 1699 feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance: gut

1700 microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Can J Anim Sci*, 84,
 1701 697–704.

1702

1703 Nazari, M., Karkoodi, K., Alizadeh, A., 2012. Performance and physiological
 1704 responses of milk-fed calves to coated calcium butyrate supplementation. *S Afr*
 1705 *J Anim Sci* 42 (3), 296-303.

1706

1707 Oetting, L.L., Utiyama, C.E., Giani, P.A., Ruiz, U.S., Miyada, V.S., 2006. Efeitos
 1708 de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o
 1709 desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões
 1710 recém-desmamados. *Rev Bras de Zootecn*, 35 (4), 1389-1397.

1711

1712 Pedroso, A.A., Oetting, L.L., Utiyama, C.E., Fernando, J., Menten, M., Lambais,
 1713 M.R., Miyada, V.S., 2005. Variabilidade espacial da comunidade bacteriana
 1714 intestinal de suínos suplementados com antibióticos ou extratos herbais. *Rev*
 1715 *Bras de Zootecn* 34 (4): 1225-1233.

1716

1717 Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I.P., 2004. Weaning
 1718 is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in
 1719 the intestine of piglets. *The Journal of Nutrition* 134, 641– 647.

1720

1721 Pinto, L.A., Cordeiro, K.W., Carrasco, V., Carollo, C.A., Cardoso, C.A.L.,
 1722 Argadoña, E.J.S., de Cássia Freitas, K., 2015. Antiulcerogenic activity of *Carica*
 1723 *papaya* seed in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388
 1724 (3), 305-317.

1725 Pinto, L.G.Q., Pezzato, L.E., Miranda, E.C.D., Barros, M.M., 2001.
 1726 Desempenho do Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado com dietas
 1727 contendo diferentes teores de tanino. Rev Bras de Zootecn, 30 (4), 1164-1171.
 1728
 1729 Plöger, S., Stumpff, F., Penner, G.B., Schulzke, J.D., Gäbel, G., Martens, H.,
 1730 2012. Aschenbach JR, Microbial butyrate and its role for barrier function in the
 1731 gastrointestinal tract. Ann N Y Acad Sci, 1258 (1), 52-59.
 1732
 1733 Pluske, J.R., 2016. Invited review: Aspects of gastrointestinal tract growth and
 1734 maturation in the pre-and postweaning period of pigs. J Anim Sci, 94 (3), 399-
 1735 411.
 1736
 1737 Pluske, J.R., Hampson, D.J., Williams, I.H., 1997. Factors influencing the
 1738 structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. Livest
 1739 Prod Sci 51, 215 – 236.
 1740
 1741 Pluske, J.R., Williams, I.H., Aherne, F.X., 1996. Maintenance of villous height
 1742 and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. Anim
 1743 Sci 62, 131–144.
 1744
 1745 Rostagno, H.S., 2011. Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of
 1746 Feedstuffs and Nutritional Requirements, UFV Viçosa.
 1747
 1748 Sagnia, B., Fedeli, D., Casetti, R., Montesano, C., Falcioni, G., Colizzi, V., 2014.
 1749 Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cassia alata*,

1750 Eleusine indica, Eremomastax speciosa, Carica papaya and Polyscias fulva
 1751 medicinal plants collected in Cameroon. PloS one, 9 (8), 1-10.
 1752
 1753 Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30 (12),
 1754 3875-3883.
 1755
 1756 Segain, J.P., De La Bl  ti  re, D.R., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N.,
 1757 Rosales, C., Galmiche, J.P., 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses
 1758 through NF  B inhibition: implications for Crohn's disease. Gut 47 (3), 397-403.
 1759
 1760 Silva, J.L., 2015. Avalia  o morfológica e morfométrica do jejuno, e zootécnica
 1761 de frangos de corte suplementados com butirato de cálcio microencapsulado.
 1762 Disserta  o de mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco,
 1763 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Recife.
 1764
 1765 Song, M., Xia, B., Li, J., 2006. Effects of topical treatment of sodium butyrate
 1766 and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1  , and
 1767 nuclear factor   B in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats.
 1768 Postgrad Med J, 82:(964), 130-135.
 1769
 1770 Souza, T.C.G.D.D., 2015. Digestibilidade ileal e fecal de dietas com diferentes
 1771 inclusões de acidificante para leitões na fase de creche. Disserta  o de
 1772 mestrado. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Gradua  o em
 1773 Ciências Veterinárias.
 1774

1775 Sudhakar, N., Theivanai, V.R., 2014. Potential medicinal properties of carica
 1776 papaya linn. - a mini review. International Journal of Pharmacy and
 1777 Pharmaceutical Sciences 6 (2), 1-4.
 1778

1779 Thibault, R., De Coppet, P., Daly, K., Bourreille, A., Cuff, M., Bonnet, C.,
 1780 Segain, J.P., 2007. Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is
 1781 involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. Gastroenterology,
 1782 133 (6), 1916-1927.
 1783

1784 Touchette, K.J., Carroll, J.A., Allee, G.L., Matteri, R.L., Dyer, C.J., Beausang,
 1785 L.A., Zannelli, M.E., 2002. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide
 1786 exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. J Anim
 1787 Sci 80 (2), 494-501.
 1788

1789 Tucci, F.M., Thomaz, M.C., Nakaghi, L.S.O., Hannas, M.I., Scandolera, A.J.,
 1790 Budiño, F.E.L., 2011. The effect of the addition of trofic agents in weaned piglet
 1791 diets over the structure and ultrastructure of small intestine and over
 1792 performance. Arq Bras Med Vet Zootec, 63, 931-940.
 1793

1794 Van Krimpen, M.M., Binnendijk, G.P., Borgsteede, F.H.M., Gaasenbeek,
 1795 C.P.H., 2010. Anthelmintic effects of phytogenic feed additives in *Ascaris suum*
 1796 inoculated pigs. Vet Parasitol, 168 (3), 269-277.
 1797

1798 Vassalo, M., 1997. Probióticos para leitões dos 10 aos 30 kg de peso vivo. Rev
 1799 Bras de Zootecn 26 (1), 131-138.

1800 Vij, T., Prashar, Y., 2015. A review on medicinal properties of carica papaya
 1801 linn. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 5 (1), 1-6.
 1802
 1803 Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z., Pavlik, I., 2010.
 1804 Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned
 1805 piglets: a review. Vet Med-Czech 55: 199 – 224.
 1806
 1807 Vuong, Q.V., Hirun, S., Chuen, T.L., Goldsmith, C.D., Murchie, S., Bowyer,
 1808 M.C., 2015. Scarlett CJ. Antioxidant and anticancer capacity of
 1809 saponin-enriched Carica papaya leaf extracts. Inte J of Food Sci Tech, 50 (1),
 1810 169-177.
 1811
 1812 Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in
 1813 trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. Eur J Lipid
 1814 Sci Tech, 72 (12), 1084-1087.
 1815
 1816 Woodward, A.D., Regmi, P.R., Gänzle, M.G., van Kempen, T.A.T.G., Zijlstra,
 1817 R.T., 2012. Slowly digestible starch influences mRNA abundance of glucose
 1818 and short-chain fatty acid transporters in the porcine distal intestinal tract. J
 1819 Anim Sci, 90 (4), 80-82.
 1820
 1821 Xu, Z.R., Hu, C.H., Xia, M.S., Zhan, X.A., Wang, M.Q., 2003. Effects of dietary
 1822 fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and
 1823 morphology of male broilers. Poultry Science, 82 (6), 1030-1036.
 1824

Zeng, Z., Xu, X., Zhang, Q., Li, P., Zhao, P., Li, Q., Liu, J., Piao, X., 2015.
Effects of essential oil supplementation of low-energy diet on performance,
intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant
activities in weaned pigs. Anim Sci, 86, 279-285.

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da colistina e do butirato de cálcio associado aos extratos vegetais de papaia ou tanino não alteraram o desempenho de leitões recém-desmamados, bem como a morfologia intestinal. No entanto, a associação de butirato de cálcio e tanino possibilitou queda significativa na frequência de diarreia dos leitões. Além disso, atuou no processo inflamatório no duodeno, reduzindo a imunoexpressão de citocinas pró inflamatórias. Sendo assim, o tratamento BT é uma alternativa promissora na diminuição da inflamação no duodeno e no controle da diarreia de leitões em fase de creche.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível perceber a importância de novas pesquisas para melhor compreensão dos efeitos e a interação entre os aditivos disponíveis, seja pelas combinações ou níveis a serem testados. Vale destacar que, no presente projeto, a combinação de butirato de cálcio e extrato de papaia não possibilitou resultados positivos para os leitões.

ANEXO A

Distribuição dos blocos de fêmeas e blocos de machos, divididos em pesados, médio pesados, médios leves e leves

Machos Pesados							Fêmeas Média Pesadas					
Ba 38	Ba 39	Ba 40	Ba 41	Ba 42	Ba 43	Ba 44	Ba 45	Ba 46	Ba 47	Ba 48	Ba 49	Ba 50
Extra	T6	T4	T2	T3	T1	T5	T3	T6	T1	T4	T2	T5
Extra	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T2	T3	T4	T6	T5	T1
Ba 37	Ba 36	Ba 35	Ba 34	Ba 33	Ba 32	Ba 31	Ba 30	Ba 29	Ba 28	Ba 27	Ba 26	Ba 25
Machos Leves							Fêmeas Médio Leves					
Fêmeas Leves							Machos Médio Pesados					
Ba 13	Ba 14	Ba 15	Ba 16	Ba 17	Ba 18	Ba 19	Ba 20	Ba 21	Ba 22	Ba 23	Ba 24	
T1	T5	T2	T6	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T6	T4	
T3	T4	T1	T5	T2	T6	T3	T5	T1	T6	T2	T4	
Ba 12	Ba 11	Ba 10	Ba 9	Ba 8	Ba 7	Ba 6	Ba 5	Ba 4	Ba 3	Ba 2	Ba 1	
Machos Médio Leves						Fêmeas Pesadas						

ANEXO B

Escore Fecal

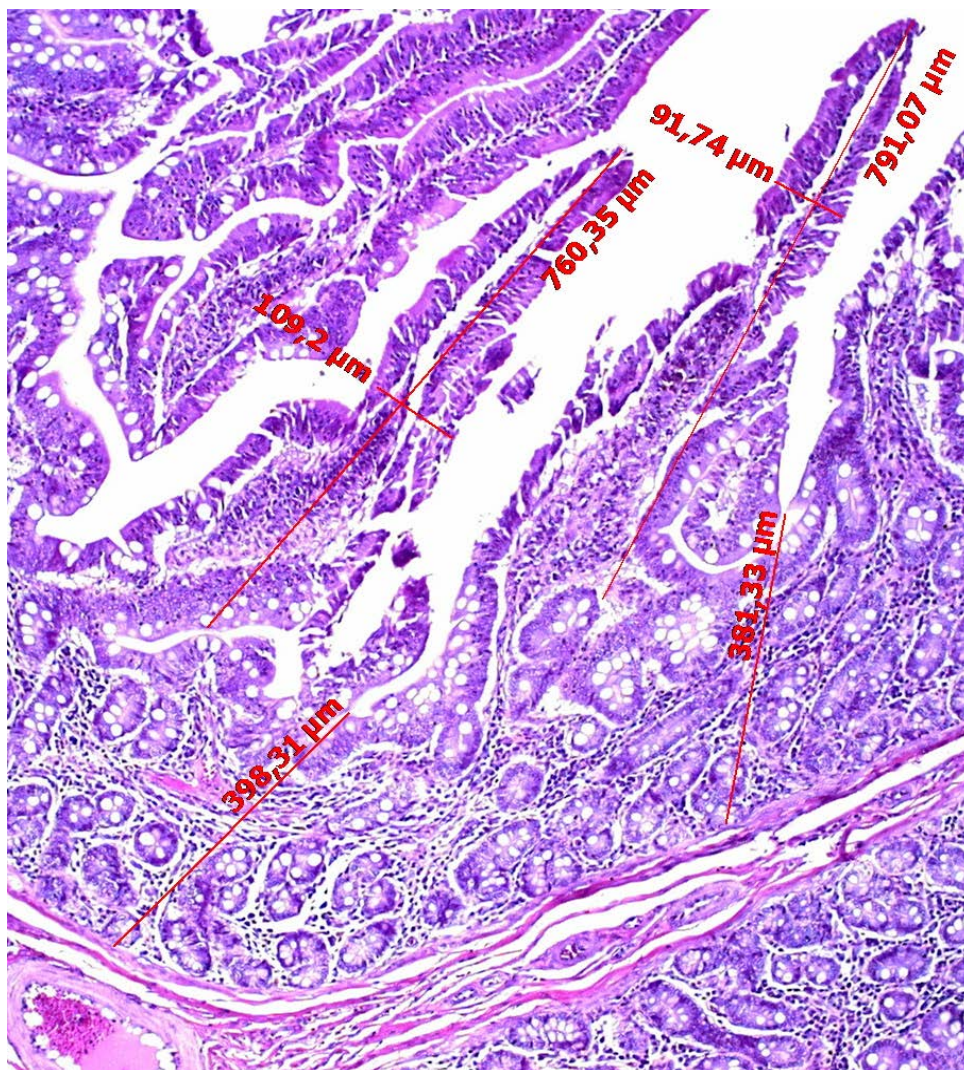


Fonte: MAITO, C. D.; 2015

Classificação do Escore Fecal. A) Escore 0: fezes normais B) Escore 1: fezes pastosas C) Escore 2: fezes cremosas D) Escore 3: fezes líquidas.

ANEXO C

Morfologia Intestinal



Representação das medições de vilosidades e criptas no jejuno de leitões abatidos aos 14 dias de experimentação.

ANEXO D

Microscopia eletrônica de varredura

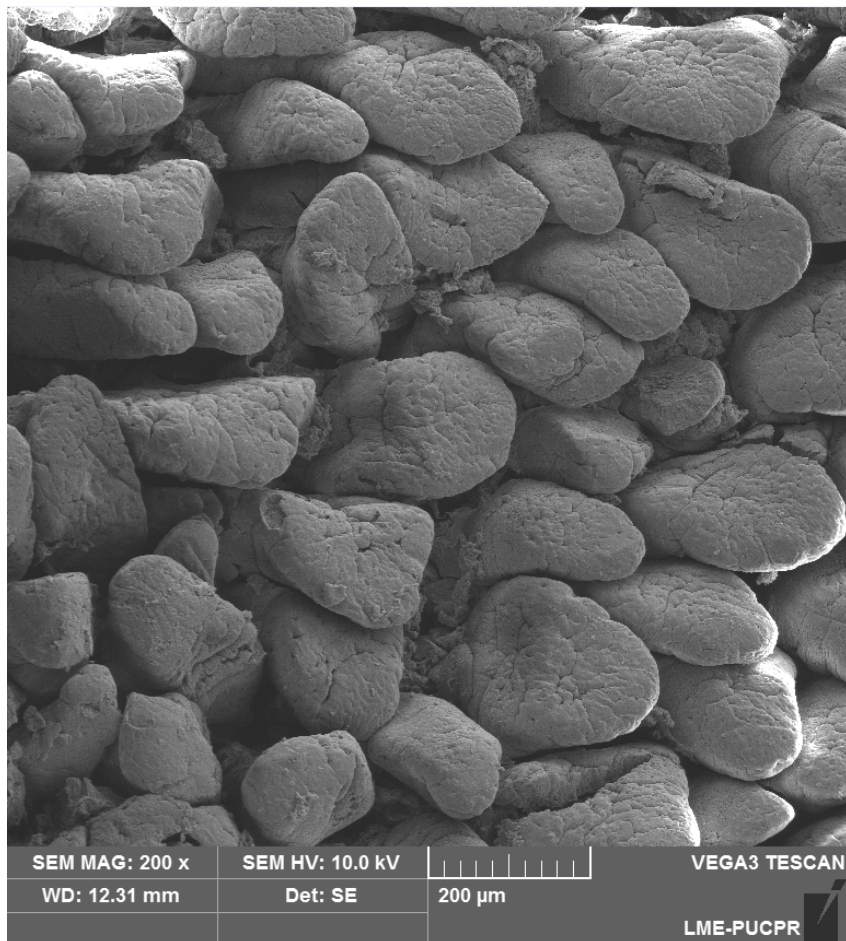
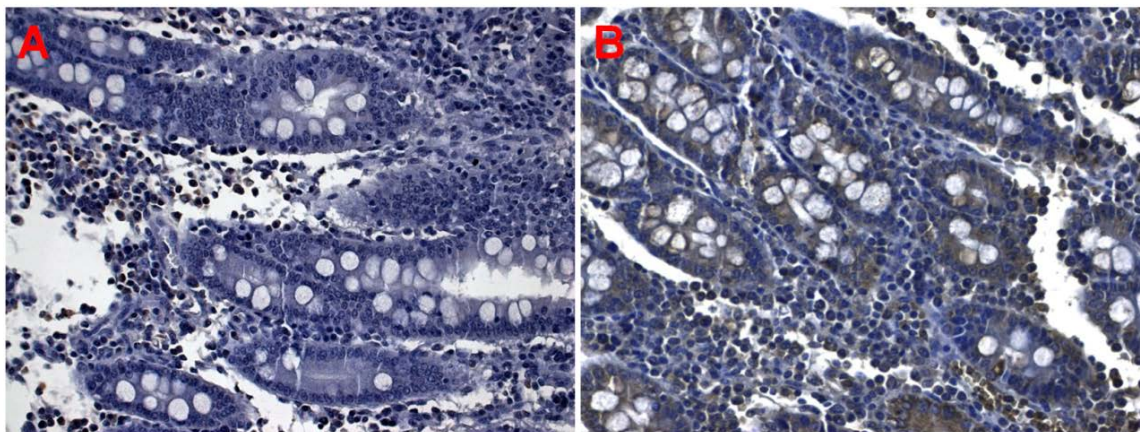


Imagem do duodeno de leitões aos 35 dias de experimentação obtida através da microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 200 μm.

ANEXO E

Imunohistoquímica



A imagem A mostra as células imunomarcadas em marrom pelo TNF α , enquanto a imagem B mostra a área imunomarcada em marrom pelo COX 2, para o duodeno de leitões aos 14 dias de experimentação.